

50º Aniversario de *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*

Eritropoyetina como agente eritropoyético y no eritropoyético: consideraciones terapéuticas*

*Erythropoietic and non-erythropoietic functions of erythropoietin: therapeutic considerations**Eritropoietina como agente eritropoiético e não eritropoiético: considerações terapêuticas*► Daniela Vittori¹, María Eugenia Chamorro¹, Alcira Nesse²

¹ Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Química Biológica.

² Doctora en Ciencias Químicas, Universidad de Buenos Aires.

* 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.



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

La producción de glóbulos rojos es controlada continuamente para suplir la desaparición de las células envejecidas y garantizar un aporte de oxígeno adecuado a todo el organismo. La citoquina pleiotrópica eritropoyetina (Epo), originalmente definida por su rol en la eritropoyesis para prevenir la muerte programada de progenitores eritroides en la médula ósea, ha demostrado un rol antiapoptótico protector sobre diversos tejidos no hematopoyéticos. A la reconocida eficacia del tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo) para contrarrestar la anemia que acompaña a patologías muy diversas, se agregan algunos aspectos que impiden lograr los resultados terapéuticos esperados, ya sea por resistencia al tratamiento o por el desarrollo de efectos adversos. Con el fin de prevenir estos efectos, así como reducir las dosis de rhuEpo en tratamientos crónicos se han desarrollado nuevos agentes que presentan modificaciones estructurales de la Epo, o bien alteraciones en las propiedades/actividad de la Epo nativa. Dado que, actualmente, los resultados sobre los efectos de la Epo sobre morbilidad/mortalidad en diversas patologías no están suficientemente claros, nuevas investigaciones serán útiles para resolver dudas sobre la efectividad de la eritropoyetina y sus derivados o agentes alternativos con el fin de proveer bases sólidas para el desarrollo de ensayos clínicos concluyentes.

Palabras clave: eritropoyetina * resistencia a eritropoyetina * efectos adversos * eritropoyetina carbamilada * factores estimulantes de eritropoyesis * vías de señalización

Summary

Erythropoietin (Epo), the cytokine required for promoting erythropoiesis through the proliferation and differentiation of erythroid cells, has been reported to act as a pleiotropic cytokine beyond the hematopoietic system. In contrast with the potentially beneficial effects attributed to recombinant human erythropoietin (rhuEpo), research has advanced to indicate that mor-

tality and morbidity rates are increased in some patient groups when treated with rhuEpo. Some cardiac and systemic conditions may predispose to adverse events, and other factors, such as proinflammatory agents, may lead to resistance to erythropoietin treatment. Many compounds are currently under investigation in order to avoid these unwanted effects and to reduce the rhuEpo dose during chronic therapies. They are either erythropoiesis-stimulating agents different from erythropoietin or structurally modified erythropoietins with altered properties and activities. In recent reports, contrasting data have raised several concerns regarding the effectiveness of erythropoietin treatment to prevent adverse events. Therefore, much investigation is needed to provide a solid basis for the development of conclusive clinical trials.

Keywords: *erythropoietin * resistance to erythropoietin * adverse effects * carbamylated erythropoietin * erythropoietic stimulating factors * signalling pathways*

Resumo

A produção de glóbulos vermelhos é controlada continuamente para suprir o desaparecimento das células envelhecidas e garantir uma contribuição de oxigênio adequado a todo o organismo. A citocina pleiotrópica eritropoietina (Epo), originalmente definida por seu papel na eritropoiese para prevenir a morte programada de progenitores eritroides na medula óssea, tem demonstrado um papel anti-apoptótico protetor sobre diversos tecidos não hematopoiéticos. Adicionam-se à reconhecida eficácia do tratamento com eritropoietina recombinante humana (rhuEpo), para contra-arrestar a anemia que acompanha patologias muito diversas, alguns aspectos que impedem alcançar os resultados terapêuticos esperados, quer seja por resistência ao tratamento ou pelo desenvolvimento de efeitos adversos. Com o fim de prevenir estes efeitos, bem como reduzir as doses de rhuEpo em tratamentos crônicos foram desenvolvidos novos agentes que apresentam modificações estruturais da Epo, ou então alterações nas propriedades/atividade da Epo nativa. Devido a que, atualmente, os resultados sobre os efeitos da Epo sobre morbidade/mortalidade em diversas patologias não estão suficientemente claros, novas pesquisas serão úteis para resolver dúvidas sobre a efetividade da eritropoietina e seus derivados ou agentes alternativos visando a fornecer bases sólidas para o desenvolvimento de ensaios clínicos concludentes.

Palavras-chave: *eritropoietina * resistência a eritropoietina * efeitos adversos * eritropoietina carbamilada * fatores estimulantes de eritropoiese * vias de sinalização*

Introducción

La eritropoyesis es un complejo proceso multifásico que involucra la diferenciación de células *stem* hematopoyéticas a glóbulos rojos maduros. Este proceso es regulado por diversos factores de crecimiento e inhibidores. El conocimiento actual indica que la hormona glicoproteica eritropoyetina (Epo) asegura la supervivencia de las células encomendadas hacia el linaje eritroide para que puedan cumplir con su programa de proliferación y diferenciación (1)(2), garantizando, de esta manera, un balance adecuado de glóbulos rojos.

La Epo pertenece filogenéticamente a la familia de las citoquinas, entre las que se encuentran también la somatotrofina, la prolactina, las interleuquinas 2-7 y los llamados “factores estimulantes de colonias” G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*).

