

## CAPÍTULO 1:

### FARMACOLOGÍA CLÍNICA DE LA HORMONA ERITROPOYETINA

Dr. Luis A. Malgor - Dra. Mabel E. Valsecia

#### Introducción

La hormona eritropoyetina (Ep) es el principal factor regulador de la producción de los glóbulos rojos. Esta hormona, químicamente una glicoproteína, es elaborada primariamente por el riñón aunque una pequeña fracción tiene un origen extrarenal (principalmente hepático) en el adulto. La Ep fue el primer factor de crecimiento hematopoyético reconocido como tal. Su producción se relaciona estrechamente con la demanda y oferta de O<sub>2</sub> por los tejidos, de tal manera que la hipoxia activa un sensor de O<sub>2</sub> en los sitios celulares de elaboración de la Ep, promoviendo su biosíntesis y secreción, mientras que la hiperoxia inhibe estos procesos. Constituye un típico mecanismo de retroalimentación (1,2,3).

La Ep interactúa sobre las células progenitoras eritroides de la médula ósea, a través de la unión con receptores específicos de membrana estimulando la proliferación y diferenciación celular. Actúa principalmente sobre los progenitores celulares terminales, de mayor maduración, de la cascada celular eritropoyética. Al contrario de otros factores de crecimiento, la Ep es altamente específica actuando casi exclusivamente sobre las células eritroides medulares. (4,5).

El conocimiento de la farmacología de esta hormona se ha incrementado progresivamente en la última década, sobre todo a raíz de sus actuales usos terapéuticos y su potencialidad en tal sentido. Además, la posibilidad actual de contar con cantidades abundantes y suficientes de Ep humana, gracias a la aplicación

de la tecnología del DNA recombinante, ha permitido su franca incorporación como un agente terapéutico más, útil para el tratamiento de la anemia de la insuficiencia renal crónica (IRC), su principal indicación en el presente, o para el tratamiento de varias otras anemias hipoproliferativas y otros padecimientos hematológicos del ser humano que afectan básicamente la producción de los glóbulos rojos (6,7,8).

#### QUÍMICA Y ESTRUCTURA DE LA ERITROPOYETINA.

La hormona Ep es una glucoproteína de 165 aminoácidos. Su PM ha sido estimado utilizando en gel de poliacrilamida-dodecyl sulfato sódico. Numerosos estudios demostraron variaciones en dicha estimación entre un PM de 27.000 a 39.000 daltons. La Ep urinaria humana purificada posee una actividad específica de 74.000 U/mg de proteína y su PM es de 34.000 daltons. La Ep recombinante humana alcanza una potencia mucho mayor, 210.000 U/mg de proteína y su PM es de 30.400 daltons (9,10).

El contenido de carbohidratos de la molécula de Ep es del 35 % para la Ep urinaria y del 39 % para la rEp humana. Se ha sugerido que una parte de la bioactividad de la molécula de Ep urinaria se altera o inactiva en los procesos de extracción, recolección y purificación. Los carbohidratos de la glucoproteína son principalmente ácido siálico (11 %), hexosas, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico (11,12).

Los estudios químicos y de purificación inicial de la Ep urinaria humana llevados a cabo en las Cátedras de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Medicina de Corrientes, Argentina, por Espada y Gutnisky, fueron pioneros en el área y posibilitaron en gran parte los progresos posteriores ( 13, 14, 15, 16).

La estructura y composición de los carbohidratos de la molécula de Ep son importantes para el mantenimiento de la hormona en circulación. El ácido siálico es necesario para el mantenimiento de la actividad biológica “in vivo” (17). La remoción química o enzimática del ácido siálico, desialación, expone un residuo galactosílico en la molécula que puede entonces ligarse rápidamente a receptores de galactosa en los hepatocitos, lo que determina su metabolización casi inmediata en hígado. Por eso la Ep desialada es eliminada del plasma a un ritmo 20 veces mayor que la hormona inalterada, “in vivo” y se acumula en hígado. La desialación de la molécula de Ep no interfiere sin embargo, con su actividad “in vitro”. En los cultivos celulares de progenitores eritroides, la actividad eritropoyética específica de la hormona se mantiene y el estímulo para la producción de colonias eritroides es similar al que produce la Ep inalterada.

La glicosilación de la Ep parece ser también necesaria para el transporte plasmático de la hormona y para el pasaje de la misma desde la sangre a la médula ósea a través de las células endoteliales de la barrera sangre-médula ósea (18).

La secuencia de los aminoácidos de la molécula de Ep ha sido plenamente dilucidada en la actualidad. La Ep humana es sintetizada con 166 aminoácidos pero la molécula activa posee sólo 165 aminoácidos. Una arginina carboxilada terminal se pierde posiblemente por acción de una carboxipeptidasa intracelular. La secuencia de los aminoácidos de la Ep del mono y del ratón también ha sido diluci-

data. Poseen 192 aminoácidos y aunque muchos de ellos son comunes con la Ep humana, existen diferencias en la secuencia y en la composición, capaces de generar respuestas inmunológicas (19).

La molécula de Ep humana posee 4 cisteínas ligadas por puentes internos de disulfuro entre las cisteínas 29-33 y 7-161, cuya conservación es necesaria para el mantenimiento de la actividad biológica. En tal sentido, la alquilación de los grupos sulfhidrilos produce una pérdida irreversible de la actividad eritropoyética. Lo mismo ocurre con una extensa iodación o luego de la sustitución de aminoácidos de la cadena glicoproteica (12,20)

### **Eritropoyetina Recombinante Humana.**

**El gen de la Eritropoyetina.** El aislamiento, purificación y el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de la molécula de Ep, facilitó la identificación del gen responsable de la síntesis de la misma. El gen de la Ep humana está presente como una copia simple en el cromosoma 7, en la región q 11-q 22 del genoma. El gen humano posee 5 exones y 4 intrones y codifica una proteína de 193 aminoácidos, de los cuales los primeros 27 representan la secuencia hidrofóbica líder y los 166 restantes la proteína madura. Existe una elevada homología entre el gen de Ep del mono (90 %) y del ratón (80 %) con el gen humano (21,22).

La identificación, aislamiento y clonación del gen de la Ep humana impulsó su elaboración en forma recombinante, por ingeniería genética. Luego de varios intentos, (la *Escherichia Coli* produce una hormona carente de carbohidratos y sin actividad biológica “in vivo”) , se incorporó el gen de la Ep humana al aparato genético de células ováricas de un hámster de origen chino. Estas células cultivadas “in vitro”, producen en el medio de cultivo abundantes cantidades de la hormona que posteriormente se purifican por cromatografía

secuencial (23). Este procedimiento ha permitido la provisión de grandes cantidades de Ep para su uso clínico terapéutico y para completar los estudios químicos y biofarmacológicos.

La eritropoyetina recombinante humana (rEpH) es idéntica a la Ep humana natural. Posee la misma secuencia y composición de aminoácidos, la misma estructura de carbohidratos y oligosacáridos, idéntica farmacocinética, actividad biológica y actividad específica.

La administración a pacientes de rEpH no induce la producción de anticuerpos por lo que uso terapéutico se extendió a partir de 1989, año del primer ensayo clínico controlado, básicamente para pacientes anémicos por IRC, y posteriormente para otras varias patologías hematológicas.

#### **La Unidad de Eritropoyetina. International Reference Standard B.**

Una Unidad de Ep corresponde a la actividad eritropoyética contenida en 1.48 mg del mencionado Standard Internacional. Es una preparación de Ep urinaria humana, disponible en ampollas de 10 U en la Division of Biological Standards, National Institute for Medical Research, Holly Hill, Hampstead, London NW3 6RB, United Kingdom (Inglaterra). También se ha estimado que 1 U produce una estimulación de la eritropoyesis similar a la que se observa con la administración de 5  $\mu$ mol de cobalto. Es una unidad arbitraria, como otras muchas unidades de medida, que sin embargo ha sido de gran utilidad para la determinación y el manejo de la actividad eritropoyética de la hormona. La unidad de Ep, es aceptada internacionalmente en estudios biológicos y para estimaciones para el uso clínico (24).

#### **NIVELES NORMALES DE ERITROPOYETINA EN PLASMA.**

La concentración plasmática de Ep, ha sido determinada por radioinmunoensayo. En personas normales la concentración de Ep en plasma es de 10-20 U/L (o 10-20 mU/mL); o 1-2 picomoles/L (25,26). Estas pequeñas cantidades son las necesarias para estimular la producción diaria de glóbulos rojos, que reemplazan fisiológicamente a los que constantemente desaparecen. En casos de anemia, la secreción de Ep aumenta marcadamente. La hipoxia producida por una reducción del hematocrito al 20 % (normal 40-45 %), incrementa la concentración plasmática de Ep en 100 veces, aproximadamente.

#### **Determinación de la concentración plasmática de Eritropoyetina.**

**Bioensayo de la Ep:** La identidad de la Ep, originariamente negada o discutida por algunos hematólogos, sólo pudo ponerse de manifiesto al principio en experimentos en los que la muestra conteniendo la supuesta hormona eritropoyética, se inyecta a animales (principalmente el ratón o la rata) en los que la eritropoyesis fisiológica ha sido suprimida por transfusiones repetidas o por permanencia de los animales en cámaras de hipoxia, a 0.45 atmósferas, por 3 o más semanas. El bloqueo de la eritropoyesis normal se produce por un marcado incremento de la masa de glóbulos rojos circulantes (hematocritos de 70-80 %), lo que ocasiona una desaparición casi total de las células eritroides reconocibles de la médula ósea y de los reticulocitos circulantes. En estas condiciones, si en la muestra inyectada existe actividad de Ep, la misma puede ser detectada por su capacidad para inducir una rápida aparición de nuevos eritroblastos y nueva síntesis de hemoglobina. Estos efectos biológicos pueden a su vez mensurarse con precisión determinando la incorporación de Fe<sup>59</sup> (radioactivo) en los glóbulos rojos de neoformación. El nivel de la captación del Fe<sup>59</sup> producido, se compara con el que produce el Standard Internacional aprobado,

calculándose la cantidad de Unidades presentes en la muestra (27).

El bioensayo de la Ep no es un método muy sensible para las mediciones de esta hormona. Los niveles plasmáticos de personas normales hematológicamente, son indetectables con este método. Sólo se puede determinar y dosar la Ep en plasma, si los niveles sanguíneos de la misma se han elevado marcadamente. Aún así, el bioensayo de la Ep ha sido de enorme utilidad en los procesos iniciales de la investigación de esta hormona y para el conocimiento de sus principales acciones biológicas. Aún sigue utilizándose .

### **Otros métodos de determinación de la Ep. Cultivos celulares. Radioinmunoensayo.**

El desarrollo de la metodología de los cultivos celulares de progenitores hematopoyéticos y su generalización en los últimos años, ha incorporado nuevos sistemas para el dosaje de la Ep. De particular importancia son los cultivos de células eritroides para observar la incorporación de timidina tritiada al DNA de progenitores eritroides (28) o de deoxiuridina tritiada al RNA (29) por la aplicación del estímulo hormonal específico. Los ensayos “in vitro” se llevan a cabo con células de hígado fetal del ratón, de progenitores eritroides del bazo y médula ósea del mismo animal y de la rata. Estos ensayos son menos específicos que los ensayos in vivo.

