

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

# Las múltiples facetas de la eritropoyetina

► María Eugenia Chamorro<sup>1a</sup>, Romina Maltaneri<sup>1a</sup>, Daniela Vittori<sup>1a\*</sup>, Alcira Nesse<sup>2a</sup>

<sup>1</sup> Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Química Biológica.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Químicas, Universidad de Buenos Aires.

<sup>a</sup> Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, Argentina.

\* Autora para correspondencia.

## Resumen

La glicoproteína eritropoyetina ha sido por mucho tiempo conocida por su función eritropoyética en la regulación de la producción de glóbulos rojos, lo que derivó en el tratamiento exitoso de la anemia asociada a diferentes enfermedades. Sin embargo, tanto la expresión de la hormona como la de su receptor específico fueron observadas en tejidos no hematopoyéticos lo que generó, en años recientes, el desarrollo de numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* que demuestran la protección de distintos tejidos no hematopoyéticos por eritropoyetina. En este trabajo se presenta una revisión del aporte de nuestro laboratorio al conocimiento de mecanismos involucrados en la citoprotección por eritropoyetina, tales como inhibición de apoptosis y de estrés oxidativo, inducción de angiogénesis, así como comportamientos variables en un ambiente inflamatorio. La importancia de estos conocimientos radica no solo en la posibilidad de establecer nuevas estrategias terapéuticas enfocadas en la protección de distintos tejidos, sino también a evitar efectos no deseados del tratamiento.

**Palabras clave:** Eritropoyetina; Protección tisular; Apoptosis; Estrés oxidativo; Angiogénesis; Inflamación

## *The multiple roles of erythropoietin*

## Abstract

*The glycoprotein erythropoietin has long been known for its erythropoietic function in the regulation of red blood cell production, which led to the successful treatment of anemia related to different diseases. However, both the expression of the hormone and that of its specific receptor were also observed in non-hematopoietic tissues, thus leading, in recent years, to the development of numerous in vitro and in vivo experiments demonstrating protection of such tissues by erythropoietin. This review presents our laboratory's contribution to the knowledge of the mechanisms involved in the cytoprotective effects of erythropoietin, such as the inhibition of apoptosis and oxidative stress and the induction of angiogenesis, as well as a variable behaviour in an inflammatory environment. The importance of these findings lies not only in the possibility of establishing new therapeutic strategies focused on the protection of different tissues, but also in avoiding the undesired effects of the treatment.*

**Keywords:** Erythropoietin; Cellular protection; Apoptosis; Oxidative stress; Angiogenesis; Inflammation

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## As múltiplas facetas da eritropoietina

### Resumo

A glicoproteína eritropoietina é conhecida há muito tempo por sua ação eritropoiética na regulação da produção de eritrócitos, o que levou ao sucesso do tratamento da anemia associada a diferentes doenças. Contudo, tanto a expressão do hormônio quanto a do seu receptor específico foram observadas em tecidos não hematopoiéticos. Essa descoberta gerou, nos últimos anos, o desenvolvimento de inúmeros experimentos *in vitro* e *in vivo* que demonstram a proteção de diferentes tecidos não hematopoiéticos pela eritropoietina. Este trabalho apresenta uma revisão da contribuição do nosso laboratório para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na citoproteção pela eritropoietina, como inibição da apoptose e estresse oxidativo, indução da angiogênese, bem como comportamentos variáveis em um ambiente inflamatório. A importância desses conhecimentos reside não apenas na possibilidade de estabelecer novas estratégias terapêuticas voltadas para a proteção de diferentes tecidos, mas também em evitar efeitos indesejados do tratamento.

**Palavras-chave:** Eritropoietina; Proteção tissular; Apoptose; Estresse oxidativo; Angiogênese; Inflamação

## Introducción

Nuestro laboratorio surgió en el ámbito de la Cátedra de Análisis Biológicos que fuera dirigida por el Profesor Dr. Juan Miguel Castagnino hasta su retiro. En ese marco, nuestros proyectos de investigación básica se han basado siempre en interrogantes planteados en el área de la Bioquímica Clínica. En el Laboratorio de Eritropoyetina de la Fisiología Celular se han aunado conceptos de Biología y de Química, enfocando nuestras investigaciones al estudio del comportamiento de la hormona eritropoyetina (Epo).

La Epo es un factor humoral plasmático conocido por su rol esencial en la producción de glóbulos rojos. Es una glicoproteína de 165 aminoácidos que presenta ocho residuos de lisinas, dos puentes disulfuro y cuatro cadenas de hidratos de carbono con una masa molecular de 18 kDa correspondiente al esqueleto proteico que alcanza aproximadamente los 30 kDa en la molécula glicosilada (1) (2). Las células del intersticio peritubular del riñón son las principales productoras de Epo en el adulto, mientras que el hígado se transforma en un órgano secundario en esta etapa, después de haber cumplido un rol como principal órgano productor durante la vida fetal. El gen *EPO* es inducible por hipoxia. Ante una disminución en el aporte de oxígeno, se detecta la disminución en la tensión de oxígeno tisular por lo que se activa el factor de transcripción HIF-1, que estimula la síntesis de Epo. Una vez en circulación, la proteína llega hasta la médula ósea y activa a las células progenitoras eritroides tempranas BFU-E (*burst-forming units-erythroid*) y tardías CFU-E (*colony-forming units-erythroid*) a través del receptor para Epo (EpoR), estimulando la proliferación y la maduración hacia la formación de eritrocitos.

