



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



ERITROPOYETINA MECANISMO DE ACCION Y APLICACION TERAPEUTICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A

GLORIA LETICIA ARELLANO MARTINEZ

Asesor de Tesis: Q. F. B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

	Hoja
I.- LISTA DE ABREVIATURAS	1
II.- INDICE DE FIGURAS	2
III.- INDICE DE TABLAS	3
IV.- RESUMEN	4
1.- INTRODUCCION	6
2.- OBJETIVOS	9
3.- GENERALIDADES	10
4.- ERITROPOYETINA	17
4.1.- Purificación de Eritropoyetina	18
4.2.- Propiedades Fisicoquímicas	24
4.3.- Sitios de Producción	33
4.3.1.- Riñón	33
4.3.2.- Sitios Extrarenales	36
4.4.- Biosíntesis de eritropoyetina	37
4.4.1.- Teorías propuestas	37
4.4.2.- Mecanismos más aceptados	38
5.- MECANISMO DE ACCION DE LA ERITROPOYETINA	44
5.1.- Mecanismo de acción sobre células blanco	44
6.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ERITROPOYETINA	54
6.1.- Factores que estimulan	54
6.2.- Factores que inhiben	59
7.- ERITROPOYETINA RECOMBINANTE	61
7.1.- Métodos de Obtención	62
7.1.1.- Método empleado por Fu-Kuen Lin	62
7.1.2.- Método empleado por Jacobs	65
7.1.3.- Método empleado por Powell	66

8.- APLICACION TERAPEUTICA DE LA ERITROPOYETINA RECOMBINANTE	71
9.- CONCLUSIONES	78
10.- REFERENCIAS	80

I. - LISTA DE ABREVIATURAS

ASB	Albumina sérica bovina
EFU-E	Unidad formadora del estallido eritroide
BHK	Riñón de hamster bebe
BPA	Activador promotor del estallido
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides
CFU-L-M	Unidad formadora de colonias linfoides y mieloides
CFU-S	Unidad formadora de colonias del bazo
CHOS	Carbohidratos
CHO	Células ováricas de hamster chino
DEAE	Dietil-aminoetil-celulosa
Epo	Eritropoyetina
EpoR	Receptor para eritropoyetina
rEpo	Eritropoyetina Recombinante
Hb	Hemoglobina
HELA	Células de cáncer cervical
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
IGFs	Factores de crecimiento parecidos a insulina
It1	Interleucina
Kg	kilogramos
pb	Pares de bases
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PKC	Protein cinasa C
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
U	Unidades

II.- INDICE DE FIGURAS

Hoja

Fig. 1.- Proceso de maduración de células rojas que muestra la etapa dependiente y la independiente de Epo	11
Fig. 2.- Eritropoyesis y sitios probables de acción de agentes hormonales y neurotransmisores.	14
Fig. 3.- Proceso de maduración de eritrocitos.....	16
Fig. 4.- Purificación de Epo.	20
Fig. 5.- Método de purificación y caracterización de Epo propuesto por Espada en 1972.	23
Fig. 6.- Estructura primaria de la Epo.	30
Fig. 7.- Estructura secundaria propuesta para las Epos de humano, ratón y mono.	32
Fig. 8.- Biosíntesis de Epo.	40
Fig. 9.- Biosíntesis de Epo.	42
Fig.10.- Control fisiológico de la producción de eritrocitos por la Epo.	46
Fig.11.- Factores renales y sistémicos que regulan a la Epo.	57
Fig.12.- Mapa de restricción para el gene de Epo humana..	64
Fig.13.- Autorradiograma que muestra el cromosoma que contiene el gene que codifica para la Epo humana	68
Fig.14.- Comparación de los niveles de Epo en plasma, después de la administración de rEpo por vía intravenosa y subcutánea	73