En los últimos años, como ya fuera mencionado, se ha conseguido la purificación de la Ep humana y la determinación completa de la secuencia de los aminoácidos que la componen. Ello a su vez, ha permitido el aislamiento y la clonación del gen de la Ep y su expresión para la producción de una hormona recombinante activa. A partir de entonces, contándose con una molécula de Ep humana pura, se pudo elaborar anticuerpos a la Ep, con suficiente especificidad y capacidad de bloqueo como para ser utilizados en un radioinmu-

noensayo, que fue desarrollado en plenitud. El radioinmunoensayo de la Ep cuenta con una elevada sensibilidad para la determinación de los niveles plasmáticos normales de la hormona (30,31).

Recientemente se desarrolló un enzoinmunoensayo para la Ep utilizando la metodología ELISA, de más fácil ejecución, reproducible y seguro.

### **SITIOS DE ELABORACIÓN DE ERI- TROPOYETINA. EL RIÑÓN.**

Desde los trabajos originales de Jacobson y col., en 1957, (32) se aceptó que el riñón es el órgano primario en la elaboración y secreción de la Ep. En 1960, Zangheri y col., demostraron que extractos renales normales e hipóxicos, ejercen una clara acción eritropoyética (33). Experimentalmente fue demostrado que ratas con una nefrectomía bilateral son incapaces de incrementar eficientemente la producción de Ep, ante diversos estímulos hipóxicos (34). De la misma manera, pacientes con IRC desarrollan una anemia de lenta evolución, pero progresiva y de grave pronóstico, a raíz de una inadecuada e insuficiente producción de Ep. Justamente, la administración de rEpH, en dosis apropiadas a pacientes anémicos con IRC, corrige completamente la anemia, lo que constituye una clara evidencia de la etiología de la misma y del rol de los riñones en la producción primaria de Ep (35).

Los estudios llevados a cabo para determinar qué células o tejidos del riñón son los responsables de la producción de Ep, fueron numerosos empleándose una tecnología de investigación compleja a nivel celular y subcelular y recién en los últimos años pudieron concretarse resultados positivos.

La utilización de RNAm de Ep, marcados radioactivamente, en 2 tipos de estudios combinados (hibridización "in situ" y autoradiografías), demostró recientemente que las células productoras de Ep en el riñón son **las células intersticiales peritubulares**. Están localizadas por fuera de la membrana basal de los túbulos renales, específicamente en la corteza renal y la parte mas externa de la médula renal. Se relacionan con capilares sanguíneos y probablemente sean células endoteliales (36).

En las células intersticiales peritubulares de las regiones renales mencionadas, se demostró la presencia de RNAm de Ep tanto en condiciones basales, normales, como en cantidades mucho mayores después del estímulo hipóxico. Utilizando ratas, en un modelo experimental, se observó que la Ep renal y plasmática, determinada por radioinmunoensayo, y el RNAm de Ep nuclear en las células peritubulares, se incrementan marcada, rápidamente y en forma proporcional por el estímulo anémico-hipóxico aplicado. Ello indica que la mayor parte de la Ep circulante es de novo-síntesis. Cuando la hipoxia se suprime, el RNAm de Ep disminuye rápidamente, llegando a ser indetectable en 3 horas aproximadamente, indicando que su vida media es relativamente corta.

Se ha estimado que el 20-30 % de las células intersticiales peritubulares de la corteza renal y de la médula adyacente, son productoras de Ep. Serían células especializadas para la biosíntesis de Ep, que se agrupan principalmente en las adyacencias de los túbulos contorneados proximales. El estímulo hipóxico sería detectado o percibido por un sensor de O<sub>2</sub> presente en dichas células. La presencia de anemia puede desencadenar una vasoconstricción de las arteriolas proximales, o también un mayor consumo de O<sub>2</sub> por las células del túbulo proximal, lo que ocasiona un estado de hipoxia distal. Cuando la hipoxia alcanza cierto nivel umbral en las células peritubulares se

induce la transcripción del gen de Ep y se promueve la producción de la hormona. En condiciones normales, sólo un pequeño número de células activan la síntesis de Ep, suficientes para mantener la eritropoyesis fisiológica. En caso que la hipoxia o la anemia se incrementen, un número progresivamente mayor de células peritubulares se incorporan a la producción de Ep, de tal manera que una pequeña reducción de hematocrito determina una respuesta proporcional en la elaboración de la hormona (37, 38).

Los estudios que involucran a las células intersticiales peritubulares como sitios de la síntesis de Ep, han adquirido trascendencia y aceptación en los últimos años. Sin embargo, aun no existe un acuerdo total. Otros estudios sugieren también a otras células renales como posibles sitios de elaboración de Ep: células glomerulares epiteliales, células tubulares, células mesangiales en los glomerulos y otras. Algunos investigadores postulan finalmente que podría existir mas de un tipo celular renal para la elaboración de la Ep, involucrando a varias de las células mencionadas (5, 39).

### **Sitios de elaboración extrarenal de Eritropoyetina.**

Se ha demostrado repetidamente en pacientes anéfricos, y en varios animales de experimentación con nefrectomía bilateral total, que aún en esas circunstancias persiste una capacidad productora de Ep, que se calcula en un 10-15 % de la producción normal. En el hombre esta pequeña cantidad residual de Ep no alcanza para mantener una eritropoyesis normal, pero demuestra la existencia de sitios extrarenales de elaboración de la hormona.

El hígado es el órgano principal en la producción extrarenal de Ep (40). Debe considerarse que el hígado es el órgano elaborador de Ep durante la vida fetal y muy posiblemente conserva un remanente de esa actividad en la vida adulta, que sólo se pone de manifiesto

ante la falta de producción renal de Ep y por intensos estímulos para la secreción de la hormona. Las células responsables de la producción hepática de Ep no fueron aún claramente determinadas habiéndose incriminado, por evidencias experimentales varias, principalmente a los hepatocitos, (específicamente a los hepatocitos que rodean la vena hepática) y también a las células de Kupfer.

La producción de Ep ha sido también demostrada en algunos extractos de tejidos, particularmente extractos de glándulas submaxilares (39,41). Actualmente se ha cuestionado la elaboración de Ep por las glándulas submaxilares, considerándose que el hallazgo puede ser un artefacto producido por fragmentación de moléculas preexistentes de Ep, por proteasas de las submaxilares (42).

Los macrófagos fetales que colonizan el hígado, formando “unidades eritropoyéticas funcionales”, que consisten en un macrófago rodeado de eritroblastos en desarrollo, han sido también postulados como células productoras de Ep (43). Estos macrófagos expresan el gen de Ep y es posible que en la vida adulta actúen en la médula ósea, en contacto con progenitores eritroides, generando una elaboración local de la hormona o producción paracrina de Ep, que puede desempeñar un rol importante en la regulación de la eritropoyesis (44). En condiciones normales ha sido estimado que el 0.2 % de los macrófagos de la médula ósea pueden expresar el gen de la Ep. Se ha postulado que producen una secreción basal de la hormona y que la misma puede incrementarse hasta 5 veces por un severo estímulo hipóxico (39). Sólo entonces y si el stress eritropoyético no ha desaparecido, comenzaría a operar el riñón incrementado a su vez la secreción de Ep.

## **MECANISMOS INTRACELULARES DE SÍNTESIS DE ERITROPOYETINA.**

**Sensor de O<sub>2</sub>** : Los mecanismos por medio de los cuales la hipoxia desencadena el estímulo para la síntesis de Ep aún no fueron totalmente determinados. Existe sin dudas, una reacción sensible a los cambios en la concentración de O<sub>2</sub> que activa la producción de la hormona y que se ha dado en llamar Sensor de O<sub>2</sub> (45). La hipoxia puede ocurrir por los siguientes mecanismos y a través de cualquiera de ellos puede incrementarse la secreción renal de Ep :

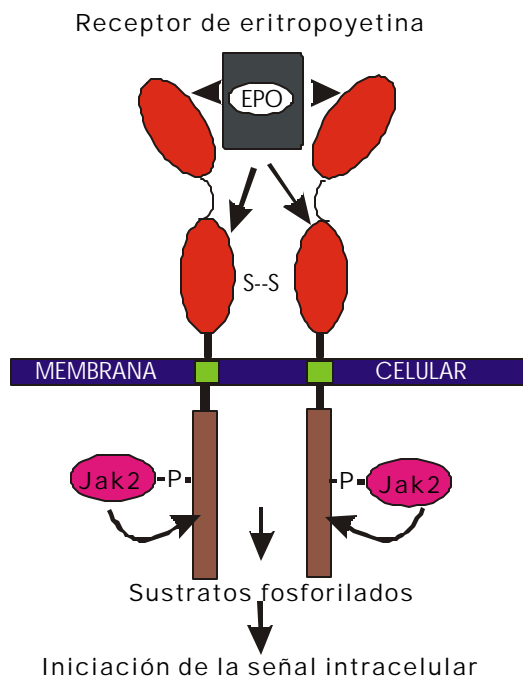
- Reducción de la presión parcial de O<sub>2</sub> ambiental (elevada altitud, hipobaría).
- Disminución de la capacidad de transporte de O<sub>2</sub> en la sangre (anemia).
- Disminución del pasaje de O<sub>2</sub> a través de los alvéolos pulmonares (enfermedad pulmonar obstructiva).
- Disminución del flujo sanguíneo renal (vasoconstricción arteriolas renales, ateromas, trombosis).
- Disminución de la utilización del O<sub>2</sub> por los riñones (cobalto).

Ha sido postulado que el sensor de O<sub>2</sub> se encuentra localizado en la misma célula productora de Ep (46). Últimamente se ha incriminado a una proteína -Hem, el Citocromo P<sub>558</sub>, como el Sensor de O<sub>2</sub>. En tal sentido, el cobalto y el níquel producirían un incremento en la elaboración de Ep, reemplazando al Fe en dicha proteína (47). El incremento de la elaboración de Ep ocurre paralelamente con un incremento previo, de 50 a 100 veces más, en la síntesis de RNAm de Ep en las células productoras de la hormona (48).

Los mecanismos intracelulares de la biosíntesis de Ep fueron principalmente estudiados en modelos experimentales “in vivo” y en cultivos líneas celulares productoras de Ep, células de un carcinoma hepatocelular, conocidas

como **Hep 3 B y Hep G2**. Estas células constituyen un buen sistema de análisis del mecanismo de la síntesis de Ep. En los medios de cultivo, responden a la hipoxia con un marcado incremento de la elaboración de Ep. La incorporación de cobalto al medio, también determina una respuesta similar (49).

En condiciones normales, el  $O_2$  es transportado por la hemoglobina hasta la intimidad de los tejidos, donde difunde hacia las células. La producción de Ep y por ende el mantenimiento de una eritropoyesis normal depende de la  $PO_2$  a ese nivel. La  $PO_2$  en los capilares es normalmente de 30 a 45 mm de Hg. A medida que el  $O_2$  difunde, la  $PO_2$  disminuye. Debido a este gradiente de  $O_2$  en la médula ósea la  $PO_2$  es posiblemente de 25 a 35 mm de Hg, que corresponde a una concentración de 3.5 % de  $O_2$ . Esta es la concentración que fue encontrada como la óptima para el desarrollo de las colonias eritroides CFU-E y BFU-E, en los cultivos. Con dicha concentración de  $O_2$  el número de colonias CFU-E fue incrementado significativamente con cantidades de Ep tan pequeñas como 0.023 mU/ml (39).