El mecanismo de acción de Epo vía el EpoR en el desarrollo eritroide ha sido exhaustivamente estudiado

a nivel fisiológico, celular y molecular. Sin embargo, numerosas investigaciones que demostraron la presencia del EpoR en otros tejidos, como el neuronal, el cardíaco y el endotelial, entre otros, sugirieron la posibilidad de roles adicionales de la Epo sobre tejidos no hematopoyéticos. Como se expondrá en esta revisión, las propiedades de la citoquina, que van más allá de la eritropoyesis, permiten augurar un importante potencial farmacológico.

La Epo fue inicialmente purificada a partir de orina de pacientes con anemia aplásica (3) y a partir del clonado del gen humano se obtuvo eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo) (4) (5). La molécula desarrollada imita perfectamente la acción fisiológica de la citoquina mediada por el EpoR homodimérico, por lo que ha sido empleada con excelentes resultados para evitar o revertir un estado anémico. Sin embargo, a la luz de nuevos estudios experimentales se postula que la Epo podría tener, en el futuro, efectos beneficiosos en diferentes situaciones fisiopatológicas, algunos de los cuales podrían ser mediados por otros receptores. Bajo esta hipótesis, se propuso a la Epo como un factor que podría ejercer diferentes funciones, como protección en enfermedades neurodegenerativas y en afecciones cardíacas, así como participación en angiogénesis y regulación del tono vascular (Fig. 1).

## Distintas funciones de la eritropoyetina

Dentro del marco de la enfermedad renal terminal, nuestros estudios para caracterizar la anemia debida al déficit de la producción de Epo por el órgano afectado, nos condujeron a investigar los mecanismos de acción de la Epo sobre células eritroides. A medida que surgían los resultados, se fueron ampliando nuestros objetivos con la inclusión de otros modelos celulares.

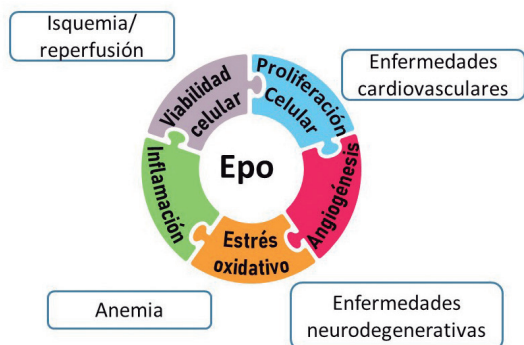


Figura 1. Funciones celulares de la eritropoyetina que pueden prevenir o modificar alteraciones fisiopatológicas que afectan a los tejidos eritropoyéticos y no eritropoyéticos.

Entre las distintas funciones que puede ejercer la Epo sobre diversos tejidos, esta revisión se centrará en la inhibición de la apoptosis, en la participación de Epo en procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, así como en la caracterización de su actividad proangiogénica.

#### Acción antiapoptótica de la eritropoyetina

La muerte celular programada o apoptosis constituye un proceso genéticamente programado y dependiente de energía, fundamental para el desarrollo fisiológico y el mantenimiento tisular. La célula posee los componentes necesarios para la regulación de la muerte celular programada y, tanto la prevención como la inducción de apoptosis, son el resultado de un balance entre señales anti y proapoptóticas intrínsecas de la célula, las cuales se encuentran controladas por factores externos. La naturaleza de dichos factores es variada: por un lado, se encuentran elementos que favorecen la supervivencia celular, como los factores de crecimiento y algunas hormonas, mientras que las citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, efectores citotóxicos y daños irreversibles en el material genético constituyen factores o eventos proapoptóticos. La inducción de este tipo de muerte celular a raíz de un desbalance bioquímico bajo condiciones patológicas, tales como síndrome autoinmune, daño isquémico o enfermedades neurodegenerativas, resulta en una disfunción tisular.

Las células apoptóticas pueden ser reconocidas por cambios morfológicos típicos que afectan el núcleo, el citoplasma y la membrana plasmática, tales como contracción celular y condensación y fragmentación de la cromatina, así como translocación de fosfolípidos de la membrana plasmática. Dichos cambios transforman a las células en “cuerpos apoptóticos”, lo que conduce a su rápida captura y fagocitosis por parte de los macrófagos, evitando así una respuesta inflamatoria.

La inducción del proceso de muerte celular programada se puede desarrollar por dos vías, extrínseca e in-

trínseca. La vía extrínseca, mediada por receptores de muerte, comienza con la activación de caspasas iniciadoras de la eventual muerte celular (6). La vía mitocondrial o intrínseca es mediada por daños a nivel de la mitocondria, cuyas causas son de naturaleza variada; entre ellas se destacan el estrés oxidativo, las radiaciones ionizantes y la alteración de la homeostasis del ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (7). La muerte de la célula depende de la localización subcelular de los miembros de la familia Bcl-2 (*B-cell leukaemia/lymphoma-2*). Entre los factores antiapoptóticos se encuentran Bcl-2, Bcl-X, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-X<sub>S</sub>, Bcl<sub>W</sub> y BAG, mientras que entre los agentes proapoptóticos se destacan Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk.