II.-.INDICE DE TABLAS

	Hoja
Tabla No.1.- Potencia y rendimiento en la purificación de Epo.	21
Tabla No.2.- Composición de la Epo.	25
Tabla No.3.- Composición de carbohidratos en las Epos α y β	26
Tabla No.4.- Propiedades fisicoquímicas de la Epo.	27
Tabla No.5.- Distribución de los receptores para Epo en las células de médula ósea.	49
Tabla No.6.- Densidad de receptores para Epo en el bazo de ratón anémico.	50
Tabla No.7.- Agentes farmacológicos que estimulan la producción de Epo.	56
Tabla No.8.- Niveles de Epo durante el embarazo.	76

IV. - RESUMEN

La Eritropoyetina (Epo) es un factor importante tanto en el proceso de maduración como en el de diferenciación de los eritrocitos.

El factor determinante en la inducción de su síntesis es la hipoxia, que puede ser inducida por diferentes causas.

La Epo se sintetiza principalmente en el riñón aunque existen sitios extrarenales para la síntesis de la misma.

Al parecer la biosíntesis de la Epo se lleva a cabo una vez que la hipoxia estimula el sensor renal de oxígeno desencadenando una serie de eventos que incluyen la transcripción y traducción del mRNA de la Epo incrementando con ello su concentración en el plasma.

La Epo actúa a través de receptores específicos sobre las BFU-E maduras, CFU-E y proeritroblastos, induciendo la mitosis sobre la célula, activando con ello su maduración y diferenciación.

Gracias a la ingeniería genética ha sido posible clonar el gene que codifica para la Epo, lo cual es muy importante ya que antes de establecerse su obtención y purificación a partir de líneas celulares, eran mínimas las cantidades que se podían obtener a partir de suero u orina.

Los primeros en llevar a cabo su clonación fueron Fu-Kuen Lin y Jacobs, quienes emplearon la técnica de nucleótidos sintéticos, usando péptidos de la molécula de Epo extraída de orina humana para crear una librería genómica que mediante pruebas de hibridación los llevó a la clona que codifica para la Epo humana, misma que fue expresada sobre las líneas celulares CHO, BHK y HELA obteniendo la Epo humana recombinante (rEpo). Seguidos a estos estudios se han implementado variaciones en cuanto a los vectores y células empleadas para la obtención de rEpo.

Una vez obtenido el gene que codifica para la Epo, es ahora posible disponer de rEpo en varias presentaciones y emplearla con fines terapéuticos, sobre todo en pacientes transfusión dependientes con anemia asociada a falla renal.

Los detalles que llevaron a la elucidación de su biosíntesis, mecanismo de acción y la obtención final de rEpo son descritos en la presente revisión.

1.- INTRODUCCION

El oxígeno, elemento vital para los seres humanos, es captado por el cuerpo a través del aparato respiratorio y transportado a todo el organismo por los eritrocitos; células importantes no solo para el transporte de oxígeno, sino también del CO₂, producto de desecho. [25]

La producción de eritrocitos es influenciada por muchos factores y cuando uno de estos falla, su producción puede verse alterada ya sea conduciendo a estados de anemia o bien de policitemia. [25]

Uno de los factores que influyen fuertemente no solo en su producción, sino también en el proceso de maduración y liberación, es la Epo, cuya estimulación se da como respuesta a la baja tensión de oxígeno en los tejidos. [22,25]

Es una glucoproteína ácida que se encuentra presente en muy bajas concentraciones en el plasma en condiciones normales, pero cuando se dan estados de estrés ó anémicos incrementa tanto su concentración en plasma como su excreción en orina. [22]

No obstante que la Epo juega un papel importante en la regulación de la producción de eritrocitos, el control de la regulación de la hormona, la naturaleza de sus receptores y su mecanismo de acción no han sido claramente elucidados y definidos. [38]

En contraste con otros reguladores endócrinos, hasta hace algunos años se tenían pocos reportes acerca de su naturaleza; ésto es debido a que antes de establecerse su purificación a partir de líneas celulares su obtención resultaba bastante difícil. [38]

Hasta entonces no se había logrado establecer una línea celular que diera alto rendimiento en su producción y las purificaciones llevadas a cabo en orina requerían grandes volúmenes de ésta para su obtención. [4]

Por las razones antes mencionadas se reportaron datos vagos sobre todo en lo referente a su mecanismo de acción en las diferentes literaturas, algunos coincidían y otros eran totalmente contradictorios.