No existe Epo preformada; su síntesis se regula por los niveles de oxígeno tisular, proceso en el que cumple un rol primordial el factor de transcripción HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) que regula la expresión de los genes implicados en la eritropoyesis en respuesta a los cambios en la presión parcial de oxígeno. En el humano, el 85-90% de la hormona se forma en el riñón, en el endotelio de los capilares situados alrededor de los canales nefríticos y al 10-15% en el hígado, siendo este último el sitio predominante durante la vida fetal. Una vez sintetizada, la Epo circula hasta la médula ósea donde cumple su función como “factor de crecimiento” sobre sus células *target*. La acción biológica de la Epo ocurre a nivel de las células progenitoras eritroides tempranas BFU-E (*burst-forming units-erythroid*) y tardías CFU-E (*colony-forming units-erythroid*) debido a que, en formas eritroides más maduras, va disminuyendo el número de receptores de la hormona. El hallazgo de la síntesis de Epo, así como la expresión de sus receptores específicos en células de diferentes tejidos suministra evidencia de sus funciones autocrina, paracrina y endocrina.

ESTRUCTURA DE LA ERITROPOYETINA

El gen de la Epo codifica una proteína de 193 aminoácidos (Fig. 1). Una modificación post-traduccional genera un corte de 27 aminoácidos terminales y la acción de una carboxipeptidasa provoca la pérdida de la arginina C-terminal (residuo 166). A partir de estas dos modificaciones se obtiene una proteína de 165 aminoácidos que contiene dos puentes disulfuro, los cuales unen residuos de cisteína en posiciones 7-161 y 29-33. Cuatro cadenas de hidratos de carbono –tres residuos N-glicosídicos unidos a N-asparaginas (residuos 24, 38 y 83) y un residuo O-glicosídico unido a O-serina (residuo 126)– constituyen, aproximadamente, 40% de la masa molecular (3). Las cadenas laterales están formadas por los monosacáridos manosa, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico o siálico. El grado de glicosilación influye diversos procesos biológicos, tales como reconocimiento celular, actividad, vida media y además, favorece la solubilidad, minimiza la agregación y protege a la proteína de la degradación por radicales libres (4). La hormona activa de 165 aminoácidos tiene una masa molecular de, aproximadamente, 34 kDa si esta glicosilada y 18,4 kDa si se excluyen los hidratos de carbono.

Contrariamente a los aminoácidos constantes de la molécula de Epo, las estructuras de azúcares son variables, generando lo que se describe como microhetero-

geneidad de la molécula que se presenta no sólo en la molécula natural sino también en la proteína recombinante humana. Las isoenzimas derivadas de esta heterogeneidad difieren entre sí por la secuencia variable de los monosacáridos que conforman las cadenas laterales y por el contenido variable de ácido N-acetilneuramínico.

ORIGEN DE LA ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA

En 1906, Carnot y Deflandre (5) realizaron un ensayo en el cual, luego de haber inducido un sangrado en conejos, se recolectaba plasma de los mismos y se lo inyectaba a conejos no tratados. En éstos se observó un incremento notorio en el número de reticulocitos sugiriendo la existencia de un elemento humoral al que denominaron *hemopoietine*. Dicha hipótesis fue confirmada por estudios posteriores (6) (7), denominándose “eritropoyetina” a la sustancia que regulaba la producción de glóbulos rojos maduros.

La obtención de Epo humana con alto grado de pureza a partir de orina y plasma (8) facilitó el conocimiento de su secuencia aminoacídica. Después de la identificación, aislamiento y clonación del gen de la Epo humana, varios estudios impulsaron la obtención de esta hormona de forma recombinante mediante técnicas de ingeniería genética, lográndose insertar el gen clonado de Epo humana en células de mamífero. Así, se