Existe evidencia que apoya la hipótesis de que la Epo actúa, fundamentalmente, en el mantenimiento de la viabilidad celular mediada por la activación del EpoR, a partir de lo cual se desencadena la transducción de señales antiapoptóticas. En diferentes modelos ha sido demostrada la actividad de la Epo en la protección tisular involucrando la activación de distintos caminos de señalización, a través de los cuales y dependiendo del origen del daño, se produciría la prevención de la muerte celular mediada por inhibidores de la apoptosis (8) (9) (10).

En ensayos *in vitro* realizados en este laboratorio, mediante la determinación de núcleos apoptóticos por tinción de Hoechst, translocación de fosfatidilserina por citometría de flujo y clivaje de la proteína PARP por *Western blotting*, se demostraron efectos neuroprotectores de Epo sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, ante la exposición a estaurosporina (inhibidor de proteína quinasa C) o a la citoquina TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), efectos que se correlacionaron con una regulación positiva de los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> (11) (12) (13) (14) (15). El factor de transcripción NF- $\kappa$ B, involucrado en la inmunidad innata, la supervivencia celular y la inflamación, es un elemento clave de las vías de activación de distintos tipos celulares que, bajo la acción de estímulos discretos, culminan con la transcripción de genes blanco. En nuestro modelo experimental de apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células neuronales, se demostró la activación y translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B aunque, llamativamente, se observaron los mismos efectos por la presencia de TNF- $\alpha$  y, más aún, ambos efectos se sumaron en el tratamiento conjunto con ambos factores (12). Este hallazgo, aparentemente inconsistente en cuanto a la actividad de TNF- $\alpha$ , puede ser explicado en parte por la detección de niveles aumentados del receptor TNFR1, el cual es capaz de estimular vías de apoptosis y neuroprotección simultáneamente (16), así como por la activación del factor NF- $\kappa$ B, postulado como nexo entre las señales celulares activadas por TNFR1 y EpoR (17). Es así que, como resultado del *cross-talk* entre ambas vías de acti-

vación, se incrementa la sensibilidad celular al efecto proapoptótico de la citoquina inflamatoria y, a la vez, la célula se hace más sensible a la acción antiapoptótica de la Epo, aumentando su resistencia a la muerte celular. En otro ensayo, el efecto antiapoptótico de Epo permitió, por activación de la vía Epo/EpoR, la inhibición de apoptosis de la línea neuronal SH-SY5Y inducida por el medio condicionado de células de la microglía EOC-2 activadas (18). Por otra parte, células de la línea eritroleucémica K562, sensibles a la acción proapoptótica de TNF- $\alpha$ , fueron protegidas por pretratamiento con Epo. Un hallazgo novedoso en el mecanismo de acción fue la participación de Epo previniendo la regulación negativa de la proteína inhibitoria de caspasa 8 c-FLIP (*FLICE-inhibitory protein*), impidiendo, de esta forma, la acción perjudicial de la citoquina proinflamatoria sobre las células eritroides durante su diferenciación (19).

Recientemente, varias revisiones han aportado y discutido información sobre resultados que sustentan el papel antiapoptótico de la Epo en distintos tejidos. En ellas se destaca el interés por la investigación de su acción en el cerebro (20) (21) (22). Estos efectos protectores implican nuevos campos de investigación y, en consecuencia, la posibilidad de desarrollar novedosas estrategias terapéuticas para el tratamiento precoz de distintas patologías.

#### Acción de la eritropoyetina frente al proceso de estrés oxidativo

El eritrocito maduro es incapaz de autorrepararse y no tiene capacidad para sintetizar proteínas. Por lo tanto, su vida útil es finita y se acorta aún más cuando el entorno de la célula se vuelve hostil o cuando la capacidad del eritrocito para hacer frente a las influencias extracelulares se ve afectada. La vida limitada de los eritrocitos implica que, como en otras células, su vida y su muerte están bien reguladas (23).

Como fuera ya mencionado, la apoptosis es un proceso controlado de autodestrucción celular al que resultan susceptibles los precursores eritroides, entre otros tipos celulares. Si bien se considera que los eritrocitos humanos maduros no pueden sufrir muerte celular programada debido a la falta de mitocondrias, núcleo y otras organelas, se ha descrito que, bajo ciertas circunstancias, pueden sufrir un rápido proceso de autodestrucción. Éste comparte varias características con la apoptosis, tales como encogimiento celular, cambios de forma, alteraciones del citoesqueleto asociadas con la degradación de proteínas y pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana celular que conduce a la externalización de fosfatidilserina (PS) (23). Para distinguir la muerte de los eritrocitos de la apoptosis de las células nucleadas, algunos autores sugirieron el término "eriptosis" (24).

No ha sido descrito ningún rol fisiológico para la Epo sobre los glóbulos rojos maduros. Sin embargo, se ha observado una asociación entre el tratamiento con rHuEpo y la susceptibilidad de los eritrocitos al *shock* hiperosmótico en pacientes hemodializados crónicos (25).