Ya desde 1969 se tienen reportes de su purificación y caracterización, desde entonces se propuso la presencia de dos tipos de Epo: la nativa que es activa in vivo y la forma asialo (carente de ácido sialico) que es inactiva in vivo, relacionando a la forma sialo con un residuo terminal de ácido siálico. [22]

Por otro lado se ha reportado la existencia de dos formas, una a la que denominaron α y otra β (separadas), con idéntica actividad biológica y composición de aminoácidos, pero con diferente composición de carbohidratos. [77]

En humanos la Epo tiene una vida media biológica de 4-6 hrs, y su aclaramiento renal es bajo, aproximadamente 0.5 mU/ml. Las concentraciones en el plasma son de 15-30 mU/ml y su excreción en orina es de 2-5 mU/24 hrs. [25]

La Epo es liberada del riñón en respuesta a hipoxia en los tejidos, estimulando la producción de eritrocitos por la médula ósea. En los recién nacidos la producción de eritrocitos es independiente de la Epo renal producida, cosa que no sucede con los adultos. [22, 29]

Aún no ha sido bien definido el sitio renal de la producción de Epo, pero se sugiere que el epitelio renal tubular es el sitio probable de su producción. [31]

Existen otros sitios extrarenales de producción de Epo, entre los que se encuentra principalmente el hígado. [31]

Cuando no se había detectado Epo en extractos de riñón, se sugirió que éste producía un precursor de Epo inactivo o un activador de enzimas el cual actuaba sobre un precursor de Epo en la sangre por medio de un sistema análogo al de la renina-angiotensina, en el que la Epo llega a ser el producto activo comparable a la angiotensina II. [78] Aunque actualmente dicha posibilidad ha sido completamente descartada.

Ante la imposibilidad de purificar cantidades suficientes para su estudio, se empezaron a probar cultivos celulares para obtener suficiente proteína, inicialmente se emplearon cultivos

de médula ósea, bazo y células de hígado fetal, para analizar las interacciones de la Epo con las células blanco; hasta que se logró clonar el gene a partir de células cancerosas. [19, 43, 45, 54]

Debido a la importancia de la Epo en la regulación y diferenciación de eritrocitos, ésta es considerada como un reemplazador en la terapia de algunas clases de anemia y para esto es importante tenerla pura y en cantidades suficientes.

Una de las principales aplicaciones que ha tenido recientemente la Epo como terapia, es en algunos casos de anemia sobre todo en pacientes con falla renal a los que hay que estar dializando continuamente y debido a ello han llegado a tener problemas de anemia y ser dependientes de transfusiones continuas. [26]

Dada la importancia que actualmente esta teniendo y al gran número de trabajos que se han realizado en torno al estudio de su mecanismo de acción y la aplicación como terapia de reemplazamiento, surgió la inquietud de realizar el presente trabajo.

2. - OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión que ilustre los pasos que se siguieron en el estudio de la eritropoyetina; desde su purificación, caracterización y mecanismo de acción, hasta la obtención de la eritropoyetina recombinante y la aplicación terapéutica que ha tenido esta última

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Conocer los factores que influyen en la síntesis de eritropoyetina.
- 2.- Conocer o elucidar el mecanismo de acción de la eritropoyetina.
- 3.- Conocer algunos métodos para la obtención de eritropoyetina recombinante.
- 4.- Describir las aplicaciones terapéuticas de la eritropoyetina recombinante.