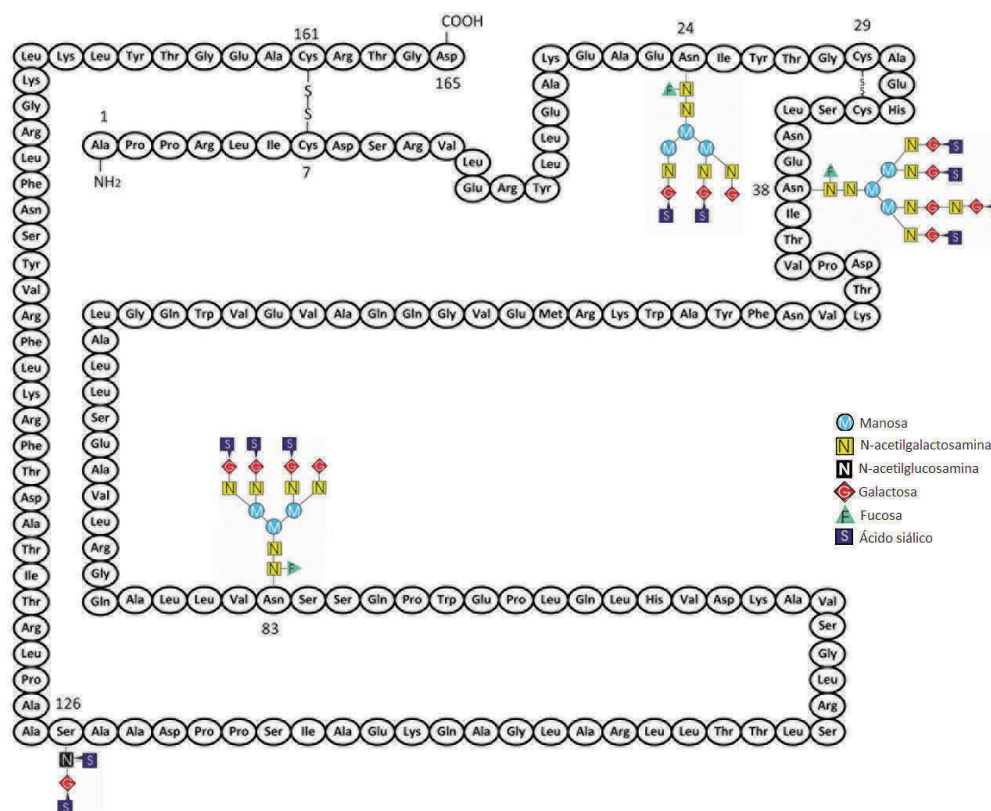


Figura 1. Estructura de la eritropoyetina.

obtuvieron líneas celulares productoras, a gran escala, de Epo recombinante humana (rhuEpo) con una potente actividad biológica (9) (10). Las pruebas realizadas exitosamente para corregir la anemia en pacientes renales (11), influyeron para que en 1989 la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos de Norteamérica aprobara la forma sintética Epogen (*Amgen*), para el tratamiento de la anemia de pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos o no a diálisis.

La preparación de rhuEpo ha permitido la provisión de cantidades adecuadas para el uso clínico terapéutico y para completar estudios químicos y biofarmacéuticos. Al asegurar la supervivencia y estimular la proliferación y diferenciación de las células progenitoras, la Epo garantiza un balance adecuado de la masa eritroide. De ahí se desprende el éxito que ha tenido su uso para el tratamiento de la anemia, no sólo en los pacientes con insuficiencia renal, como se indicara en los comienzos de su uso farmacológico. En efecto, la terapéutica con rhuEpo se ha extendido a otros pacientes con anemia de etiologías tan diversas como síndromes mielodisplásicos, cáncer y, en general, anemia de la enfermedad crónica (ACD, *anemia of chronic disease*) (12-17).

ERITROPOYETINA: MÁS QUE UN PROMOTOR DE ERITROPOYESIS

El hallazgo no sólo de la expresión de receptores de Epo (REpo) sino también de la síntesis de Epo en diversos tipos celulares no hematopoyéticos sugirió que el rol de la hormona se extendería más allá del estímulo eritropoyético (18) (19). La actividad de protección de

Epo sobre tejidos neuronal, renal y cardíaco observada en modelos experimentales y en ensayos preclínicos ha sido revisada e informada en varias publicaciones (20-25). La elevada eficacia de la Epo observada en estos modelos depende de la activación de múltiples caminos de protección que incluyen inhibición de apoptosis, restauración de la autorregulación vascular, atenuación de respuestas inflamatorias e incremento de funciones reconstituyentes.

MECANISMO DE ACTIVACIÓN CELULAR POR ERITROPOYETINA

La acción de la Epo es mediada por la unión de la hormona a su receptor específico localizado en la membrana celular, lo cual desencadena una cascada de señales cuya transducción deriva en la regulación de ciertos genes.

Al interactuar con Epo el receptor conforma un homodímero con dos subunidades idénticas, el cual activa una quinasa acoplada al REpo, vía transfosforilación (Figura 2). El mecanismo de señalización de Epo/REpo depende, principalmente, de la activación de dos familias de proteínas intracelulares, las Jaks (*Janus quinazas*) y las STATs (*signal transducers and activators of transcription*), llamada vía Jak-STAT. La quinasa Jak2 activada y asociada constitutivamente al REpo fosforila los ocho residuos de tirosina que se encuentran en el dominio distal citoplasmático del receptor. A su vez, estos residuos de fosfotirosina proveen sitios de anclaje para proteínas de señalización intracelular que contienen dominios con homología Src (SH2), tales como fosfati-

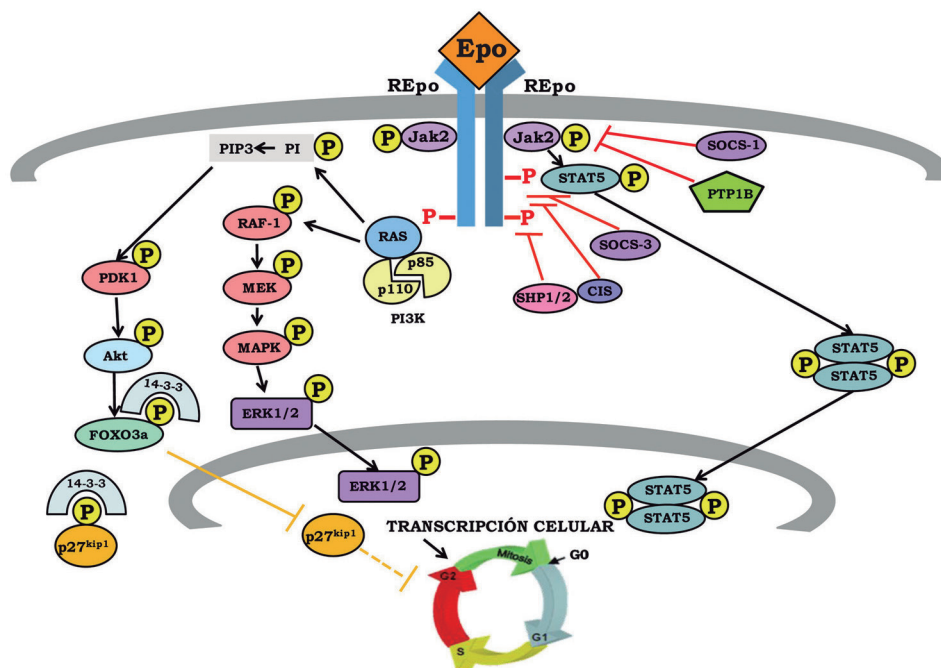


Figura 2. Vías de señalización activadas por eritropoyetina.