Ante una condición de estrés oxidativo se produce la alteración del delicado equilibrio entre la producción de eritrocitos y la destrucción celular. Como consecuencia, puede ocurrir la captura prematura de eritrocitos por parte de las células reticuloendoteliales, a menos que esté presente un factor que atenúe la muerte celular. En un modelo de tratamiento crónico de eritrocitos con sobrecarga de aluminio (Al) se observaron signos de externalización de PS, aumento del contenido de Ca<sup>2+</sup> intracelular y degradación de la proteína de membrana Banda 3, así como un aumento significativo de ROS (especies reactivas del oxígeno) en paralelo con la disminución del nivel de glutatión reducido (GSH). La presencia de Epo durante la exposición a Al evitó la producción de ROS y se redujeron los niveles de translocación de PS y la internalización de Ca<sup>2+</sup> (26). En coincidencia, signos semejantes fueron detectados en eritrocitos de pacientes dializados, signos que disminuyeron después de la diálisis sólo cuando los pacientes recibían Epo inmediatamente antes del tratamiento (25). Estos autores demostraron que la Epo inhibía el canal catiónico, e interfería así directamente en el proceso de eriptosis.

Teniendo en cuenta la acción antioxidante que había mostrado el tratamiento con Epo, se centró el interés en el rol protector de esta citoquina frente a los mecanismos de eriptosis desencadenados por estrés oxidativo, dado que éste es un proceso que se presenta con frecuencia en la anemia asociada a ambientes inflamatorios. En virtud de su potente capacidad oxidante y nitrante, el peroxinitrito ha sido propuesto como un importante mediador de la lesión y disfunción tisular inducida por la inflamación, y se considera una especie nitrante muy eficiente de relevancia biológica (27). En experimentos de estos autores, la incubación de eritrocitos con nitrito y peróxido de hidrógeno indujo un aumento significativo en la producción de ROS, paralelo a la disminución de GSH. Se sabe que los glóbulos rojos poseen una potente actividad antioxidante consistente en vías enzimáticas y no enzimáticas, las cuales, en conjunto, funcionan de manera efectiva para transformar las ROS en especies intermedias, sustancialmente menos reactivas (28). Los eritrocitos son importantes transportadores biológicos de GSH, factor que participa en reacciones redox por oxidación reversible de su tiol activo. Por lo tanto, se eligió este compuesto como marcador de perturbación redox celular. Se demostró que durante la eriptosis desencadenada por agentes oxidantes, las proteínas de la membrana de los eritrocitos son susceptibles a peroxidación lipídica (29). Para evaluar

una posible acción directa de la Epo, los eritrocitos fueron incubados en presencia de la hormona previamente a la inducción de estrés oxidativo. La Epo evitó el desequilibrio oxidativo (producción de ROS y peroxidación lipídica) ejercido por los agentes oxidantes presentes, efecto que fue similar al observado en presencia del compuesto antioxidante más utilizado *in vitro*, la *N*-acetilcisteína (NAC). Es un hallazgo novedoso que la hormona no sólo inhibe la apoptosis de células progenitoras eritroides, sino que también inhibe la muerte suicida de eritrocitos maduros, lo que tendría implicancias fisiopatológicas (29). Este efecto directo de la Epo sobre los eritrocitos maduros puede explicarse por el hecho de que la hormona, al igual que otras proteínas, protege a las membranas de los glóbulos rojos de la peroxidación lipídica al eliminar los radicales libres generados bajo condiciones prooxidantes.

Otro ámbito de estrés oxidativo se puede presentar en respuesta a una lesión en el sistema nervioso central cuando la activación de la microglía libera mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO), prostaglandinas, citoquinas y ROS (30) (31) (32). En un daño cerebral, como por ejemplo en isquemia cerebral, la hipoxia causa lesión de las células neuronales tanto por acción directa como por un efecto indirecto de activación de la microglía (33). Se ha informado que, durante la activación de la microglía, se produce peroxinitrito (ONOO-) por interacción entre NO y ROS. Debido a que los tratamientos actuales para las enfermedades neurodegenerativas no son efectivos, varias moléculas reguladoras que actúan como factores de desactivación de la microglía han sido objeto de considerable investigación (34). Como ya se ha mencionado, en el sistema nervioso se han encontrado receptores de Epo en varios tipos celulares, como neuronas, microglía, astrocitos y células endoteliales (35) (36). En estudios realizados en laboratorio, Epo demostró su capacidad antioxidante durante la activación de la microglía, ya que el pretratamiento de las células con Epo previno la inducción de ROS por hipoxia química en cultivos con cloruro de cobalto (18). Este efecto antioxidante de la Epo también se ha encontrado en otros modelos, como cultivos de cardiomiocitos, células endoteliales o de la línea celular PC-12 (37). Se ha descrito que la proliferación de la microglía activada es mediada por liberación de peróxido de hidrógeno (38). Por eso, la prevención por Epo de la proliferación de la microglía inducida por hipoxia se explica por la acción antioxidante de la citoquina. Los efectos dañinos de las ROS sobre las neuronas son bien conocidos y pueden superarse mediante el uso de fármacos antioxidantes. La acción antioxidante de la Epo durante la activación de la microglía puede producir un entorno menos favorable para el desarrollo de radicales libres, mostrando, así, un efecto protector frente al daño neuronal.

## Acción promigratoria de la eritropoyetina

Diversos trabajos han demostrado la actividad de la Epo sobre el tejido endotelial, en particular, su capacidad de promover la proliferación y la migración de células endoteliales maduras y de progenitores endoteliales circulantes (39) (40) (41) (42). Nuestro grupo describió la inducción de un fenotipo migratorio por Epo en cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), células endoteliales de microvasculatura (HMEC-1) y de la línea celular humana EA.hy926 (43). El efecto promigratorio de la Epo en células EA.hy926 mostró dependencia del EpoR y de la activación de una vía de transducción que involucra a las quinasas JAK2 y PI3K, así como a la fosfatasa PTP1B como molécula de cierre de la señal, como lo indican ensayos de migración por cierre de la herida (*wound healing*) en presencia de inhibidores específicos.