3. - GENERALIDADES

La eritropoyesis es el proceso por el cual son producidos los eritrocitos (transportadores de oxígeno y bioxido de carbono). Este proceso está mediado por la Epo, regulador primario de la producción de células rojas en los mamíferos. [25] Una sustancia similar ha sido detectada en peces y pájaros. [40]

Los eritrocitos son requeridos para realizar el intercambio gaseoso, necesario tanto para mantener un buen grado de oxigenación como en la regulación de el equilibrio ácido-base del organismo ya que es uno de los principales sistemas tampón, por ello la concentración de eritrocitos que debe estar circulando debe ser la necesaria para mantener una oxigenación adecuada en los tejidos. [22]

Normalmente la eritropoyesis puede incrementar de 3 a 7 veces en respuesta a un estímulo anémico, dependiendo de la duración del estímulo. [22, 26]

En la etapa gestacional los eritrocitos son producidos inicialmente en el saco vitelino, a las 6 semanas la producción es encomendada al hígado y bazo; de los 5 meses en adelante se da la actividad de la médula ósea. [11, 48]

En los recién nacidos el proceso de producción de eritrocitos es independiente de la Epo renal producida, cosa que no sucede en los adultos. [31]

En experimentos llevados a cabo con ratas se ha observado que conforme aumenta la edad del animal se incrementa también la producción de Epo. [31]

Las personas normales producen 1% de eritrocitos por día, pero cuando se estimula la Epo pueden incrementar de 2 a 3 veces y en condiciones prolongadas hasta 10 veces, continuando esto hasta que las condiciones normales de oxígeno sean recuperadas. [11, 26, 48]

Los componentes básicos de la eritropoyesis son: El sistema de células precursoras, su estimulador la eritropoyetina y un

adecuado aporte de hierro, del cual esta hecha la hemoglobina (Hb)

El proceso de producción de eritrocitos puede dividirse en dos etapas:

1) La etapa temprana o independiente de Epo que incluye el paso de un sistema de células multipotenciales a un sistema de células que adquiere receptores para Epo.

2) La tardía o etapa dependiente de Epo, que incluye la diferenciación terminal y la proliferación del sistema de células eritroides a eritoblastos y posteriormente a eritrocitos. [22, 36]

En la fase temprana de la diferenciación celular las células eritroides no son influenciadas por los niveles de Epo, pero son influenciadas por otros mecanismos, pues la eritropoyesis no solo es estimulada por la Epo, sino también por otros factores, incluyendo la It1-3, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos y el activador promotor del estallido (BPA). [33]

La regulación por la Epo empieza en el estado de maduración eritroide intermedio entre la BFU-E (Unidad formadora del estallido eritroide) y la CFU-E (Unidad formadora de colonias eritroides) Fig. 1

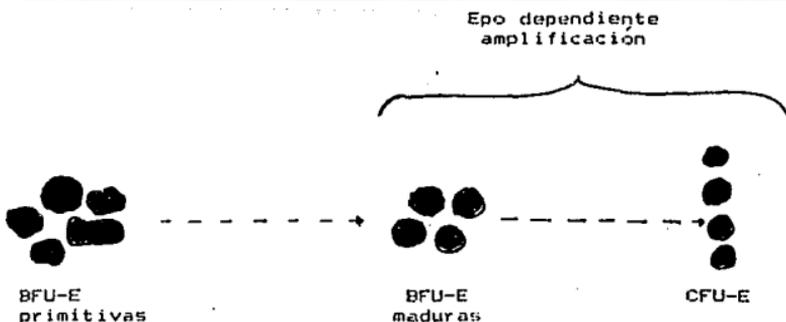


Fig.1.- Proceso de maduración de los prescursores eritroides, que indica las dos etapas en las cuales las células son dependientes e independientes de Epo. [22]

Las BFU-E dan incremento a grandes colonias multiagrupadas, en respuesta a factores de crecimiento. Este es el progenitor eritroide más primitivo que se conoce en ensayos in vitro. [91]