dilinositol 3-quinasa (PI3K), proteína mitógeno activada (MAP) y el transductor de señales y activador de la transcripción STAT5. Esta activación celular da lugar a la modulación de la expresión de diversos genes.

En el camino de señalización relacionado con el crecimiento celular, Epo, vía PI3K/Akt, controla la fosforilación del factor de transcripción FOXO3a, provocando su retención en el citoplasma y su impedimento para trasladarse al núcleo. Esto genera la disminución de la transcripción de los genes diana y de sus productos de expresión, normalmente activados por FOXO3a, entre ellos el factor inhibitorio de la proliferación celular p27^{kip1} (26).

Distintos mecanismos, tales como la internalización y degradación del REpo mediada por proteasoma, así como la finalización de señales intracelulares por la activación de fosfatasa contribuyen a modular la respuesta de la Epo. Walrafen *et al.* (27) han sugerido una rápida degradación del REpo activado por ubiquitinación y la intervención de dos sistemas proteolíticos que, actuando secuencialmente, remueven parte del dominio intracelular en el proteasoma y degradan el remanente del complejo hormona-receptor en los lisosomas.

Dado que los procesos de fosforilación son mecanismos post traduccionales inducidos por la activación del REpo, la defosforilación es necesaria para regular negativamente esta actividad. La activación de fosfatasa, tales como las SHP, CIS/SOCS (28) y proteínas tirosina-fosfatasa (PTPs), constituye un evento crucial para mantener el balance de la homeostasis celular. Las PTPs son enzimas que catalizan la defosforilación de residuos tirosina. En particular, PTP1B induce una retroalimentación recíproca con Epo, modulando, de esta forma, la señalización activada por la interacción Epo/REpo (29) (30).

EFFECTOS SECUNDARIOS Y RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ERITROPOYETINA

Con relación a la reconocida eficacia del tratamiento con rhuEpo para el manejo de la anemia, se conocen, actualmente, algunos aspectos que impiden lograr los resultados esperados.

La actividad proangiogénica de la Epo, si bien estaría relacionada con un efecto cardioprotector, podría constituir un factor de riesgo en presencia de células tumorales. En estudios clínicos en pacientes con cáncer, el tratamiento con Epo se asoció con significativos aumentos de la mortalidad (31) (32).

Existe preocupación no sólo por la acción proliferativa de la Epo que tiene efectos negativos en algunos tipos de cáncer sino, principalmente, porque, a pesar de recibir dosis muy elevadas de rhuEpo, a algunos pacientes renales bajo tratamiento de diálisis crónica les resulta difícil superar la baja respuesta al tratamiento (33). Aún después de la corrección de algunos facto-

res como depleción de depósitos de hierro, diálisis inadecuada y deficiencia de vitaminas y nutrientes, entre 10-20% de estos pacientes desarrollan baja respuesta al tratamiento y sufren una anemia persistente y, muchas veces, severa (34). Este hecho resulta clínicamente importante porque la resistencia a la rhuEpo está asociada al aumento de riesgo de mortalidad (35) (36).

Además de los factores mencionados, los cuales pueden ser modificados para adecuar los tratamientos, existen varios mecanismos que podrían contribuir a la resistencia a la Epo endógena y exógena, especialmente, en pacientes cuyas patologías de base son acompañadas por procesos inflamatorios crónicos. Esto ha sido atribuido al aumento de la actividad de monocitos y linfocitos T, con la concomitante producción de citoquinas proinflamatorias, las que, localmente en médula ósea, bloquearían la acción de la rhuEpo (37). Las asociaciones y/o interferencias entre los efectos de citoquinas y de la Epo son probables si se tiene en cuenta que la activación de factores, como NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), está involucrada tanto en las respuestas inflamatorias aguda y crónica como en la eritropoyesis (38).

Otro factor, cuya expresión es estimulada en procesos inflamatorios, es la hepcidina. Esta proteína activa la degradación de ferroportina, principal proteína exportadora de hierro desde las células. La consecuente acumulación de hierro en enterocitos, hepatocitos y macrófagos contribuye a disminuir la biodisponibilidad del hierro, causando el desarrollo de anemia.

Como ya fuera mencionado, la activación del receptor por la unión de Epo, esencial para poner de manifiesto su función hematopoyética y antiapoptótica, es transitoria, ya que la unión ligando-receptor es rápidamente desactivada por mecanismos de regulación negativa que actúan para terminar las señales desencadenadas. El hecho de que la fosforilación reversible de residuos de tirosina constituya un evento crítico en la vía de señalización de Epo subraya el rol importante de las fosfatasa en la terminación de las señales. El hallazgo de niveles aumentados de SHP-1 en pacientes resistentes a la terapia con Epo (39), sugiere que esta regulación positiva de la fosfatasa podría atenuar prematuramente la cascada de señalización y contribuir a la hiporespuesta a la Epo. Las fosfatasa han sido asociadas tanto a la producción de factores proinflamatorios como a la participación en una respuesta celular a los mismos. En ese contexto, la inducción de distintas fosfatasa por citoquinas proinflamatorias, como IFN-, IL-2, IL-6 o TNF- α , estaría involucrada en la resistencia al tratamiento con Epo en enfermedades asociadas a procesos inflamatorios (40-43).