En general, se acepta que la hipoxia desencadena en las células productoras de Ep, un incremento del AMPc que a su vez activa a una protein- kinasa A la que produce la fosforilación de varias proteínas (fosfoproteínas), las que son necesarias en la transcripción del DNA y el proceso de translación para la síntesis final de la molécula de Ep. Como para corroborar esta postulación, la administración de AMPc a ratones produjo un marcado incremento de la producción de Ep y de la masa globular roja (50).

Fue también demostrado que este mecanismo básico se desarrolla con la participación de varios segundos mensajeros y proteínas reguladoras. Concretamente, la hipoxia produciría la liberación de varios autacoides los que activan receptores de membrana en las células productoras de Ep. Como consecuencia se activan proteínas G estimuladoras (Gs), las que activan a su vez a la adenilciclasa para incrementar la concentración de AMPc (51).

Los segundos mensajeros involucrados son: eicosanoides,  $PGE_2$ ,  $PGI_2$ , la 6-keto- $PGE_1$ , adenosina, agentes agonistas adrenérgicos  $\beta_2$ , y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que se genera por la acción del ión superóxido ( $O_2^-$ ) en la hipoxia (52).

Apoyando la postulación acerca del rol del AMPc y algunos segundos mensajeros, fue demostrado que la hipoxia y la vasoconstricción de las arteriolas renales produce un incremento de la  $PGE_2$ . Asimismo, la administración previa de indometacina, que bloquea la síntesis de las PGs, inhibe el incremento de Ep, después de la hipoxia.

Existen también varios mecanismos de retroalimentación negativa, que se ponen de manifiesto en la producción de Ep. El AMPc producido por la hipoxia, produce secundariamente una reducción del  $Ca^{++}$  intracelular. Por eso, se observó en cultivos de células Hep 3 B, que bloqueadores de los canales de

Ca<sup>++</sup>, como el cobalto, verapamilo o diltiazem, incrementan la producción de Ep "in vitro". El IP<sub>3</sub> (inositol trifosfato), produce un aumento de la movilización del Ca<sup>++</sup> intracelular a partir del retículo endoplásmico. El aumento del Ca<sup>++</sup> intracelular, posiblemente aumente los niveles de una fosfoproteína inhibitoria, que ocasiona una disminución de la síntesis de Ep.

El DAG (Diacilglicerol) puede también jugar un rol en los mecanismos de retroalimentación negativa de la secreción de Ep. En algunos experimentos con membranas neuronales fue observado que la hipoxia isquémica incrementa marcadamente los niveles del DAG, lo que ocasiona la activación de la proteinkinasa C y la fosforilación de proteínas inhibitorias para la síntesis de Ep (53).

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA ERITROPOYETINA.

### La Hematopoyesis.

La hematopoyesis es un complejo sistema de multiplicación celular que involucra mecanismos de proliferación, diferenciación y maduración. Incluye a todas las líneas celulares que originan a todos los componentes celulares de la sangre (compartimientos megacariocítico, linfoide, granulocítico, de macrófagos, plasmocitos, y eritrocítico). Todas las líneas celulares hematopoyéticas se originan en una célula madre, llamado "**stem cell**" troncal o **célula progenitora troncal totipotencial**.

El "**stem cell**" hematópoyético totipotencial da origen a otros **progenitores celulares pluripotenciales**, que originan a varias líneas celulares hematopoyéticas. Un progenitor multipotencial reconocido es el CSF-GEMM, Unidad formadora de colonias de granulocitos-eritrocitos-megacariocitos-macrófagos, que da origen a dichas líneas celulares. Los progenitores multipotenciales a su vez originan a "**stem cells**" o **progenitores oligopoten-**

**ciales y bipotenciales**, que involucran, estos últimos, a 2 líneas celulares. En relación con la línea celular eritroide se han identificado los progenitores bipotenciales CSF-EMeg (Unidad formadora de colonias eritroide-megacariocítica), CSF-EEO (eritroide-eosinófilos) y CSF-EP (eritroide-células plasmáticas).

Todos estos progenitores tienen capacidad de autorenovación o autoreplicación y diferenciación hacia más de una línea celular. Es generalmente aceptado que el proceso proliferativo y diferenciativo de los stem cells más primitivos es de tipo estocástico, (randomizado o al azar). Estos progenitores celulares más primitivos, generan finalmente los llamados **stem cells o progenitores comprometidos** hacia una línea celular. Estos progenitores se llaman así porque tienen capacidad proliferativa y de diferenciación pero sólo hacia una única línea celular, que puede ser de granulocitos, macrófagos, megacariocitos, linfocitos o eritrocitos (54).

Los **progenitores celulares eritroides comprometidos** hacia la línea celular eritrocítica o de los glóbulos rojos, se generan siguiendo la cascada proliferativa hematópoyética, con la intervención de algunos factores de proliferación no específicos como la Interleukina 3 (IL 3) y el factor estimulante de colonias granulocitos macrófagos (CSF-GM), y posteriormente a medida que las células se diferencian y expresan receptores, con la intervención también de la Ep. De acuerdo con la teoría estocástica estos factores de proliferación glicoproteicos, regulan y facilitan la proliferación y diferenciación, pero no lo dirigen.

### La Eritropoyesis. Progenitores celulares eritroides.

La existencia de células progenitoras de la progenie eritrocítica, no reconocibles en los frotis o extendidos de médula ósea prepara-

dos con los métodos habituales de cobración, se ponen en evidencia “in vitro”, en cultivos utilizando medios semisólidos de agar, fibrina o mas comunmente de metilcelulosa (Iscove y col. ,55). También se los puede observar en medios líquidos (56), o “in vivo” utilizando la técnica del desarrollo de colonias esplénicas (57), en cámaras de difusión o por la incorporación del hierro radioactivo. Cada uno de estos sistemas tiene ventajas e inconvenientes. Un problema común en los medios de cultivo es la presencia de ingredientes complejos, a veces impurezas y la utilización frecuente de suero sanguíneo fetal en diferentes concentraciones con el aporte de numerosas moléculas definidas y no definidas, que pueden influenciar el desarrollo de las colonias celulares.

Los progenitores celulares eritroides, así como también los progenitores de otras líneas celulares, pueden distinguirse de acuerdo a sus propiedades físicas, por sedimentación diferencial; de acuerdo a su sensibilidad a factores diversos de proliferación y a la Ep; previa determinación del estado del ciclo celular, o de acuerdo a la cinética y morfología de las colonias de células que los progenitores dan origen, “in vitro” o “in vivo”. De acuerdo a la cinética y morfología de las colonias eritroides desarrolladas en medios semisólidos, pueden distinguirse los siguientes progenitores eritroides (6, 4):

1. BFU-E Primitivos, Unidades Formadoras de “Burst” Eritroides Primitivos o “Early Burst Forming Units Erythroid”.
2. BFU-E Tardios o Maduros, Unidades Formadoras de “Burst” Eritroides Tardios o Maduros, o Late Burst Forming Units Erythroid”.
3. CFU-E , Unidades Formadoras de Colonias Eritroides o “Colony Forming Units Erythroid”.

### **BFU-E Primitivos o “Early Burst Forming Units Erythroid”.**

Son las primeras células progenitoras comprometidas hacia la línea eritroide. Proviene de la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos oligo o bipotenciales. Como ya mencionamos, han sido identificados varios progenitores bipotenciales, como el progenitor eritroide-megacariocítico, o el eritroide-eosinófilo y el eritroide-plasmocitos, que dan origen a estos progenitores eritroides. Los BFU-E Primitivos son células que en su estado inicial mas inmaduro carecen de receptores para Ep. En ese estado son dependientes de otros factores de proliferación hematopoyéticos, principalmente de la IL-3 y del CSF-GM que inducen progresivamente su diferenciación (58,59). También se ha postulado que la IL-9 tendría acciones estimulantes similares. El CSF-GM, aparte de efectos directos, potencia o facilita la acción de la IL-3.

Ha sido demostrado que la mayoría de los BFU-E Primitivos no están en ciclo celular y que la hipoxia aguda o la hipertransfusión sólo producen efectos transitorios y poco evidentes sobre la proliferación de los mismos. Sin embargo, cuando la demanda eritropoyética es sostenida, la proliferación de los BFU-E Primitivos se incrementa claramente (60). Estos progenitores son también encontrados en la sangre, desde donde pueden obtenerse y aislarse en forma eficiente. También son obtenidos a partir del hígado fetal y de la médula ósea.

A medida que maduran y se diferencian aumenta la sensibilidad de los BFU-E Primitivos a la Ep. Justamente, la maduración y diferenciación de estas células se caracteriza por la adquisición progresiva de receptores a Ep. Se ha observado en cultivos de BFU-E Primitivos humanos, que el 90 % de los mismos es dependiente de IL-3 en las primeras 48 horas de incubación. La sensibilidad y dependencia

a Ep aparece recién a las 72 horas y aumenta a medida que se diferencian y maduran.

En el medio de cultivo estos progenitores producen grandes colonias de células eritroides reconocibles maduras (eritroblastos), de 500 o más células, producto de las sucesivas mitosis, a los 7 días (médula ósea de ratas o ratones) o a los 14 días (médula ósea humana).

### **BFU-E Maduros o Tardíos o “Late Burst Forming Units Erythroid”.**

Estos progenitores son progresivamente dependientes de Ep. Expresan receptores a la hormona en número creciente a medida que maduran para convertirse en CFU-E. Constituyen un estado intermedio entre los progenitores más primitivos y los de mayor maduración. Forman colonias menos numerosas que los progenitores precedentes. Los BFCU-E maduros producen colonias de células eritroides reconocibles a los 3-4 días de incubación, en los medios de cultivos semisólidos (médula ósea de ratas o ratones). Los progenitores BFCU-E también poseen receptores para otros agentes farmacológicos y hormonales, cuyo rol no está aún claramente definido. Se destacan en tal sentido los receptores de la superfamilia para esteroides, hormonas tiroideas, y retinoides.

### **CFU-E, Unidades Formadoras de Colonias Eritroides, “Colony Forming Units Erythroid”.**

Representan los progenitores eritroides más maduros. Son los más dependientes de la Ep y los que expresan los receptores para la hormona en mayor densidad. La mayoría de los CFU-E están en ciclo celular y no pueden sobrevivir en los medios de cultivos sin Ep. Son una interface entre los progenitores eritroides y las células eritropoyéticas reconocibles como eritroblastos de la médula ósea. Los CFU-E son una población celular que ha sido purifi-

cada para facilitar su estudio. En los medios de cultivo semisólidos de metilcelulosa, requieren la presencia de pequeñas cantidades de albúmina libre de lípidos, transferrina, ácido oleico, ácido linoleico, fosfatidilcolina, colesterol, concentraciones fisiológicas de IGF-1 o insulina, y Ep. Luego de 48 horas de incubación producen colonias de eritroblastos reconocibles (61).