BFU-E inmadura es relativamente insensible a Epo in vivo, su población está débilmente influenciada por perturbaciones eritroides y cambios en los títulos de Epo en el plasma, además de no requerir Epo para su supervivencia in vitro. [91]

La CFU-E, unidad celular de colonias eritroides más madura, es regulada por los niveles de Epo en el plasma. Cuando los niveles de Epo se incrementan en el plasma, hay una amplificación del número de CFU-E en la médula, además de que puede causar macrocitosis saltándose las divisiones celulares terminales, ya que la Epo estimula a las células de la médula a diferenciarse en pronormoblastos, disminuyendo el tiempo requerido para su maduración. [91]

Mientras que las CFU-E requieren IGF-1 (Factor de crecimiento I parecido a la insulina) más Epo para su desarrollo, las BFU-E maduras e inmaduras requieren de Epo más el factor (BPA). [91]

En los cultivos de médula ósea no purificados, las BFU-E inmaduras proliferaban inicialmente en ausencia de Epo si existía BPA. Sin embargo BPA nunca fue completamente purificado y con el advenimiento de la It1-3 y el GM-CSF se observó que estos soportaban el crecimiento de las BFU-E de manera similar a como lo hacía BPA, (por ello se cree que este factor era la It1-3) pero también actuaban sobre otras líneas celulares. [91]

El activador BPA ha sido descrito de una variedad de orígenes, incluyendo los linfocitos T, monocitos células endoteliales y ciertas líneas celulares de tumor. Sin embargo BPA tiene actividad sobre otros factores y puede estimular el crecimiento de CFU-GM y CFU-Meg. [22]

Para el crecimiento máximo in vitro de la CFU-E es requerida más del doble de la concentración de Epo que la necesaria para las BFU-E maduras, no es afectada por el BPA y el número de CFU-E correlaciona con la concentración de Epo en el cultivo. [22]

Conforme se incrementa la concentración de Epo en el cultivo incrementa el % de respuesta de CFU, esto sucede en un rango de 1-100 mU/ml de Epo hasta llegar a un máximo de 100, momento en el

que se mantienen constantes. [31]

La sensibilidad de los progenitores eritropoyéticos a Epo se incrementa con su estado de diferenciación.

Aún no es determinado el mecanismo que regula la etapa temprana, pero puede ser dependiente de factores de crecimiento equivalentes a los factores químicos que estimulan a la CFU-S (unidad celular formadora de colonias del bazo) ó la interleucina 3 (It1-3). [91]

Una de las razones por las que no se ha estudiado el estado temprano de la eritropoyesis es debido a la imprecisión de los sistemas de ensayo empleados, en tanto que es mucho lo que se sabe acerca de los estados dependientes de Epo, ya que estos son fácilmente estudiados por métodos bioquímicos y citológicos. [22]

Secundariamente pueden ser estimulados por otro tipo de hormonas o factores de crecimiento, los cuales por ellos mismos no son reguladores primarios de la eritropoyesis. Tales como: Catecolaminas, hormona del crecimiento, hormona tiroidea, insulina y nucleótidos cíclicos entre otros, que interactúan con los factores de crecimiento e influyen la maduración y proliferación de las células tanto in vivo como in vitro. [91]

Incluidos en las dos etapas anteriormente mencionadas, son distinguidos tres estados de maduración de las células hematopoyéticas y estos son:

- a) El sistema de células hematopoyético pluripotencial.
- b) Los progenitores de las distintas líneas celulares sanguíneas.
- c) Células diferenciadas, precursores celulares morfológicamente diferenciables. Fig. 2