Recientemente, otro trabajo de este grupo mostró que el establecimiento de un ambiente proinflamatorio sensibiliza a las células endoteliales al efecto de la Epo (44). Cabe señalar que, en el adulto, las células endoteliales se encuentran en un estado de quiescencia celular, definida como un estado no proliferativo y de bajo metabolismo basal, en el cual, no obstante, continúan secretando factores endocrinos y paracrinos, además de cumplir con su función de barrera. El endotelio quiescente no presenta actividad migratoria ni expresa moléculas de adhesión leucocitaria, pero determinados estímulos, tales como la presencia de un agente patógeno, revierten el estado de quiescencia y desencadenan la activación endotelial, marcada por la adquisición de un fenotipo proangiogénico, proinflamatorio y pro-trombótico.

En células EA.hy926 expuestas a TNF- $\alpha$ , la Epo mostró actividad promigratoria aún a concentraciones inefectivas en ausencia de la citoquina proinflamatoria (44). La sinergia entre la Epo y el TNF- $\alpha$  como estímulos promigratorios en células endoteliales fue acompañada por un aumento significativo de los niveles de expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, y el consiguiente incremento de la adhesión de células monocíticas de la línea THP-1 a cultivos de las células endoteliales. La dependencia del efecto sinérgico del EpoR, así como el aumento significativo de los receptores de TNF- $\alpha$  (TNFR1 y TNFR2) en cultivos expuestos al TNF- $\alpha$  y a la Epo, ponen de manifiesto la activación de caminos compartidos entre ambas citoquinas, los cuales aumentan la sensibilidad celular a la acción de la Epo.

## Efectores de la eritropoyetina en la migración de células endoteliales

Entre los diversos mecanismos que subyacen a la movilidad celular, las ROS han sido implicadas en la respuesta a

citoquinas proangiogénicas como el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF (45). Ensayos de migración en presencia del antioxidante NAC permitieron sugerir la posible participación de ROS en el efecto promigratorio de la Epo en células endoteliales, ya que el pretratamiento con NAC impidió la inducción de la migración celular por Epo en los cultivos de células EA.hy926 (43).

La participación de ROS como intermediarias del efecto de la Epo parece ser inconsistente con lo ya mencionado en esta revisión y con datos de la bibliografía acerca de una acción antioxidante de esta citoquina en diferentes tipos celulares (18) (46) (47). A partir de esto, se realizaron ensayos a fin de determinar una posible acción dual de la Epo como molécula antioxidante y como generadora de ROS. En células EA.hy926 expuestas a peróxido de hidrógeno o privadas de suero fetal bovino por un período prolongado (tiempo necesario de incubación de los ensayos de migración por *wound healing*) la Epo disminuyó significativamente los niveles intracelulares de ROS. Sin embargo, al inicio de la activación celular, la Epo condujo a un aumento transitorio en los niveles de estas entidades químicas que podría ser indispensable para el establecimiento del fenotipo migratorio en células endoteliales (43). Esto sugiere que las propiedades prooxidantes/antioxidantes de Epo dependen de la duración del tratamiento y posiblemente de la localización subcelular de las especies reactivas producidas.

Un ambiente prooxidante podría explicar el efecto sinérgico entre el TNF- $\alpha$  y la Epo sobre la actividad migratoria de células endoteliales, ya que, de manera consistente, la presencia de antioxidantes, como NAC y ácido ascórbico, impidió la migración endotelial inducida por ambas citoquinas (44). La generación de ROS es capaz de activar NF- $\kappa$ B (48), factor de transcripción de la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR, efecto observado también en el modelo de apoptosis/antiapoptosis de células neuronales por acción de TNF- $\alpha$ /Epo. Además, la presencia de inhibidores de PI3K, mTOR y NF- $\kappa$ B (LY294002, rapamicina y ácido salicílico, respectivamente) impidió el efecto sinérgico de Epo y TNF- $\alpha$  en la migración de las células EA.hy926 (44). Tomados en conjunto, los resultados sustentan un mecanismo de activación común a ambas citoquinas, lo que explicaría su efecto sinérgico.

La generación de ROS también puede afectar la actividad de otros factores involucrados en el camino de señalización intracelular de la Epo para cumplir con su efecto promigratorio. Datos de la bibliografía muestran la inactivación de la fosfatasa PTP1B, asociada al cierre de la señal estimulada por Epo, debida a la oxidación de un residuo Cys en el sitio catalítico (49). En concordancia, en ensayos de coincubación de células EA.hy926 con Epo y TNF- $\alpha$  observamos disminución de la actividad enzimática de PTP1B, la cual fue parcialmente recuperada en cultivos pretratados con agentes antioxidantes. Además, el incremento de los niveles de

proteína PTP1B en células expuestas a Epo fue anulado por la presencia simultánea de TNF- $\alpha$  (44). Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la generación exacerbada de ROS en células expuestas a ambas citoquinas inhibe la acción de PTP1B, lo cual impide el cierre de la señal de Epo manteniendo su actividad promigratoria por un período más prolongado y produciendo, así, el efecto sinérgico de la Epo en presencia de TNF- $\alpha$ .