Los mayores beneficios clínicos de la terapia con Epo están asociados al tratamiento de la anemia, disminuyendo la necesidad y el riesgo de las transfusiones sanguíneas aunque, a la vez, han sido detectadas importantes complicaciones, tales como incidencia de tromboembolismo, hi-

pertensión, alteraciones reológicas y retinopatía diabética (34) (44) (45). En contraste con los resultados promisorios que muestran efectos antiapoptóticos de Epo en enfermedades cardiovasculares, obtenidos en modelos animales, los observados en ensayos clínicos sugieren que la administración de agentes estimulantes de la eritropoyesis no parece asegurar siempre un efecto protector sobre el sistema cardiovascular (46) (47).

La administración crónica de Epo a pacientes anémicos con disfunción renal, asociada a hipertensión, fue inicialmente adjudicada al aumento del hematocrito aunque, posteriormente, se describió una respuesta dependiente de la vasoconstricción, involucrando un aumento del calcio citoplasmático, alteración del factor vasodilatador óxido nítrico (NO) y aumento de endotelina (48).

Aunque aún no existe suficiente información para asegurar una relación entre la administración de rhuEpo y los efectos secundarios adversos, resultados de ensayos clínicos sugieren que la mayor asociación se establece en tratamientos con dosis elevadas de Epo (49) (50), modalidad incorporada para reducir la frecuencia de administración o para revertir la anemia refractaria. Al ampliarse el espectro terapéutico de la rhuEpo, ya no sólo es importante su habilidad para tratar la anemia de enfermedades crónicas, sino principalmente su actividad como agente protector de tejidos no hematopoyéticos. Así, adquiere relevancia la dosis utilizada, ya que la citoprotección de algunos tejidos, como el sistema nervioso central, requiere dosis mucho más elevadas que las empleadas en el tratamiento de la anemia (51). En estos casos la permanencia de la actividad promotora de la eritropoyesis que posee la Epo resulta contraproducente, ya que induce un aumento innecesario y, por ello, potencialmente perjudicial de la masa eritrocitaria en pacientes no anémicos (52).

ACCIÓN DIFERENCIAL DE LA ERITROPOYETINA MODIFICADA POR CARBAMILACIÓN

Debido al uso farmacológico de la Epo, actualmente en vías de expansión hacia la protección de tejidos *target* no hematopoyéticos, en los últimos años se intensificó la búsqueda de estructuras de Epo modificadas químicamente, de manera tal de alterar sus propiedades, ya sea su vida media y/o su funcionalidad. La entidad que ha merecido, hasta ahora, mayor investigación es la Epo carbamilada en los residuos lisina de la cadena proteica (cEpo) (53) proceso que altera no sólo la conformación molecular sino también su actividad biológica. Los estudios realizados hasta el momento utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* con animales de experimentación, indican que la cEpo mantiene su actividad neuroprotectora y carece de actividad eritropoyética (53-61), lo que resultaría de gran beneficio en el tratamiento de pacientes no anémicos con enfermedades neurodegenerativas, abriendo de esta manera, un camino promisorio para

la aplicación de la acción farmacológica de la hormona.

Los resultados obtenidos por sus autores en estudios comparativos entre Epo y cEpo confirmaron que las modificaciones moleculares introducidas en la molécula de Epo por el proceso de carbamilación generan la pérdida de su habilidad para mantener la supervivencia de las células con capacidad de diferenciación eritroide pero no afecta su acción neuroprotectora mostrando, en este caso, una actividad y mecanismo de acción similar al de la Epo nativa (59).

La identificación de actividades de Epo relacionadas con el estímulo eritropoyético o con la protección de tejidos fuera de la médula ósea sugirió la participación de distintos receptores de membrana. La asociación demostrada entre el REpo y la subunidad β común a receptores de IL-3, IL-5 y GM-CSF (Rbc o CD131) (62), la expresión de Rbc en células del sistema nervioso y de otros órganos, así como el comportamiento de ratones knockout para Rbc, apoyaron la hipótesis de que la protección tisular por Epo sería mediada por un complejo heterodimérico entre una subunidad del REpo y la subunidad Rbc (63).

Mediante ensayos competitivos y de inhibición por anticuerpos, tanto en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y como en las células con capacidad de diferenciación eritroide TF-1, se observó que la Epo puede actuar a través tanto del receptor homodimérico (REpo/REpo) como del heterodimérico REpo/R β c, mientras que cEpo requiere la presencia de este último para prevenir la apoptosis de las células neuronales (59).

En el análisis de las vías de señalización de activación celular se demostró por primera vez la incapacidad de cEpo para mantener la fosforilación de Akt y FOXO3a por el mismo período que lo hace Epo. Esto lleva a la traslocación de FOXO3a al núcleo promoviendo la expresión de la proteína reguladora del ciclo celular p27^{Kip1} y generando, así, el arresto del ciclo celular por cEpo (60).