Ha sido observado que en casos de anemia por deficiencia de hierro los CFU-E aumentan su número mientras que los eritroblastos disminuyen ante la dificultad para la síntesis de hemoglobina (62). De la misma manera, los CFU-E se acumulan en casos de una anemia experimental secundaria a IRC, posiblemente por la insuficiente o inadecuada producción de Ep, que inhibe su diferenciación y maduración hacia eritroblastos maduros (63).

Siguiendo la cascada proliferativa eritropoyética, los CFU-E dan origen a los promonoblastos, primeras células eritroides reconocibles de la médula ósea, éstos a los eritroblastos basófilos y siguiendo la diferenciación a eritroblastos policromáticos, ortocromáticos, reticulocitos, los que ya pasan a la circulación y finalmente a los glóbulos rojos maduros de la sangre. En el proceso de diferenciación las células eritroides completan la síntesis de hemoglobina y progresivamente pierden el núcleo. A medida que los eritroblastos avanzan en su diferenciación van perdiendo progresivamente los receptores a Ep, de tal manera que los reticulocitos y posiblemente los poli y ortocromáticos, ya no necesitan la presencia de la hormona para continuar su diferenciación.

### **Receptores de la Eritropoyetina. Mecanismos de señalización y transducción.**

La Ep interacciona en las células eritroides con un receptor de membrana, específico y saturable. Forma parte de una superfamilia de **receptores para citoquinas**, de la que parti-

cipan los receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CSF-GM, CSF-G, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), GH (Growth Hormone, somatotrofina), Prolactina, y otros. Estos receptores comparten varias similitudes en su estructura, como idénticas cadenas en secuencias de aminoácidos, sugiriendo que desencadenan similares mecanismos de señalización.

El receptor de Ep es un polipéptido de 507 aminoácidos que posee 3 dominios: un dominio extracelular de unión a la Ep que tiene 223 aminoácidos; un dominio transmembrana de 24 aminoácidos y un dominio citoplasmático de 236 aminoácidos. Como otros miembros de la superfamilia de receptores para citoquinas, poseen 4 cisteínas y un “motif” triptofan-serina-X-triptofan-serina (WSXWS), en el que X es un aminoácido cualquiera, en el dominio extracelular. El receptor de Ep posee además un quinto residuo de cisteína, del que carecen los otros miembros de la superfamilia. La cola citoplasmática del receptor de Ep posee 2 regiones de funciones opuestas. Una región próxima a la membrana de 103 aminoácidos, que transduce las señales proliferativas, y una región carboxi-terminal de 40 aminoácidos, que las inhibe o regula en descenso (64).

El gen responsable de la síntesis del receptor de Ep ha sido identificado y clonado, lo que ha facilitado el conocimiento de su estructura y funciones. Posee 8 exones, 5 de los cuales codifica la región extracitoplasmática, 1 la región transmembrana y los 2 restantes la región citoplasmática. El PM del receptor de Ep ha sido estimado en 66.000 daltons (65)

En los cultivos, las células eritroides expresan de 300 a 1000 sitios de unión por célula, 20 % de los cuales son receptores de alta afinidad y 80 % de baja afinidad. En la evolución de la cascada eritroide los sitios de alta afinidad alcanzan su máxima expresión a nivel de los CFU-E. La Ep regula sus receptores

desencadenando mecanismos de regulación en descenso (“down regulation”) o de regulación en ascenso (“up regulation”), de acuerdo con el número de moléculas de Ep presentes en el medio extracelular. La vida media de los receptores fue estimada en 1 a 4 horas. En los cultivos, la unión de la Ep a sus receptores se facilita por la desialación de la molécula, o por la presencia de neuraminidasa o de agentes reductores, lo que sugiere que ni el ácido siálico ni los residuos sulfidrílicos son necesarios para la unión.

Ha sido postulado un modelo que incluye la formación de un complejo Ep-receptor y transducción de señales, mediante el cual una molécula de Ep, se une en el dominio extracelular a dos moléculas de receptor, formando un dímero. Como consecuencia, se generan interacciones proteína-proteína en el dominio transmembrana y reacciones que involucran a protein-kinasas en la región citoplasmática del receptor. Ello produce la fosforilación de ambos receptores y de sustratos adicionales, principalmente tirosin-fosforilaciones en varias proteínas celulares que fueron identificadas. Ep también induce la actividad de una protein-kinasa C nuclear, en los progenitores eritroides.

La fosforilación del receptor de Ep, que a su vez induce otras fosforilaciones de proteínas de membrana o citoplasmáticas, es el mecanismo inicial de los eventos bioquímicos desencadenados por la hormona. Sin embargo, la secuencia de otros mecanismos que finalmente determinan la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides, está aún lejos de ser bien conocido (66, 67).

Se puede hipotetizar afirmando que la Ep, por sus efectos estimulantes de proliferación celular, debería inducir genes cuyos productos proteicos activen la replicación del DNA, la división celular, el crecimiento y mantenimiento de las células rojas. Además, como la hormona es también un agente de diferenciación,

debería inducir genes específicos de la línea eritroide como los que determinan la síntesis de la hemoglobina y la glicoforina A.

Otros segundos mensajeros han sido también involucrados en el mecanismo de acción de la Ep. El AMPc y el GMPc probablemente juegan un rol modulador en la señalización producida luego de la activación del receptor de Ep. El AMPc intracelular se incrementa posiblemente vía adenilciclase. También se activaría la fosfolipasa A2 y la C con la producción de DAG (diacilglicerol) y ácido araquidónico y la subsecuente formación de metabolitos del araquidonato, vía lipoxigenasa. Otro efecto descripto es el rápido influjo del  $Ca^{++}$  al medio intracelular luego de la interacción Ep-receptor.

### **ACCIONES FISIO- FARMACOLÓGICAS DE LA ERITROPOYETINA. LA RESPUESTA CELULAR ERITROIDE**

La producción de Ep y el desarrollo de sus acciones se cumpliría de acuerdo a un modelo o mecanismo que ha sido aceptado en general. De acuerdo a dicho modelo, el estado hipóxico produce la activación del Sensor de  $O_2$  (cit. P<sub>558</sub>) con lo que se induce la transcripción del gen de Ep y elaboración del RNAm de la hormona. El aumento consecutivo de la secreción de Ep, resulta en una síntesis de productos proteicos que inducen proliferación y diferenciación celular en los progenitores eritroides.

**Proliferación eritroide:** Consiste fundamentalmente en un estímulo a mitosis celulares (68). Para ello, la Ep parece actuar sobre una población de células que están en un estado latente, es decir en la fase  $G_0$  del ciclo celular. El efecto proliferativo básico de la Ep sería promover la incorporación de dichas células al ciclo celular. Para ello, la hormona debería actuar sobre progenitores más precoces que los CFU-E, ya que estos están, casi

todos, en ciclo celular activo. Su efecto sería entonces promotor inicial de las mitosis (posiblemente BFU-E inmaduros) y el mantenimiento del estímulo proliferativo posterior sobre los CFU.E.

**Diferenciación eritroide:** La Ep, (y posiblemente otros factores actuando en etapas más tempranas) al mismo tiempo que estimula la proliferación celular, induce en los progenitores un programa de diferenciación hacia la línea eritroide. El mismo consiste en la incorporación progresiva de elementos específicos de la línea celular, como espectrinas eritroides, globinas, la hemoglobina y el mismo receptor de Ep, que se realiza en diferentes etapas de la diferenciación. Posiblemente participen también en el programa algunos factores de transcripción asociados. En el proceso de diferenciación también es necesaria la presencia de nutrientes específicos como el ácido fólico, la vitamina  $B_{12}$ , el hierro y posiblemente algunos otros factores de proliferación como IGF-1 y el Stem Cell Factor (69).

**Mantenimiento y viabilidad celular eritroide:** La Ep es también necesaria para el mantenimiento y buen estado funcional de los glóbulos rojos. Los progenitores BFU-E tardíos, que ya expresan receptores para Ep, los CFU-E, proeritroblastos y eritroblastos basófilos son absolutamente dependientes de Ep para su supervivencia. Los normoblastos policromáticos, ortocromáticos y reticulocitos, aunque continúan con su diferenciación y maduración, pierden progresivamente los receptores y se compromete su supervivencia. A medida que los progenitores pierden la dependencia a Ep se induce progresivamente la muerte celular programada o apoptosis. Esto demuestra de la Ep es una hormona trófica para la línea celular eritroide .

**Apoptosis:** Consiste en un proceso de muerte celular programada en el compartimiento eritroide. Como se mencionara, los progenito-

res eritroides son dependientes de Ep para su supervivencia. En ausencia de Ep, o a medida que desaparecen los receptores, las células se deterioran, disminuye el tamaño celular, la cromatina nuclear se condensa homogéneamente, la envoltura nuclear se fragmenta, cesa la síntesis de hemoglobina y la célula muere (70). Por el contrario, en presencia de Ep, los progenitores continúan su diferenciación, la síntesis de hemoglobina, desarrollan la enucleación y se convierten en reticulocitos y glóbulos rojos funcionales.

Apoptosis y diferenciación parecen formar parte de un mismo proceso para mantener la eritropoyesis dentro de los límites normales. La célula progenitora eritroide está destinada a seguir estos 2 caminos, o se diferencia hacia células eritroides maduras o sufre el proceso de apoptosis. Los progenitores eritroides necesitan de ciertos niveles de Ep para evitar la apoptosis y a su vez la producción de Ep depende del estado de oxigenación de la corteza renal a nivel de las células intersticiales peritubulares.

Para mantener el delicado control de la eritropoyesis, se ha postulado que podría existir una heterogeneidad de los progenitores eritroides, sobre todo en los CFU-E. La heterogeneidad se refiere a diferencias en la sensibilidad de las células a la Ep. Se ha demostrado que algunos progenitores CFU-E sólo necesitan la presencia de 25 mU de Ep para desarrollar colonias. En cambio otros CFU-E requieren de 1000 mU o más para formar colonias. Ambos poseen la misma capacidad potencial de diferenciación, pero requieren cantidades muy diferentes de Ep para desarrollar ese potencial. El mecanismo de las diferencias de sensibilidad no es bien conocido. Pueden existir diferencias en el número total de receptores por célula o en la presencia o no de receptores de alta afinidad. El número de receptores podría descartarse, ya que la activación de un número pequeño de receptores es capaz de generar una respuesta

máxima. La presencia de receptores de alta afinidad sería entonces responsable de las diferencias de sensibilidad a la Ep. La existencia de receptores de alta o baja afinidad puede ser determinada por otros factores de crecimiento. Se ha mencionado que la IL3 podría inducir en las células eritroides señales de transducción que generan receptores de alta afinidad. La sensibilidad de los receptores puede también estar en relación con el dominio carboxi-terminal citoplasmático del receptor que induce una regulación negativa en la respuesta eritroide, dependiendo de la fosforilación del dominio.

En resumen, la eritropoyesis normal es un proceso en el que millones de glóbulos rojos se producen diariamente en reemplazo de los que desaparecen. La respuesta eritroide a los requerimientos de glóbulos rojos depende de la secreción de Ep y de los progenitores CFU-E, principalmente. De acuerdo a las demandas estos progenitores inician el camino hacia la diferenciación, o van hacia la apoptosis. En casos de anemia o hipoxia, aumenta la secreción de Ep, aumenta en número de CFU-E en la médula ósea y su sensibilidad a la hormona (posiblemente por un aumento de la densidad de receptores de alta afinidad). Como consecuencia, un número mayoritario de progenitores van hacia la diferenciación eritroide. Si hay hiperoxia, o en casos de hipertransfusión por ejemplo, disminuye la secreción de Ep, disminuye el número de CFU-E y su sensibilidad a Ep, y un número mayoritario de los mismos van hacia la apoptosis(71).