Por otra parte, la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa también resulta esencial para el efecto promigratorio de la Epo. En cultivos de células EA.hy926 se ha observado que la migración inducida por Epo es reducida en presencia de N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), inhibidor de la producción de óxido nítrico (43), resultado concordante con el mecanismo de otras citoquinas proangiogénicas.

El aumento transitorio de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular es otro de los mecanismos que han sido relacionados con la respuesta celular a citoquinas proangiogénicas (50). En progenitores eritroides tempranos, la Epo estimula el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular; no obstante, pocos trabajos han asociado a este catión con los efectos de la Epo en el endotelio. En cultivos primarios de células endoteliales aórticas, la incubación con Epo estimuló un aumento rápido y marcado de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, que no fue observado en medio libre de Ca<sup>2+</sup> (51). Nuestro grupo publicó resultados comparables en la línea celular EA.hy926, en la cual los quelantes EDTA y EGTA no solamente inhibieron el incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, sino que también impidieron la migración celular en ensayos de *wound healing*, mostrando la dependencia de este catión en el establecimiento de un fenotipo migratorio (43).

Considerando que el ingreso de Ca<sup>2+</sup> extracelular resulta esencial en el efecto de Epo sobre células endoteliales, la administración de antagonistas farmacológicos de este catión podría tener implicancias clínicas. Amlodipina y diltiazem, dos antagonistas de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, utilizados como antihipertensivos, previnieron el influjo de Ca<sup>2+</sup> estimulado por Epo en células EA.hy926; sin embargo, en ensayos de *wound healing* y de formación de túbulos sobre *Matrigel*, sólo la amlodipina fue capaz de impedir la actividad proangiogénica de la Epo (52). Una posible explicación del efecto diferencial de estos fármacos es que, a diferencia del diltiazem, la amlodipina no sólo bloquea el ingreso de Ca<sup>2+</sup> en células endoteliales, sino que también previene la formación de ROS, dos efectos que conjuntamente pueden inhibir la migración celular.

Diversos estudios describieron una compleja interacción entre Ca<sup>2+</sup>, movilidad celular y acuaporinas. Nuestra investigación permitió reportar por primera vez la capacidad de la Epo de inducir en células endoteliales la expresión de acuaporina-1 (AQP-1), una proteína transmembrana relacionada con el ingreso de agua a favor del gradiente osmótico. En cultivos de células EA.hy926,

tanto la inhibición con  $Hg^{2+}$ , como la anulación transitoria de AQP-1 mediante un siRNA específico impidieron el efecto promigratorio de la Epo en ensayos de *wound healing* (53). Por otra parte, la Epo incrementó la expresión de AQP-1 mediante un mecanismo dependiente del influjo de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales inhibibles por amlodipina. El pretratamiento de células endoteliales EA.hy926 con un siRNA específico para AQP-1 impidió el aumento transitorio de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular tras la exposición a Epo confirmando una estrecha relación entre AQP-1,  $Ca^{2+}$  y Epo en la motilidad celular. Estos resultados adquieren especial importancia en los tratamientos terapéuticos con Epo recombinante. La Epo que, como factor proangiogénico, representa un beneficio potencial en enfermedades cardiovasculares debido a la proliferación de capilares sanguíneos puede, por otra parte, ser responsable de efectos adversos debido a la progresión de tumores y metástasis en los tratamientos de anemia en cáncer (53).

## Conclusiones

El hallazgo de la expresión de receptores para Epo en tejidos no hematopoyéticos generó, como consecuencia inmediata, la hipótesis que adjudicaba a la Epo funciones más allá de la eritropoyética. Así, se postuló un efecto citoprotector generalizado en base a la conocida acción de la Epo sobre la viabilidad de las células progenitoras eritroides para permitirles cumplir con su ciclo de diferenciación y proliferación. Este concepto abrió la posibilidad de encontrar nuevas aplicaciones farmacológicas, dado el éxito obtenido en la terapia con Epo humana recombinante para contrarrestar la anemia asociada con enfermedades crónicas. Los resultados de numerosas investigaciones fueron sustentando esa posibilidad a la vez que despertaron alertas con respecto a efectos no deseados del tratamiento con Epo.

La presente revisión compila, en forma resumida, resultados obtenidos en nuestro laboratorio que describen efectos y mecanismos activados por Epo en distintos modelos celulares (Fig. 2). Más investigaciones son necesarias para conocer los factores que participan en la activación de los mecanismos celulares por Epo en distintos tejidos. Afortunadamente, día a día se incrementan estos estudios con la propuesta de que los efectos citoprotectores de la Epo recombinante y de sus variantes moleculares puedan constituir una alternativa para el tratamiento de distintas patologías, en particular, las asociadas a desórdenes neurodegenerativos.