Por otra parte, se comprobó que, al menos en parte, el efecto diferencial entre cEpo y Epo con respecto a la proliferación de células con capacidad de diferenciación eritroide se encontraría asociado al silenciamiento prematuro de las vías de señalización, ya que el aumento de la expresión y actividad de la proteína PTP1B resultó significativamente mayor en presencia de cEpo. La colocalización de PTP1B con el R β c, observado por microscopía confocal, sustenta la conclusión de que la fosfatasa desfosforila la señalización de cEpo, interrumpiendo la vía de supervivencia y, en consecuencia, la proliferación celular (60).

RELACIÓN ESTRUCTURA PROTEICA-FUNCIÓN

Numerosas eritropoyetinas recombinantes con actividad biológica similar han sido preparadas y aprobadas para su uso terapéutico en distintas partes del mundo. Las variantes de Epo difieren de la fisiológica y también

entre ellas con respecto a la composición y estructura de los azúcares, lo que implica variaciones en el porcentaje de ácido siálico y en el peso molecular.

Además, con el objeto de evitar efectos secundarios, disminuir las dosis o la frecuencia del tratamiento se han obtenido proteínas derivadas por modificación de la molécula de Epo y péptidos sintéticos con variada actividad biológica.

El elevado contenido de hidratos de carbono de la Epo constituye un complemento estructural importante desde el punto de vista farmacológico. Debido a que las modificaciones de los niveles de hidratos de carbono afectan el perfil farmacocinético de la Epo, se ha sugerido que esas diferencias podrían tener importantes consecuencias clínicas (64). Por otra parte, se ha reportado que la afinidad del REpo por Epo está relacionada con el contenido de hidratos de carbono de la proteína (65).

La proteína a la que se le ha removido totalmente el contenido de ácido siálico (*asialoEPO*) parece retener su actividad neuroprotectora disminuyendo su habilidad para modificar el hematocrito pero tiene una vida media extremadamente corta. Más que la modificación molecular, lo que dificultaría la activación de los precursores eritroides en la médula ósea sería la dificultad de la *asialoEpo* para interactuar con las células *target*, debido al corto tiempo de supervivencia (52) (53) (66). Con el objeto de disminuir la frecuencia de aplicación en el tratamiento, se ha tratado de modificar la eritropoyetina de tal forma de extender su vida media en el organismo. El agregado de dos cadenas de oligosacáridos adicionales (*darbepoetin-a*) le confiere a la proteína una elevada vida media, mientras que mantiene una actividad similar a la de la Epo nativa (67). A eritropoyetinas recombinantes se les ha adosado químicamente polietilenglicol (PEG) o ácido polisiálico (PSA). La biodegradación total de este último transforma a esta eritropoyetina modificada (*ErepoXen*) en un fármaco atractivo para tratamientos prolongados en pacientes renales crónicos. El activador continuo del receptor de eritropoyetina (CERA, *Continuous Erythropoietin Receptor Activator*) tiene un enlace con una cadena de metoxipolietilenglicol integrada vía uniones amida entre los N-terminales de grupos lisina, lo que aumenta considerablemente su tamaño y vida media *in vivo* (68).

En la actualidad, se encuentran en fase de desarrollo e investigación clínica otros factores, que mediante propiedades diferentes, actuarían como factores estimulantes de la eritropoyesis (69) (70), algunos de los cuales se mencionan a continuación.

Algunos agentes estimulan la síntesis de Epo endógena. El factor de transcripción HIF que regula la expresión del gen de Epo es una proteína heterodimérica formada por varias subunidades, siendo HIF-2 α la más importante y responsable de adaptación a hipoxia. Por lo tanto, en situaciones de normoxia no es necesaria y es inactivada por una enzima prolil-hidroxilasa (PH)

con posterior degradación proteasómica. En base a este conocimiento, nuevas moléculas que actúan como inhibidores de la PH serían capaces de estimular la síntesis de Epo mediante la estabilización de HIF-2 α .

Otras entidades mimetizan la actividad de la Epo. Los péptidos miméticos son polipéptidos cíclicos sintéticos de, aproximadamente, 20 aminoácidos cuya secuencia no es homóloga con la de la Epo pero induce una señal similar a la de la Epo a través del REpo. La ventaja del uso de estos péptidos miméticos (*Peginesatide*, *Pegolsihematide*) se basa, principalmente, en los más simples procesos de producción, aunque no se ha demostrado que estos péptidos ofrezcan ventajas con respecto a otros agentes estimulantes de la eritropoyesis.

Una línea de investigación indaga en la tecnología de silenciamiento de genes utilizando oligonucleótidos *antisense* contra mediadores que inhiben la eritropoyesis, pero los caminos de señalización son complejos y multifacéticos y la inhibición de alguna vía podría interferir otra señal beneficiosa.

Consideraciones finales

Es evidente que se requiere más investigación para clarificar la relación entre los diversos efectos eritropoyético y no eritropoyético de la eritropoyetina en tejidos normales y patológicos con el fin de optimizar el uso clínico de la *rhuEpo* en patologías tan complejas y diversas como por ejemplo, el cáncer.

Un aspecto de la terapia con eritropoyetina que merece especial atención es el de la resistencia al tratamiento, dada la multiplicidad de factores de riesgo involucrados en la disminuida respuesta a la activación celular por la hormona.

La búsqueda de nuevos candidatos para reemplazar a la eritropoyetina endógena, ya sea para contrarrestar la anemia derivada de causas muy disímiles o bien para actuar como agente antiapoptótico en tejidos no hematopoyéticos, no ha hallado todavía el agente adecuado para cumplir estos roles.