### **INTERACCIONES HORMONALES, ENTRE CITOQUINAS, Y FARMACOLÓGICAS EN LA ERITROPOYESIS.**

La Ep es el factor primario en la proliferación y diferenciación de las células eritroides. Su falta, como en la IRC o en el estado anéfrico, determina la aparición de una anemia hipo-

crónica, normo o microcítica de evolución progresiva, finalmente incompatible con la vida, salvo la aplicación de medidas terapéuticas adecuadas. Pero aún así no es el único factor en la regulación de la producción de los glóbulos rojos.

La IL3 y el CSF-GM regulan positivamente la proliferación de los BFU-E más inmaduros, pero no actúan sobre la diferenciación terminal de los progenitores eritroides. Otros 2 factores, el SCF (“stem cell factor, c-kit ligand”) y la IL6 parecerían actuar, también positivamente, a niveles aún más precoces de la eritropoyesis (4, 72).

Otros factores también parecen ejercer un efecto directo o indirecto en la regulación de la eritropoyesis. Por ejemplo, ha sido identificada una linfoquina, obtenida de una línea celular de linfoblastos T, llamada EPA (“erythropoiesis promoting activity”), actividad promotora de la eritropoyesis, que incrementa la proliferación eritroide “in vitro”, y se presume también “in vivo”, aunque su mecanismo se desconoce. Otro factor fue hallado en el medio condicionante de células esplénicas, de naturaleza proteica, PM 20.000 daltons, designado EpLA (“erythropoietin-like activity”), que actúa con menor actividad que la Ep sobre los CFU-E “in vitro”. Otra proteína interesante es la EDF (“erythroid differentiating factor”) que fue aislada de cultivos de una línea celular de leucemia humana que produce una forma de eritroleucemia en ratas. En medios semisólidos este factor potencia los efectos de la Ep sobre los CFU-E. Del intestino fetal bovino fueron aislados varios péptidos. 2 de ellos, designados como eritrotropinas, sobre todo la eritrotropina II, producen un efecto eritropoyético ya que inducen un incremento de la incorporación de timidina en precursores eritroides fetales hepáticos (4, 6).

También han sido detectados factores de regulación negativos de la eritropoyesis. En tal

sentido están involucrados, el TNF- $\alpha$  (“tumor necrosis factor”- $\alpha$ ), la IL1, el IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) y el TGF- $\beta$  (“transforming growth factor”- $\beta$ ), citoquinas que se producen en los procesos inflamatorios agudos y crónicos y en enfermedades degenerativas. Estas citoquinas inhiben la producción de Ep renal y también la proliferación de los progenitores eritroides de la médula ósea. Esta parece ser la patogenia de la anemia, conocida como **anemia hipoproliferativa de enfermedades crónicas**, que se observa en enfermedades como la artritis reumatoide, en graves infecciones crónicas, o en enfermedades oncológicas de larga evolución, en el SIDA y en quemaduras de gran extensión y explica el eficaz efecto terapéutico de la administración de Ep que corrige este tipo de anemia y puede mejorar la calidad de vida de estos pacientes (73).

Los factores mencionados no son los únicos agentes que interactúan en la eritropoyesis. Numerosas hormonas y autacoides también han demostrado intervenir en la modulación de la proliferación eritroide.

**La testosterona y esteroides androgénicos** relacionados demostraron poseer acciones eritropoyéticas. Ha sido postulado que su mecanismo de acción se relaciona con un incremento de la producción renal de Ep o con un efecto directo sobre los progenitores celulares eritroides, o ambas cosas. Anteriormente, nosotros demostramos que la testosterona estimula la producción de Ep en riñones posthipóxicos de perro, aislados y perfundidos por 6 horas (74). Además, en ratas infundidas con testosterona, via i.v., en forma continua por 8 horas se observó un claro efecto eritropoyético a nivel medular, que sin embargo desaparece en ratas con nefrectomía bilateral o si se administran conjuntamente anticuerpos a la Ep (75). Estos resultados, y otros similares, parecerían indicar que la testosterona al menos parcialmente, estimula la eritropoyesis via incremento de la producción

renal de Ep. Sin embargo, éste no sería el único mecanismo en juego. Ha sido también demostrado que los esteroides androgénicos actúan, aparentemente en forma directa, sobre los progenitores eritroides medulares estimulando su proliferación (76). En los cultivos, la testosterona y los derivados del 5-H-androstano estimulan la producción de colonias eritroides. Los progenitores eritroides de la médula ósea y del bazo poseen receptores para andrógenos, que podrían desencadenar el efecto eritropoyético tras su activación. Nosotros observamos que la testosterona estimula principalmente la producción de colonias BFU-E y que el efecto es directo, por activación de su propio receptor, ya que si los progenitores celulares provienen de ratas que previamente han sido tratadas con ciproterona, un antagonista competitivo de la testosterona, el efecto desaparece completamente (77). La población celular de BFU-E, pero no la de CFU-E, se incrementa por la administración de testosterona en ratones policitemicos. Estos resultados sugieren que la testosterona y los esteroides androgénicos, modularían la eritropoyesis incrementando la proliferación de los BFU-E induciendo su entrada al ciclo celular y su diferenciación, a fin de permitir que la Ep actúe plenamente sobre la población de CFU-E, progenitores de máxima sensibilidad a la hormona (78).

Por el contrario, **los estrógenos** inhiben la eritropoyesis "in vivo", y no tienen acciones sobre la formación de las colonias eritroides (79).

**Las hormonas tiroideas, T3 y T4** estimulan la eritropoyesis in "in vivo" e "in vitro" (80, 81). Los efectos eritropoyéticos en animales de experimentación y en el hombre fueron relacionados con los conocidos efectos cabrigénicos de T3 y T4 y la acción se relacionaría con un incremento de la producción renal de Ep. Nosotros demostramos, en ratas nefrectomizadas bilateralmente sometidas a una infusión i.v. continua por 8 horas con T3 y T4,

que en estas condiciones las hormonas tiroideas estimulan directamente la eritropoyesis medular. Este efecto no fue suprimido por la administración conjunta de anticuerpos a la Ep (82). Las hormonas tiroideas también estimulan la formación de colonias eritroides BFU-E tardías y CFU-E, en los cultivos a partir de progenitores celulares provenientes de animales de experimentación y del hombre (83). En estos progenitores se demostró la presencia de receptores citosólicos y nucleares para las hormonas tiroideas (84,85). Estos hallazgos indicarían que estas hormonas también pueden ejercer efectos eritropoyéticos directos. Una interesante interacción con agonistas  $\beta$  adrenérgicos ha sido además propuesta (86), luego de observar que los efectos de las hormonas tiroideas sobre la formación de las colonias eritroides fueron suprimidos por el propanolol, antagonista  $\beta$ . Este hallazgo parecería indicar que el receptor  $\beta$  es necesario para la expresión de las acciones eritropoyéticas de T3 y T4. Nosotros también observamos que T3 estimula significativamente la formación de colonias BFU-E y CFU-E en cultivos de médula ósea de ratas (81) y que una mayor cinética proliferativa de los CFU-E fue demostrada si los progenitores eritroides medulares provienen de ratas con anemia secundaria a una IRC experimental (87). Aparentemente, estos progenitores se acumulan en la médula ósea de las ratas con IRC por la insuficiente o inadecuada secreción de Ep y generan un mayor número de colonias en los cultivos, ante el estímulo de la Ep y de T3. Otros estudios sugieren que las hormonas tiroideas ejercerían sus efectos eritropoyéticos a través de la participación de células accesorias en la médula ósea (88).

**Los glucocorticoides**, en concentraciones fisiológicas, también incrementan la formación de colonias BFU-E y CFU-E, en los cultivos (89,90). Sin embargo, la proliferación de colonias CFU-E resulta inhibida si se utilizan altas dosis (91). La presencia de receptores para los glucocorticoides fue demostrada en

progenitores eritroides (92). Nosotros observamos el efecto eritropoyético de la dexametasona en ratas normales, efecto que desaparece en ratas nefrectomizadas bilateralmente (93), lo que parece indicar la existencia de un estímulo de la producción de Ep renal. En los cultivos también observamos una mayor cinética proliferativa en respuesta a la dexametasona, si los progenitores provienen de ratas anémicas con IRC, efecto que también ocurre, como mencionamos, con Ep y testosterona (94).

Puede afirmarse que estas hormonas, andrógenos, glucocorticoides y T3-T4, modulan colaborativamente con Ep, la eritropoyesis, aunque la Ep sea el factor regulador fundamental. Es interesante destacar que las hormonas mencionadas en primer término, ejercen sus acciones activando sus receptores y que estos forman parte de una superfamilia de receptores intracelulares para hormonas esteroideas, tiroideas y retinoides, cuya activación desarrolla algunos efectos comunes. La modulación de la eritropoyesis podría ser uno de estos efectos.

Otros agentes con influencia sobre la eritropoyesis son **las prostaglandinas**. La PGE<sub>1</sub>, la PGE<sub>2</sub>, y la prostaciclina PGI<sub>2</sub> incrementan al eritropoyesis "in vivo". Sus efectos se relacionan aparentemente con un estímulo a la liberación de Ep por el riñón (95). Se ha demostrado que la contricción de las arterias renales del perro produce un marcado incremento de la producción de Ep y PGE pero si se administra previamente indometacina, inhibidor de la ciclooxigenasa, este efecto desaparece. Las Pg<sub>s</sub> estimulan la elaboración de Ep en cultivos de células mesangiales renales. Podría postularse que las prostaglandinas incrementan la oferta de O<sub>2</sub> a los tejidos por vasodilatación y estimulación de la eritropoyesis. El mecanismo por el cual las Pg<sub>s</sub> incrementan la elaboración de Ep no es bien conocido. Se ha postulado que el incremento del AMPc que producen las Pg<sub>s</sub>, es un mecanis-

mo posiblemente involucrado en el aumento de la producción de Ep (96).

**Las hormonas hipotálamo-hipofisarias** también estimulan la eritropoyesis. En tal sentido, el ACTH, TSH, GH, gonadotrofinas, prolactina y ADH producen dicho efecto, posiblemente por un estímulo previo de la producción renal de Ep (5)..

**Los agentes vasoactivos** angiotensina, noradrenalina y 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina), han demostrado estimular la producción de Ep. Nosotros demostramos que estos agentes, primariamente la angiotensina II, producen dicho efecto por una marcada disminución del flujo sanguíneo renal y la hipoxia consecutiva. (97).

## USOS TERAPÉUTICOS DE LA ERI- TROPOYETINA.

**Implicancias clínicas de la determinación de los niveles plasmáticos de Ep.** La determinación de los niveles plasmáticos de Ep puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades hematológicas que cursan con alteraciones de la producción de la hormona y para establecer la terapéutica adecuada.

En la **policitemia vera o primaria**, los niveles de Ep plasmática están reducidos o son indetectables. Por el contrario, en casos de **policitemias secundarias** el incremento de la masa globular se asocia a incrementos de los niveles de Ep.