## Fuentes de financiación

Las investigaciones de nuestro laboratorio fueron financiadas por la Universidad de Buenos Aires, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

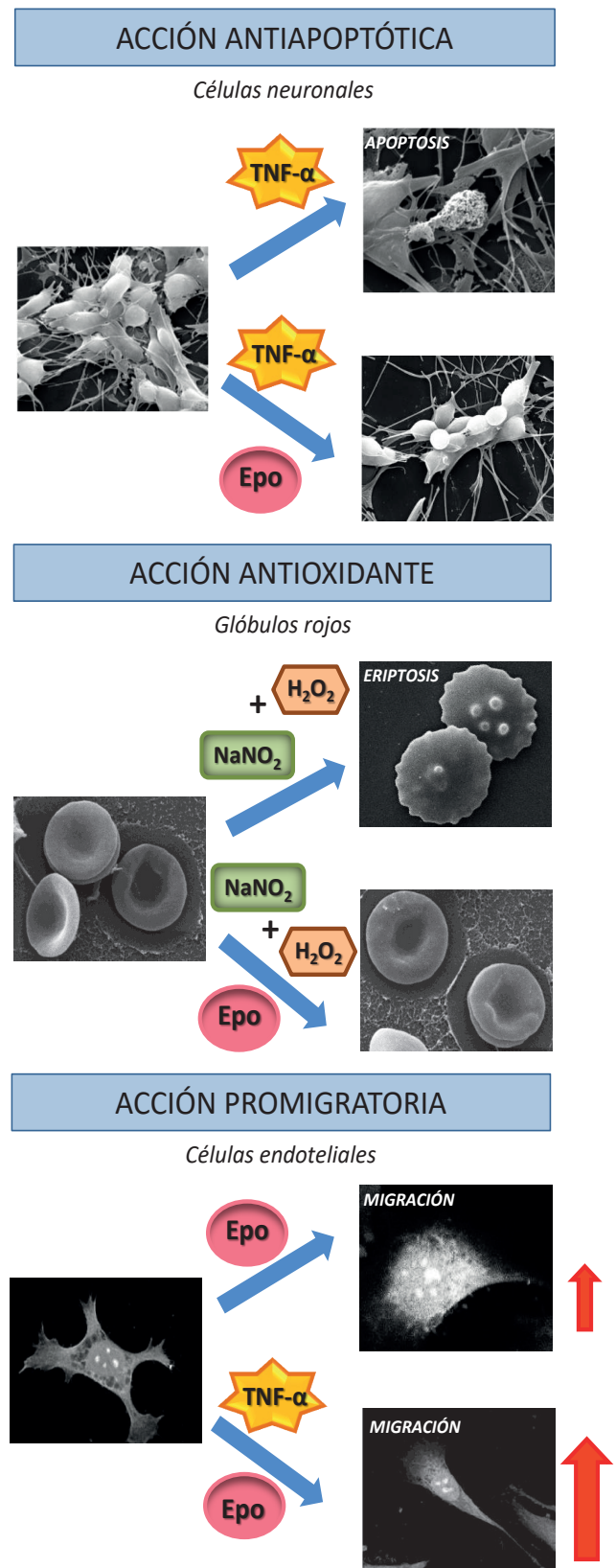


Figura 2. Mecanismos activados por eritropoyetina y sus efectos sobre distintos modelos celulares.

## Conflictos de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

## Correspondencia

Dra. DANIELA VITTORI  
 IQUBICEN - CONICET  
 Departamento de Química Biológica  
 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires  
 Pabellón II, piso 4, Laboratorio QB11, Ciudad Universitaria  
 Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina  
 Correo electrónico: dvittori@qb.fcen.uba.ar

## Referencias bibliográficas

- Schiappacasse A, Maltaner RE, Chamorro ME, Nesse AB, Vittori DC. Modification of the erythropoietin structure by *N*-homocysteinylation affects its antiapoptotic and proliferative functions. *FEBS J* 2018; 285: 3801-14.
- Bürgi M, Aparicio GI, Dorella A, Kratje R, Scorticati C, Oggero M. Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra *N*-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *Biotechnol J* 2021; 16: 2000455.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-64.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, *et al.* Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313: 806-10.
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, *et al.* Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7580-4.
- Benn SC, Woolf CJ. Adult neural survival strategies - slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 686-700.
- Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 133-47.
- Sirén A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, *et al.* Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4044-9.
- Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004; 83: 673-86.
- van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin *in vitro* and *in vivo* experimental models for hypoxia/ischemia. *Brain Res Rev* 2008; 59: 22-3.
- Pregi N, Vittori D, Pérez G, Pérez Leirós C, Nesse A. Effect of erythropoietin on staurosporine-induced apoptosis and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 238-46.
- Pregi N, Wenker S, Vittori D, Pérez Leirós C, Nesse A. TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells. *Exp Cell Research* 2009; 315: 419-31.
- Wenker S, Chamorro ME, Vota D, Callero M, Vittori D, Nesse A. Differential antiapoptotic effect of erythropoietin on undifferentiated and retinoic acid-differentiated SH-SY5Y cells. *J Cell Biochem* 2010; 110: 151-61.
- Chamorro ME, Wenker SD, Vota DM, Vittori DC, Nesse AB. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 1960-8.
- Chamorro ME, Maltaner RE, Vittori DC, Nesse AB. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is involved in the defective erythropoietic function of carbamylated erythropoietin. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 61: 63-71.
- Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel UML. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 32861-81.
- Taoufik E, Petit E, Divoux D, Tseveleki V, Mengozzi M, Roberts M, *et al.* TNF receptor I sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 6185-90.
- Wenker S, Chamorro ME, Vittori D, Nesse A. Protective action of erythropoietin on neuronal damage induced by activated microglia. *FEBS J* 2013; 280: 1630-42.
- Vittori D, Vota D, Callero M, Chamorro ME, Nesse A. cFLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *Cell Biol Int* 2010; 34: 621-30.
- Ureña-Guerrero M, Castañeda-Cabral J, Rivera-Cervantes M, Macías Vélez R, Jarero-Basulto J, Gudiño-Cabrera G, *et al.* Neuroprotective and neurorestorative effects of Epo and VEGF: perspectives for new therapeutic approaches to neurological diseases. *Current Pharm Des* 2020; 26: 1263-76.
- Vittori DC, Chamorro ME, Hernández YV, Maltaner RE, Nesse AB. Erythropoietin and derivatives: potential beneficial effects on the brain. *J Neurochem* 2021 Sep; 158 (5): 1032-57.
- Kaur D, Behl T, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Badavath VN, *et al.* Unravelling the potential neuroprotective facets of erythropoietin for the treatment of Alzheimer's disease. *Metabolic Brain Dis* 2022; 37: 1-16.
- Bosman GJ, Willekens FL, Were JM. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 1-8.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wiederm T, Huber S, *et al.* Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2005; 15: 195-202.
- Myssina S, Huber SM, Birka C, Lang PA, Lang KS, Friedrich B, *et al.* Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *J Amer Soc Nephrol* 2003; 14: 2750-7.
- Vota D, Crisp R, Nesse A, Vittori D. Oxidative stress due