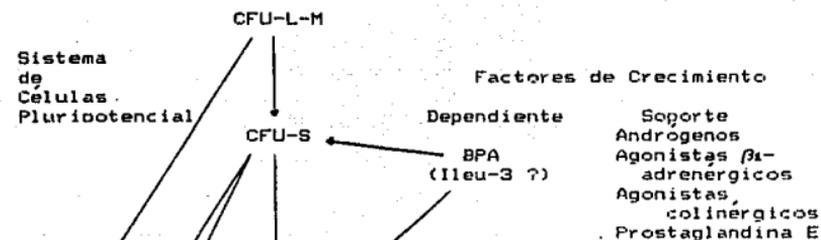
Al menos doce replicaciones celulares ocurren a lo largo de la ruta eritropoyética desde la célula más primitiva hasta el reticulocito. Esta progresión está asociada con la pérdida del potencial proliferativo. [48, 91]

Como se puede observar en la fig. 2, existen dos clases de células BFU-E en la médula ósea tanto de ratón como de humano.

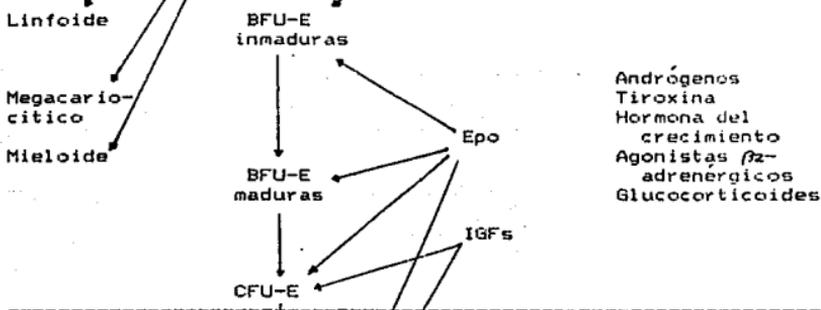
En los ratones las BFU-E inmaduras dan varios cientos de eritroblastos después de 8 a 10 días en cultivo, y las maduras (que son más sensibles a Epo) dan un incremento de 50 a 200

MEDULA OSEA

a)



b)



c)

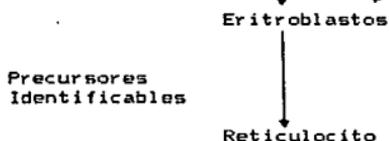


Fig. 2.- Esquema de la eritropoyesis y los posibles sitios de accion de los agentes hormonalas y neurotransmisores. [91]

eritroblastos. En el humano los picos de crecimiento se presentan después de 17-20 y 10-12 días respectivamente. [91]

Por lo que respecta a CFU-E, se encuentra presente en los tejidos eritropoyéticos y rara vez se encuentra en sangre. Esta célula requiere de pequeñas cantidades de Epo para su crecimiento in vitro. Es una célula que se divide rápidamente y da un incremento de eritroblastos de 8 a 49 células en 17 días en el humano. [22, 48]

CFU-E nos va a dar origen a las células eritrocíticas, después de la transición de pro- a eritroblasto basófilo el mRNA de la globina llega a ser detectable, se inicia la síntesis de Hb a partir del proeritroblasto y continúa hasta el estado de reticulocito, entonces las divisiones celulares cesan después del estado policromatófilo. Fig. 3

A nivel de maduración de eritrocitos la primera célula observable es el proeritroblasto y aunque ésta sintetiza Hb desde su aparición no es capaz de llevar a cabo las divisiones mitóticas por sí solo. [91]

Cuando se forman las células multipotenciales, son estimuladas por la Epo para iniciar la síntesis de Hb y continuar las transformaciones. [22, 91]

Cuando incrementa la Epo, el período de maduración normal del reticulocito de aproximadamente 3 días es disminuido y el tiempo en circulación es incrementado. [17]

Finalmente se ha observado que durante el proceso de maduración de los eritrocitos la célula sufre los siguientes cambios: [17]