Los niveles séricos de Ep se encuentran **elevados** en las siguientes enfermedades: anemia aplásica (pueden detectarse niveles de 800 a 15.000 mU/ml de Ep), anemia por deficiencia de hierro, algunas anemias megaloblásticas, talasemia, y algunos síndromes mielodisplásicos.

En cambio los niveles plasmáticos de Ep se encuentran **disminuidos**, absoluta o relativamente, en los siguientes padecimientos: anemia de la IRC, anemia del cáncer, anemias de graves infecciones crónicas, del SIDA, de la artritis reumatoidea, anemia de la malnutrición, de la prematuridad y anemia del hipotiroidismo.

### **Indicaciones terapéuticas actuales de la Eritropoyetina.**

#### **1. Anemia de la Insuficiencia Renal Crónica (IRC).**

La anemia de la IRC fué el primer padecimiento eficazmente tratado con Ep (35). La anemia acompaña a la insuficiencia renal cuando la función de los riñones cae por debajo del 30 %. El 90 % de los pacientes en plan de diálisis desarrolla anemia, usualmente severa, con hematocritos por debajo del 25 %, y antes de contarse con rEp un importante porcentaje debía recibir frecuentes transfusiones, con los graves inconvenientes emergentes como el desarrollo de anticuerpos citotóxicos, sobrecarga de férrica, disfunciones orgánicas, posibilidad de contagios de enfermedades infecciosas o virales (hepatitis, Sida ), alto costo. Es importante fijar pautas acerca de las condiciones que debe tener un paciente con IRC para aceptar la prescripción de Ep (7, 8).

Condiciones que deben reunir los pacientes anémicos con IRC, para ser tratados con rEpH.

1. Hematocrito menor del 30 % y Hemoglobina menor de 10 g/dl.
2. Comenzar el tratamiento 4 meses después de iniciar regularmente las diálisis. La aplicación de diálisis puede por sí corregir inicialmente la anemia .

3. Previamente debe excluirse otras causas de anemia, principalmente la ferropénica.
4. No administrar Ep a pacientes con ferritina sérica menor de 100 ug/L (algunos prefieren 200ug/L).
5. No administrar Ep a pacientes con saturación de transferrina plasmática menor del 20 %.
6. No padecer de hipertensión arterial no controlada.
7. No recibir tratamiento inmunosupresor o antineoplásico.
8. No recibir tratamiento con drogas quelantes de los metales pesados (pueden disminuir el hierro circulante).
9. No padecer de intoxicación aluminica, frecuente en pacientes dializados ya que la anemia puede ser por aluminio.
10. No padecer insuficiencia hepática.
11. No padecer infecciones graves.

#### **Evaluación de Pretratamiento con Hierro**

La causa mas común de resistencia a la Ep es la deficiencia de Fe(98). En caso de una relativa deficiencia de Fe (ferritina menor a 200 ug/L, o una saturación de transferrina menor al 15 %) se puede suplementar la dieta con sulfato ferroso, 300 mg ,1 a 3 veces por dia via oral. Si hay intolerancia se puede administrar Fe parenteral, Fe-dextran, 100 mg, i.v., 3 veces por semana postdiálisis. La administración del Fe debe continuar hasta superar los valores mencionados de ferritina y saturación de transferrina.

**Dosis de rEpH:** Las primeras dosis aprobadas por la FDA en USA fueron muy elevadas en comparación a las actuales. La Ep se administra por via i.v. o por via s.c.. Por via i.v., es usual una dosis de inducción que puede ser de 100/150 U/kg , 3 veces por semana, postdiálisis. No es conveniente producir una mejoría muy rápida de los valores hematológicos, por ejemplo no pasar de un incremento de 1 g/dl de hemoglobina, o 4 puntos del hematocrito, cada 15 dias. El desarrollo de

efectos adversos (ver mas adelante) limita la rapidez de la mejoría. Actualmente se tiende a preferir dosis menores, de 50 U/kg con una frecuencia de 3 veces por semana. O 35 U/kg, via s.c., también 3 veces por semana. Por esta via, la absorción es mas lenta y los niveles plasmáticos, aunque menos elevados son mas sostenidos. La dosis de mantenimiento se debe fijar luego de alcanzado un hematocrito de 30/33 % o un valor fde 10/11 g/dl de hemoglobina. Esta dosis es variable de enfermo a enfermo y debe ser encontrada.

La Ep ha sido también administrada, utilizando similar dosificación, para el tratamiento de la anemia en enfermos renales crónicos en la etapa previa al ingreso al plan de diálisis. De la misma manera que los enfermos anémicos en diálisis permanente, el resultado del tratamiento demuestra un aumento de la energía, del apetito, de la capacidad laboral, bienestar y mejor calidad de vida(99).

## **2. Anemia de enfermedades crónicas.**

Esta patología se define habitualmente como la anemia que aparece en pacientes con infecciones crónicas, o portadores de enfermedades inflamatorias de larga duración o en pacientes oncológicos. En esta anemia, la médula ósea es normal (no ha sido invadida por el tumor, no hay hemorragias ni hemólisis), generalmente evoluciona con hipoferremia y depósitos de Fe normales (ferritina sérica normal). Es de moderada intensidad, normocrómica y normocítica y los reticulocitos circulantes no se incrementan en proporción al grado de la anemia. Se la define como de tipo hipoproliferativa y se la puede observar en pacientes neoplásicos crónicos, con artritis reumatoide o infecciones graves como tuberculosis, piebnefritis crónica y otras(100).

La fisiopatología de esta anemia se relaciona con la presencia de varias citoquinas inhibidoras de la eritropoyesis “in vitro” e “in vivo” (73).

En tal sentido, se han demostrado niveles elevados del Factor de Necrosis Tumoral alfa,  $\alpha$ TNF, de la Interleukina 1, IL1, y del Interferon gamma,  $\gamma$ INF, en pacientes con cáncer, artritis reumatoidea, infecciones parasitarias y bacterianas, en pacientes con SIDA o con complejos relacionados con SIDA. La administración experimental de estas citoquinas a animales produce anemia. Además inhiben el desarrollo de colonias eritroides BFU-E y CFU-E en cultivos de médula ósea.

Otras citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria e inmune y que también inhiben la eritropoyesis son el  $\beta$ INF, el TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) .

La anemia de enfermedades crónicas es eficazmente tratada con rEpH, en dosis similares a las mencionadas anteriormente(101).

## **3. Anemia de Recien Nacidos Prematuros.**

Esta anemia observada con cierta frecuencia en prematuros, se debe a una deficiente producción de Ep, posiblemente por una demora en el cambio de producción de Ep, de hepática en el feto, a renal en el recién nacido. La administración de rEpH, en dosis de 250U/kg, s.c., 3 veces por semana, corrige la anemia y permite la aparición de los mecanismos normales de producción renal de Ep(102).

## **4. Anemia de Enfermedades Hematológicas Crónicas.**

En numerosas enfermedades hematológicas crónicas se observa el desarrollo de una anemia refractaria a tratamientos convencionales. Ello ocurre por ejemplo en patologías linfoproliferativas, linfomas malignos, mielofibrosis idiopática, leucemia mieloide, mieloma múltiple y en síndromes mielodisplásicos. En el último caso es habitual la presencia de otras varias citopenias, aparte de la anemia (103).

La administración de rEpH en las dosis mencionadas previamente corrige en un alto porcentaje la anemia refractaria de estas enfermedades crónicas, mejorando la calidad de vida de los pacientes. El tratamiento es generalmente bien tolerado. En los síndromes mielodisplásicos en tratamiento combinado de Ep recombinante con Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (CSF-G) produce una mejoría de la anemia y de la neutropenia(104, 105).

### **5. Anemia de la Quimioterapia Antineoplásica y del SIDA.**

La quimioterapia antineoplásica de distintos protocolos y la administración de Azidotimidina para los pacientes con SIDA, habitualmente se limita por la aplasia o hipoplasia medular o anemia aplásica que producen los tratamientos. La administración concomitante de rEpH, mejora o disminuye la reacción adversa, permite un mantenimiento de dosis mayores y determina una mejor calidad de vida de los pacientes(101, 106).

### **6. Usos de Ep para la Donación de Sangre Autóloga y para producir un aumento de la Masa Globular Roja.**

Las transfusiones de sangre, aunque bien toleradas por la mayoría de las personas, se asocian sin embargo con algunos riesgos inevitables como el contagio del SIDA, o la transmisión del virus de hepatitis, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y otras virosis. Estos riesgos han determinado que la donación de sangre autóloga para cirugías programadas sea cada vez más frecuente. Una persona normal puede donar 3 ó 4 unidades de sangre, que se conserva para su uso posterior, en un periodo de aproximadamente 4 semanas, y su hematocrito desciende a 33 %, aproximadamente. La administración de 600 U/kg de rEpH, i.v. ó s.c., 2 veces por semana durante ese periodo, permite habitualmente la

donación de las unidades sin provocar el descenso del hematocrito al tiempo de la cirugía(107).

La Ep está siendo también utilizada como una alternativa a la transfusión de sangre autóloga, en periodos perioperatorios. La Ep administrada en dosis de 600 U/kg los días 1 y 10 produce en personas normales, un marcado incremento del hematocrito, que llega al nivel máximo a las 3 semanas. En un estudio controlado, 24 pacientes tratados de esa manera incrementaron el hematocrito en 6.2 puntos a las 3 semanas, lo que corresponde aproximadamente a 2 unidades de sangre. Este incremento permite la realización de una cirugía sin transfusiones. Es importante la determinación de la ferritina sérica y la saturación de la transferrina que deben estar en niveles normales. Aún en el caso que se administre concomitantemente Fe por vía oral o i.v., los valores de la ferritina y transferrina disminuyen significativamente durante el periodo de administración de Ep, retornando a los niveles normales 2 semanas después de terminar el tratamiento con Ep.

La administración de rEpH permite también una más frecuente donación de sangre de personas donantes, portadores de grupos sanguíneos raros, lo que puede ser considerado en bancos de sangre. como una alternativa interesante(106).

La Ep ha sido usada para el tratamiento de hipotensión ortostática grave por neuropatía autonómica que cursa con un descenso de la masa globular y anemia. La administración de 50 U/kg, s.c., 3 veces por semana, durante 6 a 10 semanas, incrementa la masa globular y elimina la hipotensión ortostática (108).

Una utilización irracional de Ep se ha observado en atletas que deben realizar grandes esfuerzos físicos, ciclistas, maratonistas, corredores de cross-country y otros, quienes podrían beneficiarse con un moderado incre-

mento del hematocrito y de la masa globular. En estos casos es posible que el incremento de la masa globular, unida a la deshidratación propia del esfuerzo físico, produzca un aumento de la viscosidad sanguínea que es perjudicial para el funcionamiento muscular y lo que es más grave, capaz de producir trombosis.

### **EFFECTOS ADVERSOS DE LA ERI-TROPOYETINA.**

Los pacientes anémicos tratados con rEpH, al mismo tiempo que incrementan la masa globular, experimentan una mejoría general, una sensación de bienestar antes no observada, disminuye la fatiga y la astenia, aumenta el apetito y la capacidad laboral. Algunos pacientes mejoran su función sexual a medida que aumenta el hematocrito. No se ha detectado la formación de anticuerpos a la Ep y la necesidad de recibir transfusiones desaparece. Es decir que los efectos son en general, muy favorables para una mejor calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, la Ep también puede desencadenar efectos adversos, algunos graves (109).