- to aluminum exposure Induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1581-9.
27. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Rev Drug Discovery* 2007; 6: 662-80.
  28. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2008; 290: 1-11.
  29. Vota D, Maltaner R, Wenker S, Nesse A, Vittori D. Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents. *Cell Biochem Biophys* 2013; 65: 145-57.
  30. Hwang KY, Oh YT, Yoon H, Lee J, Kim H, Choe W, *et al.* Baicalein suppresses hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  protein accumulation and activation through inhibition of reactive oxygen species and PI 3-kinase/Akt pathway in BV-2 murine microglial cells. *Neurosci Lett* 2008; 444: 264-9.
  31. Kim JY, Kim TH, Kim SS. Anti-inflammatory effect of a human prothrombin fragment-2-derived peptide, NSA9, in EOC2 microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 779-85.
  32. Ock J, Kim S, Suk K. Anti-inflammatory effects of a fluorovinylxyacetamide compound KT-15087 in microglia cells. *Pharmacol Res* 2009; 59: 414-22.
  33. Gehrman J, Banati RB, Wiessner C, Hossmann KA, Kreutzberg GW. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 277-89.
  34. Delgado M, Ganea D. Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *FASEB J* 2003; 17: 944-6.
  35. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, *et al.* Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10526-31.
  36. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 386-92.
  37. Wu Y, Shang Y, Sun S, Liu R. Antioxidant effect of erythropoietin on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 2007; 564: 47-56.
  38. Mander P, Borutaite V, Moncada S, Brown GC. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. *J Neurosci Res* 2005; 79: 208-15.
  39. Anagnostou A, Lee E, Kessimian N, Levinson R, Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5978-82.
  40. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, *et al.* Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Blood* 1999; 93: 2627-36.
  41. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, *et al.* Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-6.
  42. Kriška J, Solár P, Varinská L, Solárová Z, Kimáková P, Mojžiš J, *et al.* Human erythropoietin increases the pro-angiogenic potential of A2780 ovarian adenocarcinoma cells under hypoxic conditions. *Oncol Reports* 2013; 30: 1455-62.
  43. Maltaner R, Chamorro ME, Schiappacasse A, Nesse A, Vittori D. Differential effect of erythropoietin and carbamylated erythropoietin on endothelial cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 85: 25-34.
  44. Chamorro ME, Maltaner R, Schiappacasse A, Nesse A, Vittori D. Role of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the increased sensitivity of endothelial cells to a promigratory effect of erythropoietin in an inflammatory environment. *Biol Chem* 2020; 401: 1167-80.
  45. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulán G, *et al.* Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Amer J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C695-C704.
  46. De Beuf A, Hou XH, d'Haese PC, Verhulst A. Epoetin delta reduces oxidative stress in primary human renal tubular cells. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2020: 395785.
  47. Biswal MR, Wang Z, Paulson RJ, Uddin RR, Tong Y, Zhu P, *et al.* Antioxidant and cytoprotective potential of erythropoietin in mitigating oxidative stress-induced changes in the retinal pigment epithelium. *Antioxidants* 2021; 10: 842.
  48. Haddad JJ, Abdel-Karim NE. NF- $\kappa$ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: therapeutic pattern or pseudoregulation? *Cell Immunol* 2011; 271: 5-14.
  49. van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* 2003; 423: 773-7.
  50. Faehling M, Kröll J, Föhr KJ, Fellbrich G, Mayr U, Trischler G, *et al.* Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole. *FASEB J* 2002; 16: 1-29.
  51. Vogel V, Kramer HJ, Bäcker A, Meyer-Lehnert H, Jelkmann W, Fandrey J. Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells. *Amer J Hypert* 1997; 10: 289-96.
  52. Maltaner R, Schiappacasse A, Chamorro ME, Nesse A, Vittori D. Participation of membrane calcium channels in erythropoietin-induced endothelial cell migration. *Eur J Cell Biol* 2018; 97: 411-21.
  53. Maltaner R, Schiappacasse A, Chamorro ME, Nesse A, Vittori D. Aquaporin-1 plays a key role in erythropoietin-induced endothelial cell migration. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2020; 1867: 118569.

**Recibido: 31 de mayo de 2022**

**Aceptado: 27 de enero de 2023**