Ganan	Pierden
- Sistema captador de Hierro	- Nucleolo
- Hb	- Núcleo
- Sistema de captación de glucosamina	- Síntesis de DNA
- Ag específicos de membrana	- Síntesis de RNA
Temporalmente:	- Mitochondria
- Síntesis de RNA	- Acido cítrico,
- Síntesis de DNA	- Ribosomas
- Síntesis de proteínas	- Síntesis de proteínas

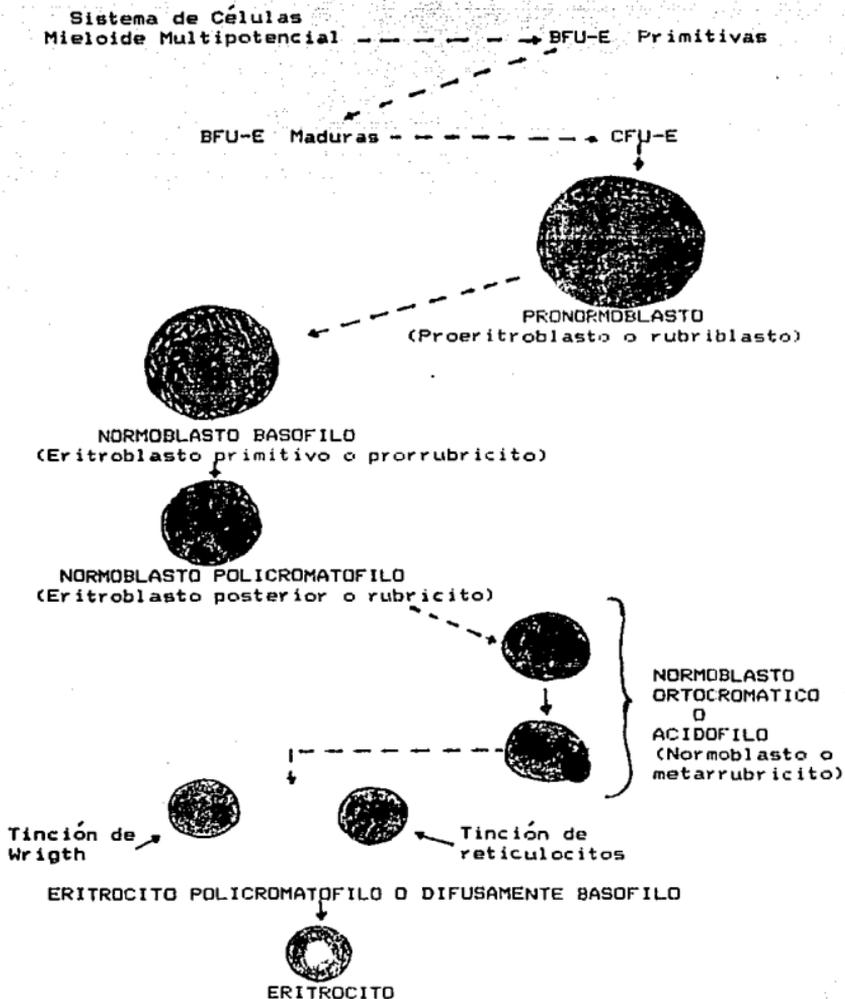


Fig. 3.- Figura que muestra las secuencias de la maduración eritrocítica. [25]

4. - ERITROPOYETINA

No obstante, el papel tan importante que juega la Epo en la producción, maduración y liberación de los eritrocitos a la circulación, la naturaleza de sus receptores ha sido poco estudiada, debido a la dificultad que anteriormente representaba el purificarla. [38]

Sin embargo, una vez establecidos los métodos de obtención, fue posible el conocimiento de varias de sus propiedades fisicoquímicas, así como la secuencia de su estructura primaria algo acerca de la estructura secundaria y hasta de la terciaria.