Algunos pacientes padecen dolores óseos, mialgias, fiebre, dolores abdominales y síntomas de tipo gripal. También diarrea, vómitos, náuseas, cefaleas y mareos. Algunos pacientes experimentan una congestión de las conjuntivas y de la mucosa respiratoria. En general, estos efectos tienden a desaparecer con el tiempo.

Los efectos adversos más importantes son de tipo vascular (7, 110). Frecuentemente se desarrolla hipertensión arterial, sobre todo diastólica, y si el paciente ya padecía de hipertensión, que no es infrecuente, la misma tiende a agravarse debiéndose incrementarse el tratamiento instituido. El incremento de la tensión arterial parece relacionarse con el aumento de la viscosidad sanguínea por la

mayor masa globular y puede afectar al 25/30 % de los pacientes tratados con Ep.

La Ep, aparte de sus efectos sobre los progenitores eritroides, también estimula el compartimiento megakariocítico y eleva el número de plaquetas circulantes. Este efecto parece ser responsable de algunos fenómenos de trombosis observado en pacientes tratados con Ep. Durante la hemodialisis puede ser necesario establecer una terapia anticoagulante con heparina, para evitar la formación de coágulos en el acceso vascular. Otros accidentes trombóticos también han ocurrido, como trombosis coronaria, cerebral, en vasos periféricos y episodios agudos transitorios de isquemia.

Como dijimos anteriormente, los pacientes en tratamiento con Ep experimentan frecuentemente una deficiencia de Fe. Luego de varias semanas de tratamiento, aproximadamente el 40 % de ellos demuestran un descenso de los niveles normales de la ferritina sérica menos de 100 ug/L, y de la saturación de transferrina circulante a menos del 20 %. Como consecuencia el incremento de hematocrito se detiene. La administración de sulfato ferroso, vía oral, o Fe-dextran i.v., es necesaria en estos casos para continuar la administración de Ep y la mejoría hematológica.

Convulsiones y encefalopatía hipertensiva fueron también observadas en pacientes en tratamiento con Ep, durante los 3 primeros meses (99). Se relaciona aparentemente con la rapidez del incremento del hematocrito, que como dijimos debe ser lento y progresivo de tal manera de no sobrepasar un aumento de 1 g/dl de hemoglobina o de 4 puntos del hematocrito, cada 15 días. En algunas estadísticas, afecta al 5 % de los pacientes.

---

### **BIBLIOGRAFIA.**

1. Fisher, J.W. Erythropoietin: Pharmacology, Biogenesis and Control of Production. *Pharmacol. Rev.* 24: 459-508, 1972.

2. Erslev, A.J. Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* 8: 349-357, 1953.
3. Goldwasser, E. Erythropoietin and red cell differentiation. En: Cunningham, D., Goldwasser, E., Watson, J., Fox, C.F. (Eds). *Control of Cellular Division and Development*. Alan R. Liss, N.Y. pag. 147, 1981.
4. Spivak, J.L. The mechanism of action of erythropoietin: Erythroid cell response. En: J.W. Fisher (Ed.) *Biochemical Pharmacology of Blood and Blood-Forming Organs*. Springer-Verlag Berlin. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 101: 49-114, 1992.
5. Jelkmann, W. Renal Erythropoietin: Properties and Production. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 104: 139-205, 1986.
6. Krantz, S.B. Erythropoietin. *Blood* 77: 419-434, 1991.
7. Nimer, S.D. Molecular biology and hematology of erythropoietin. En : Nissenson A.R. *Recombinant human erythropoietin and renal anemia*. *Ann. Intern. Med.* 114: 402-416, 1991.
8. Adamson, J.W., Eschbach, J.W. Treatment of the anemia of chronic renal failure with recombinant human erythropoietin. *Ann. Rev. Med* 41: 349-360, 1990.
9. Mikaye, T., Kung, C.K., Goldwasser, E. Purification of Human Erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564, 1977.
10. Zucali, J.R. Sulkowski E. Purification of human urinary erythropoietin on controlled-pore glass and silicic acid. *Exp. Hematol.* 13: 833-837, 1985.
11. Dordal, M.G., Wang, F.F., Goldwasser, E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116: 2293-2299, 1985.
12. Wang, F.F., Kung, C.K., Goldwasser, E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 116: 2286-2292, 1985.
13. Gutnisky, A., Malgor, L.A., Nohr, M.L. Van Dyke, D. Collection of erythropoietin from urine of patients with anemia secondary to hookworm. *Ann. New York Acad. Sci.* 149: 564-568, 1968.
14. Espada, J. Gutnisky, A. Purificación de eritropoyetina humana. *Acta Physiol. Latinoam.* 20: 122.129, 1970.
15. Espada, J. Chemistry and purification of erythropoietin. En : Fisher, J.W. (De.) *Kidney Hormones*, vol II. Academic, London. pag. 37-71, 1977.
16. Espada, J., Brandan, N., Dorado, M. Molecular heterogeneity of human erythropoietin. *Biochim. Biophys. Acta* 359: 369-378, 1974.
17. Lukowsky, W.A. , Painter, R.H. Studies on the role of sialic acid in physical and biological properties of erythropoietin. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 50: 909-917, 1972.
18. Dubé, S., Fisher, J.W., Powell, J.S. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol. Chem.* 263: 1751-17521, 1988.
19. Recny, M.A. Structural and characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin.. *J.Biol. Chem.* 262: 17156-15163, 1987.
20. Sytkowski, A. J. Denaturation and renaturation of human erythropoietin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 143-145, 1980.
21. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudesdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jonwes, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T., Mikaye, T. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-809, 1985.
22. Powell, J.S. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6465-6469, 1986.
23. Davis, J., Arakawa, t., Strikland, T.W., Yphantis D.A. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26: 2638-2641, 1987.
24. Annable, L., Cotes, P.M., Musset, M.W. The second international reference preparation of erythropoietin, human urinary, for bioassay. *Bull WHO* 47: 99-112, 1972.
25. Erslev, A., Caro, J., Kansu, E., Miller, O. Cobbs, E. Plasma erythropoietin in polycythemia. *Am. J. Med.* 66: 243-247, 1979.
26. Rege, A . B.Brookins, J., Fisher, J.W. A radioimmunoassay for erythropoietin: serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. *J. Clin. Lab. Clin. Med.* 100: 829-843, 1982.
27. Cotes, P.M., Bangham, D.R. Bioassay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduce pressure. *Nature (London)* 191: 1065-1067, 1961.
28. Brandan, N. Cotes, P. M., Espada, J. In vitro assay of erythropoietin in fetal mouse liver cultures. II. Effects of

- human transferrin bound iron and of serum on the stimulation of incorporation of H-thymidine into DNA. *Br. J. Haematol.* 47: 469-478, 1981.
29. Dunn, C.D. Jarvis, J.H., Greenman, J.M. A Quantitative assay for erythropoietin using mouse fetal liver cells. *Exper. Hemat.* 3: 65-78, 1975.
30. Garcia, J.F., Ebbe, S.N., Hollander, H. O., Cutting, M.G., Miller, M.E., Cronkite, E.P. Radioimmunoassay of erythropoietin : circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J. Lab. Clin. Med.* 99: 624-635, 1982.
31. Lértora, J.J.L., Dargon, P. A., Rege, A.B., Fisher, J.W. Studies on a radioimmunoassay for human erythropoietin. *J. Lab. Clin. Med.* 86: 140-141, 1975.
32. Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Friend, W., Plzak, L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature (London)* 179: 633-634, 1957.
33. Zangheri, E.O., Suarez, J.R., Fernandez, F.O., Campana, H., Silva, J.C., Ponce, F.E. Erythropoietic action of tissue extracts. *Nature* 194: 938-929, 1962.
34. Fisher, J.W., Nelson, P.K., Beckman, B., Burdowski, A. Kidney control of erythropoietin production. In: *Renal Endocrinology*. Dunn, M. (Ed). William and Wilkins, pag. 142-180, 1982.
35. Eschbach J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., Adamson, J.W. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* 316: 73-78, 1987.
36. Koury, S.T. Bondurant, M.C., Koury, M.J. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524-529, 1988.
37. Lacombe, C., Da Silva, J.L., Bruneval, P. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 81: 620-629, 1988.
38. Koury, S.T. Koury, M.J. Bondurant, M.C., Caro J., Graber, S.E. Quantitation of erythropoietin producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: Correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74: 645-651, 1989.
39. Rich, I.N. Erythropoietin production: A personal view. *Exp. Hematol.* 19: 985-990, 1991.
40. Fisher, J.W. Extrarenal erythropoietin production. *J. Lab. Clin. Med.* 93: 695-699, 1979.
41. Clemons, G.K., Elverdin, J.C., Allippi, R.M., Barcelo, A.C., Stefano, J.F., Bozzini, C.E. Exocrine secretion of immunoreactive erythropoietin from the rat submaxillary gland. *Exp. Hematol.* 16: 122-126, 1988.
42. Vidal, A., Carcagno, N., Criscuolo, M., Leal, T., Allippi, R.M., Barcelo, A., Bozzini, C.E. Interference in the estimation of immunoreactive erythropoietin in mouse submaxillary gland homogenates. (Abstract). *Exp. Hematol.* 17: 160, 1989.
43. Bessis, M. L'îlot erythroblastique, unite fonctionnelle del la moelle osseuse. *Rev. Hematol.* 13: 8-11, 1958.
44. Wang, C. Q., Kodethoor, B., Lipschitz, D. A. The role of macrophages in the regulation of erythroid colony growth in vitro. *Blood* 80: 1702-1709, 1992.
45. Bauer, C. The physiology of oxygen sensing and erythropoietin formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 178: 70-71, 1994.
46. Tan, C.C., Eckardt, U., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am. J. Physiol.* 263: F474-F481, 1992.
47. Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. Regulation of the erythropoietin gene: Evidence of that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 242: 1412-1415, 1988.
48. Acker, H. Cellular Oxygen Sensors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 178: 3-12, 1994.
49. Goldberg, M.A., Gloss, G.A., Cunningham, J.M., Bunn, H.F. The regulated expression of erythropoietin by two hepatoma cell lines *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7972-7978, 1988.
50. Rodgers, G.M., Fisher, J.W., George, W.J. Increase in hemoglobin, hematocrit and red cell mass in normal mice after treatment with cAMP. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148: 380-382, 1975.
51. Hagiwara, M., Pincua, S.M., Chen, Y.L., Beckman, B.S., Fisher, J.W. Effects of dibutyl adenosine 3'-5'-monophosphate on erythropoietin production in human renal carcinoma cultures. *Blood* 66: 714-717, 1985.
52. Schooley, J.C., Malhmann, L.J. Stimulation of erythropoiesis in the plethoric mouse by prostaglandins and its inhibition by antierythropoietin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138: 523-524, 1971.
53. Hagiwara, M., Nagakura, K., Ueno, M., Fisher, J.W. Inhibitory effects of tetradecanoylphorbol acetate and diacylglycerol on erythropoietin production in human renal carcinoma cell cultures. *Exp. Cell Res.* 173: 129-136, 1987.