Los continuos informes reportados recientemente acerca de los efectos adversos de los tratamientos prolongados y de las dosis elevadas de eritropoyetina, muchos de ellos con resultados contradictorios, muestran la necesidad de evaluar los efectos sinérgicos con terapias simultáneas. También es importante identificar factores de riesgo que puedan interactuar con la eritropoyetina o bien interferir sus señales de activación celular.

Los resultados de distintos ensayos indican que el efecto de la Epo sobre la mortalidad en diversas patologías todavía no está suficientemente claro. Nuevos estudios serán útiles para resolver dudas sobre la efectividad de la eritropoyetina y sus derivados o de agentes alternativos con el fin de proveer bases sólidas para el desarrollo de ensayos clínicos concluyentes.

CORRESPONDENCIA

Dra. DANIELA VITTORI

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Pabellón II, Piso 4, Laboratorio QB11

Intendente Guiraldes 2160,

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina

Email: dvittori@qb.fcen.uba.ar

Referencias bibliográficas

- Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 93-100.
- Zhande R, Karsan A. Erythropoietin promotes survival of primary human endothelial cells through PI3K-dependent, NF- κ B-independent upregulation of Bcl-xL. *Am J Physiol* 2007; 292: 2467-74.
- Wen D, Biossel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn F. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 1994; 269: 22839-46.
- Banks DD. The effect of glycosylation on the folding kinetics of erythropoietin. *J Mol Biol* 2011; 412: 536-50.
- Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. *CR Acad Sci P* 1906; 143: 384-6.
- Reissmann KR. Studies on the mechanism of the erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 1950; 5: 372-80.
- Erslev AJ, Laviertes PH, von Wagenen G. Erythropoietic stimulation induced by anemic serum. *Proc Exp Biol Med* 1953; 83: 548-50.
- Miyake T, Kung, CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-64.
- 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.
- Davis J, Arakawa T, Strikland TW, Yphantis DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987; 26: 2638-41.
- Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *New Engl J Med* 1987; 316: 73-8.
- De Marchi S, Parisi M, Ferraccioli GF. Erythropoietin and the anemia of chronic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11: 429-44.
- Bron D, Meuleman N, Mascaux C. Biological basis of anemia. *Semin Oncol* 2001; 28 (Supl 8): 1-6.
- Damacco F, Luccarelli G, Prete M, Silvestris F. The role of the human recombinant erythropoietin alpha in the treatment of chronic anemia in multiple myeloma. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 1: 32-8.
- Reiter PD, Rosenberg AA, Valuck R, Novak K. Effect of short-term erythropoietin therapy in anemic premature infants. *J Perinatol* 2005; 25: 125-9.
- Arndt U, Kaltwasser JP, Gottschalk R, Hoelzer D, Möller B. Correction of iron-deficient erythropoiesis in the treatment of anemia of chronic disease with recombinant human erythropoietin. *Ann Hematol* 2005; 84: 159-66.
- Boehm M, Riesenhuber A, Winkelmayr WC, Arbeiter K, Mueller T, Aufricht C. Early erythropoietin therapy is associated with improved growth in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 1189-93.
- Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Int Med* 2004; 43: 649-59.
- Rossert J, Eckardt K-U. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1025-8.
- Digicaylioglu M, Lipton S. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappa B signalling cascades. *Nature* 2001; 412: 641-7.
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewzok P, *et al.* Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4044-9.
- Grasso G, Sfacteria A, Meli F, Fodale V, Buemi M, Iacopino DG. Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 2007; 1182: 99-105.
- Toba H, Kojima Y, Wang J, Noda K, Tian W, Kobara M, *et al.* Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2012; 691: 190-7.
- Bailey DM, Lundby C, Berg RM, Taudorf S, Rahmouni H, Gutowski M, *et al.* On the antioxidant properties of erythropoietin and its association with the oxidative-nitrosative stress response to hypoxia in humans. *Acta Physiol* 2014; 212: 175-87.
- Wang L, Di L, Noguchi CT. Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system. *Int J Biol Sci* 2014; 10: 931-9.
- Nakao T, Geddis A, Fox N, Kaushansky. PI3K/Akt/FOXO3a pathway contributes to thrombopoietin-induced proliferation of primary megakaryocytes in vitro and in vivo via modulation of p27^{Kip1}. *Cell Cycle* 2008; 7: 257-66.
- Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 2005; 105: 600-8.
- Krebs D, Hilton D. SOCS: physiological suppressors of cytokine signalling. *J Cell Sci* 2000; 113: 2813-9.
- Cohen J, Oren-Young L, Klingmüller U, Neumann D. Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of the erythropoietin receptor signaling. *Biochem J* 2004; 377: 517-24.
- Callero M, Pérez G, Vittori D, Pregi N, Nesse A. Modulation of protein tyrosine phosphatase 1B by erythropoietin in UT-7 cell line. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 319-28.