54. Eaves, C.J., Eaves, A.C. Fundamental Control of Hematopoiesis. En J.W. Fisher (Ed.) *Biochemical Pharmacology of Blood and Bloodforming Organs. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 101, pag. 5-31, 1992.
55. Iscove, N.N., Sieber, S., Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose concanavalin. *A. J. Cell. Physiol.* 83: 309-320, 1974.
56. Krantz, S.B., Jacobson L.O. Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. University of Chicago Press, Chicago.
57. Gregory C.J. Transient erythropoietic spleen colonies: effects of erythropoietin in normal and genetically anemic W/W<sup>v</sup> mice. *J. Cell Physiol.* 86: 1-83, 1975.
58. Goldwasser, E. The effects of Interleukin-3 on hemopoietic precursor cells. En *Normal and Neoplastic hematopoiesis*, Alan R. Liss, New York. Pag. 301-309, 1983.
59. Metcalf D., Direct stimulation by purified GM-CSF on the proliferation of multipotential and erythroid precursor cells. *Blood* 55: 138-147, 1980.
60. Iscove, N.N. The role of erythropoietin in regulation of population size and cell cycling of early and late erythroid precursors in mouse bone marrow. *Cell Tissue Kinet.* 10: 323-334, 1977.
61. Gregory, C.J., Eaves, A.C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51: 527-537, 1978.
62. Kimura, H. Hematopoiesis in the rat: Quantitation of hemopoietic progenitors and the response to iron deficiency anemia. *J. Cell Physiol.* 126: 298-306, 1986.
63. Valsecia, M., Malgor, L.A., Verges, E., de Markowsky, E.E. Effects of erythropoietic agents on kinetics of erythroid progenitor cells from marrows of rats with hypandhiperproliferative types of anemia. (Abst.) *Rev. Farmacol. Clin. Exper.* 7: 356, 1992.
64. Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A., Lodish, H. Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81: 2223-2236, 1993.
65. D'Andrea, A.D., Lodish H.F., Wong, G.G. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 57: 277-285, 1989.
66. Barber, D.L., D'Andrea, A.D. The erythropoietin receptor and the molecular basis of signal transduction. *Seminars in Hematology* 29: 293-304, 1992.
67. Noguchi, C.T., Bae, S.K., Chin, K., Wada, Y., Schechter, A.N., Hankins, D. Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood* 78: 2548-2556, 1991.
68. Malgor, L.A., Gutnisky, A., Torales, P.R., Klainer, E., Barrios, L. Blockade of the effects of erythropoietin on marrow erythroid cells, in vivo, by immune serum against erythropoietin. *Acta Physiol. Latinoam.* 23: 293-298, 1973.
69. Koury, M.J., Kelley, L.L., Bondurant, M.C. The fate of erythroid progenitor cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 718: 259-270, 1994.
70. Kelley, L.L., Koury, M.J., Bondurant, M.C., Koury, S.T., Sawyer, S.T., Wickrema, A. Survival or death of individual proerythroblasts results from different erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocytes. *Blood* 84: 2340-2352, 1993.
71. Koury, M.J., Bondurant, M.C. The maintenance by erythropoietin of viability, proliferation and maturation of murine erythroid precursor cells. *J. Cell Physiol.* 137: 65-74, 1988.
72. Metcalf, D., Johnson, G.R. Interactions between purified GM-CSF, purified erythropoietin and spleen conditioned medium on hemopoietic colony formation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 99: 159-174, 1979.
73. Jelkmann, W.E.B., Fandrey, J., Frede, S., Pagel, H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 178: 300-311, 1994.
74. Malgor, L.A., Fisher, J.W. Effects of testosterone on erythropoietin production in isolated perfused kidneys. *Am. J. Physiol.* 218: 1732-1736, 1970.
75. Malgor, L.A., Barrios, L., Blanc, C.C. Effects of testosterone on bone marrow erythroid cells of normal and nephrectomized rats. *Acta Physiol. Latinoam.* 25: 179-187, 1975.
76. Fisher, J. W., Samuels, A.I., Malgor, L.A. Androgens and erythropoiesis. *Israel J. Med. Sci.* 7: 892-900, 1971.
77. Malgor, L.A., Valsecia, M., Vergés, E., de Markowsky, E.E. Effects of testosterone on bone marrow erythroid cell kinetics. (Abst.) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 227, 1994.
78. Malgor, L.A., Valsecia, M., Vergés, E., de Markowsky E. Efectos del pretratamiento con ciproterona in vivo sobre las acciones eritropoyéticas de la testosterona in

- vitro. (Abst.) *Acta Physiol. Pharmacol. Therap. Latinoam.* 44: 158, 1994
79. Peschle, C. Erythroid colony formation and erythropoietin activity in mice treated with estradiol benzoate. *Life Sci.* 21: 1303-1310, 1977.
80. Bozzini, C.E., Niotti, H.F., Barrio Rendo, M.E. The erythropoietic actions and calorogenic effects of isomers of triiodothyronine. *Acta Physiol Latinoam.* 19: 309-316, 19
81. Valsecia, M., Malgor, L.A., Vergés, E., de Markowsky, E.E., Barrios, L. Direct effects of erythropoietic hormones on CFU-E and BFU-E colony growth. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 38: 259, 1988.
82. Malgor, L.A., Blanc, C.C., Klainer, E., Irizar, S., Torales, P.R., Barrios, L. Direct effects of thyroid hormones on bone marrow erythroid cells of rats. *Blood* 45: 671- 679, 1975.
83. Malgor, L.A., Valsecia, M., Vergés, E., de Markowsky, E.E. Demonstration of direct erythropoietic actions of T3 in bone marrow cell cultures. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. (Abst.)* 39: 85, 1989.
84. Osty, J. Characterization of triiodothyronine transport and accumulation on rat erythrocytes. *Endocrinology*, 123: 2303-2311, 1988.
85. Yoshida K., Davis, P.J. Binding of thyroid hormone by erythrocyte cytoplasmic proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 85: 1799- 1809, 1977.
86. Popovic, W.J. The influence of thyroid hormones on in vitro erythropoiesis. *J.Clin. Invest.* 60: 907-913, 1977.
87. Malgor, L.A., Valsecia, M., Vergés, E., de Markowsky, E.E. Enhancement of erythroid colony growth by triiodothyronine in cell cultures from bone marrows of anemic rats with chronic renal failure. *Acta Physiol Pharmacol. Ther. Latinoam.* (enviado a publicación), 1995.
88. Dainiak, N., Sutter, D., Krezco, S. L-triiodothyronine augments erythropoietic growth factor release from peripheral blood and bone marrow leukocytes. *Blood* 68: 1289-1297, 1986.
89. Golde, D.W., Bersch, N., Chopra, I.J., Cline, M.G. Thyroid hormones stimulate erythropoiesis in vitro- *Br. J. Haemat.* 37: 173-177, 1977.
90. Valsecia, M., Malgor, L.A., Vergés, E., de Markowsky, E.E., Barrios, L. Direct effects of erythropoietic hormones on CFU-E and BFU-E colony growth. (Abst.) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 38:259, 1988.
91. Leung, P., Gidari, A. S. Glucocorticoids inhibit erythroid colony formation by murine fetal liver erythroid progenitor cells in vitro. *Endocrinology* 108: 1787-1794, 1981.
92. Billat, C.L. In vitro and in vivo regulation of hepatic erythropoiesis by erythropoietin and glucocorticoids in the rat fetus. *Exper. Hematol* 10: 133-140, 1982.
93. Malgor, L.A., Torales, P.R., Klainer, E., Barrios, L., Blanc, C.C. Effects of dexamethasone on bone marrow erythropoiesis. *Hormone Res.* 5: 269-277, 1974.
94. Valsecia, M., Malgor, L.A., Vergés, E., de Markowsky, E.E. Kinetics of erythroid progenitor cells in cultures from bone marrow of rats with different types of anemia. Response to erythropoietic agents. (Abst.) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 38: 86, 1989.
95. Paulo, L.G., Wilkerson, R.D., Roh, B.L., George, W.J., Fisher, J.W. The effects of prostaglandin E<sub>1</sub> on erythropoietin production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 771-775, 1973.
96. Gross, D.M., Fisher, J.W. Erythropoietic effects of PGE<sub>2</sub> and 2 endoperoxide analogs. *Experientia* 36:458-459, 1980.
97. Malgor, L.A., Fisher, J.W. Antagonism of angiotensin by hydralazine on renal blood flow and erythropoietin production. *Am. J. Physiol.* 216: 563-566, 1969.
98. Koury, M.J. Investigating erythropoietin resistance. *N.Eng. J. Med.* 328: 205-206, 1993.
99. Lim, V.S., DeGowin, R.L., Zabala, D., Kirchner, P.T., Abels, R., Perry, P., Fangman, J. Recombinant human erythropoietin treatment in Pre-Dialysis patients. *Ann. Inter. Med.* 110: 108-114, 1989.
100. Means, R.T. Krantz, S.B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 80: 1639-1647, 1992.
101. Leitgeb, C., Percherstorfer, M., Fritz, E., Ludwig, H. Quality of life in chronic anemia of cancer during treatment with recombinant human erythropoietin. *Cancer* 73: 2535-2542, 1994.
102. Maier, R.F et al. (For the European multicentre erythropoietin study group). The effect of epoetin beta (recombinant human erythropoietin) on the need for transfusion in very low birth weight infants. *N. Eng. J. Med.* 330: 1173-1178, 1994.
103. Cazzola, M., Ponchio, L., Beguin, Y., Bergamaschi, G., Liberato, N.L., Fregoni, V., Nalli, G., Barisi, G., Ascarì, E. Subcutaneous erythropoietin for treatment of refractory anemia in hematologic disorders. Results of Phase I/II clinical trial. *Blood* 79: 29-37, 1992

104. Negrin, R.S., Stein R., Verdiman, J., Doherty, K., Cornwell, J., Krantz, S., Greenberg, P.L. Treatment of the anemia of myelodysplastic syndromes using recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in combination with erythropoietin. *Blood* 88: 737-743, 1993.
105. Ludwig, H., Fritz, E., Kotzmann, H., Höcker, P., Gisslinger, H., Barnas, U. Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 322: 1693-1699, 1990.
106. DaCosta, N.A., Hultin, N.B. Effective therapy of human immunodeficiency virus-associated anemia with recombinant human erythropoietin despite high endogenous erythropoietin. *Am. J. Hematol.* 36: 71-72, 1991.
107. Rutherford, C.J., Schneider, T.J., Demsey, H., Kirn, R.H., Brugnara, C., Goldberg, M.A. Efficacy of different dosing regimens for recombinant human erythropoietin in a simulated perisurgical setting: the importance of iron availability in optimizing response. *Am. J. Med.* 96: 139-145, 1994.
108. Hoeltdke, R.D., Streeten, H.P. Treatment of orthostatic hypotension with erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* 329: 611-615, 1993.
109. Erslev, A.J. Erythropoietin. *N. Engl. J. Med.* 324: 1339-1344, 1991.
110. Hambley, H., Mufti, G.J. Erythropoietin: an old friend revisited. *Br. Med. J.* 300: 621-622, 1990.