31. Pfeffer MA, Burdman EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt K, *et al.* A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease, *N Engl J Med* 2009; 361: 2019-32.
32. McKinney M, Arcasoy MO. Erythropoietin for oncology supportive care. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1246-54.
33. Drüeke T. Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 (Supl 7): 25-8.
34. Jelkmann I, Jelkmann W. Impact of erythropoietin on intensive care unit patients. *Transfus Med Hemother* 2013; 40: 310-8.
35. Okazaki M, Komatsu M, Kawaguchi H, Tsuchiya K, Nitta K. Erythropoietin resistance index and the all-cause mortality of chronic hemodialysis patients. *Blood Purif* 2014; 37: 106-12.
36. Hung SC, Lin YP, Tarng DC. Erythropoiesis-stimulating agents in chronic kidney disease: what have we learned in 25 years? *J Formos Med Assoc* 2014; 113: 3-10.
37. Macdougall I, Cooper A. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammation cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Supl 11: 39-43.
38. Zhang M-Y, Sun S-C, Bell L, Miller C. NF-kappa B transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood* 1998; 91: 4136-44.
39. Akagi S, Ichikawa H, Okada T, Sarai A, Sugimoto T, Morimoto H, *et al.* The critical role of SRC homology domain 2-containing tyrosine phosphatase-1 in recombinant human erythropoietin hyporesponsive anemia in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3215-24.
40. Zabolotny JM, Kim YB. Silencing insulin resistance through SIRT1. *Cell Metab* 2007; 6: 247-9.
41. van der Putten K, Braam B, Jie KE, Gaillard CA. Mechanisms of disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4:47-57.
42. Dagvadorj J, Naiki Y, Tumurkhuu G, Noman AS, If-takhar-E-Khuda I, Komatsu T, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha augments lipopolysaccharide-induced suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) protein expression by preventing the degradation. *Immunology* 2010; 129:97-104.
43. Callero M. Proteína Tirosina Fosfatasa 1B en la vía de señalización de la eritropoyetina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 2010.
44. Coleman T, Westenfelder C, Tögel F, Yang Y, Hu Z, Swenson LA, *et al.* Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5965-70.
45. Wagner M, Alam A, Zimmermann J, Rauh K, Koljaja-Batzner A, Raff U, *et al.* Endogenous erythropoietin and the association with inflammation and mortality in diabetic chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1573-9.
46. Singh AK. Is there a deleterious effect of erythropoietin in end-stage renal disease? *Kidney Int* 2011; 80: 569-71.
47. Gao D, Ning N, Niu X, Dang Y, Dong X, Wei J, *et al.* Erythropoietin treatment in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J* 2012; 164: 715-27.
48. Beleslin-Cokic B, Cokic V, Yu X, Weksler B, Schechter A, Noguchi C. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 2004; 104: 2073-80.
49. Garimella P, Katz R, Patel K, Kritchevsky S, Parikh Ch, Ix J, *et al.* Association of serum erythropoietin with cardiovascular events, kidney function decline, and mortality: The health aging and body composition study. *Circ Heart Fail* 2016; 9: e002124. doi: 10.1161
50. Grote Beverborg N, van der Wal H, Klip I, Voors A, de Boer R, van Gilst W, *et al.* High serum erythropoietin levels are related to heart failure development in subjects from the general population with albuminuria: data from PRE-VEND. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 814-21.
51. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Natl Rev Neosci* 2005; 6: 484-94.
52. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q-W, Coleman T, Kreilgaard M, *et al.* Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6741-6.
53. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, *et al.* Derivatives of Erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305: 239-42.
54. Mun K-Ch, Golper TA. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif* 2000; 18: 13-7.
55. Park K-D, Mun K-C, Chang E-J, Park S-B, Kim H-C. Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand J Urol Nephrol* 2004; 38: 69-72.
56. Fantacci M, Bianciardi P, Caretti A, Coleman T, Cerami A, Brines M, *et al.* Carbamylated erythropoietin ameliorates the metabolic stress in vivo by severe chronic hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17531-6.
57. Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbinière A, Knisely JP, Erbayraktar Z, Yilmaz O, *et al.* Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. *Mol Med* 2006; 12: 74-80.
58. Tang Z, Sun X, Shi Q, Wang X, Xie Y, Huo G, *et al.* Beneficial effects of carbamylated erythropoietin against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced astrocyte swelling. *Neurosci Letters* 2012; 530: 23-8.
59. Chamorro ME, Wenker S, Vota D, Vittori D, Nesse A. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 2013; 1833: 1960-8.
60. Chamorro ME, Maltaner R, Vittori D, Nesse A. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is involved in the defective erythropoietic function of carbamylated erythropoietin. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 61: 63-71.
61. Chen J, Yang Z, Zhang X. Carbamylated erythropoietin: a prospective drug candidate for neuroprotection. *Biochem Insights* 2015; 8: 25-9.

62. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The β chain of the Interleukin-3 Receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 1997; 90: 1867-73.
63. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, *et al.* Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 14907-12.
64. Skibeli V, Nissen-Lie G, Torjesen P. Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood* 2001; 98: 3626-4.
65. Darling RJ, Kuchibhotla U, Glaesner W, Micanovic R, Witcher DR, Beals JM. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. *Biochemistry* 2002; 41: 14524-31.
66. Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics* 2009; 6: 108-27.
67. Macdougall IC. Optimizing erythropoietin therapy. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 121-6.
68. Macdougall IC. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep* 2005; 4: 436-40.
69. López-Gómez JM, Abad S, Vega A. Nuevas expectativas en el tratamiento de la anemia en la enfermedad renal crónica. *Nefrología (España)* 2016; 36: 232-6.
70. Schmid H, Jelkmann W. Investigational therapies for renal disease-induced anemia. *Expert Opin Invest Drugs* 2016; doi: 10.1080/13543784.2016.

Recibido: 29 de julio de 2016

Aceptado: 26 de agosto de 2016