La palabra eritropoyetina deriva del griego *ερυθρος* (erythros) que significa rojo y de *ποιεω* (pieth) que significa yo hago, de esta manera se puede decir que la Epo es una molécula que hace a los rojos ó eritrocitos. [3]

Se han postulado varias teorías acerca del origen de la Epo, al parecer proviene de un precursor de mayor tamaño, la preeritropoyetina, que sería hidrolizada en la hormona activa por una enzima proteolítica proveniente del riñón, la eritrogenina, probablemente de naturaleza lisosomal. [78]

Los primeros estudios acerca de la Epo fueron llevados a cabo por los franceses Carnot y Deflande en 1906, quienes encontraron que la inoculación de sueros de animales anémicos, causaba policitemia en animales normales y que al igual que con otras células se trataba de un factor estimulador, al que ellos llamaron hemopoietina y que actualmente conocemos como Epo. [38]

A estos estudios continuaron otros realizados por Reissman en 1950, Erslev-Gordon, Boorsok y Stholman, cuyos estudios contribuyeron a descubrir la importancia de la tensión de oxígeno en la estimulación de la Epo. [78]

Pero ¿cómo es que se decide estudiar a la Epo? La respuesta es la siguiente, se contemplaron varias posibilidades de que se dispara la producción de eritrocitos, y éstas eran:

productos de desintegración de eritrocitos, viscosidad de la sangre, volumen de eritrocitos y, transporte de oxígeno. Se decidió estudiar el último, ya que precisamente esa era su función pues se había demostrado que al bajar el oxígeno, entonces se incrementaba la producción de eritrocitos, esto último basado en los trabajos de Paul Bert, quien hace 100 años se dedicó al estudio de las diferencias en las presiones barométricas. [78]

Los primeros estudios acerca de sus propiedades fisicoquímicas fueron llevados a cabo en Epo purificada de orina, ya que es muy difícil su obtención y purificación a partir de plasma.

4.1. - Purificación de Eritropoyetina

Los primeros intentos de purificación requirieron grandes volúmenes de orina en el caso de humanos, y el sacrificio de varios carneros en el caso de la Epo de carnero. Cantidades muy bajas han sido obtenidas por extracción de plasma de borrego anémico y de orina de humanos anémicos. [4, 60]

Por ejemplo, para purificar Epo a partir de plasma de borregos de 75 kg de peso, los cuales fueron primeramente irradiados con rayos γ posteriormente se les aplicaron tres dosis de fenilhidrazina de 1.0 gr cada una por vía subcutánea (para inducir anemia) los días 2, 4 y 6 después de ser irradiados, se espera a que el hematocrito bajara a 10 % ó menos, entonces se sangraron los animales, obteniéndose 2.8 lts de plasma por borrego con títulos de 3.5 U de Epo/ml. [4]

Para fraccionar el suero se hizo diálisis con agua deionizada hasta que la conductividad específica fuera menor de 250 $\mu\text{mho/cm}$, se ajustó a pH 4.5 y se pasó a través de una columna compuesta por 1:1 (w/w) de una mezcla de dietildiaminoetil celulosa (DEAE) y fosfocelulosa (PC), suspendida en agua y ajustados con ácido hasta pH 4.5, después se corrió el plasma y fue lavado con agua. La columna fue entonces eluida con 0.4 M de Na_2HPO_4 , 0.5 M de NaCl, la fracción eluida fue dializada y liofilizada. Esta forma de prepararla dió una potencia de aproximadamente 0.5 U/mg de proteína y el rendimiento fue de

75-100%. [4]

Partiendo de la fracción obtenida en el corrimiento en la columna de PC, los métodos para purificarla fueron los siguientes:

Paso I.- La fracción obtenida es disuelta en 10 volúmenes de 0.02 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_4$ 0.18M de NaCl a pH 6.0 y pasada a través de una columna IRC-50 equilibrada al mismo pH, la columna es lavada con el buffer hasta que el eluyente tenga una absorbancia insignificante a 280 nm. [4]

La fracción total del efluente (paso II) es llevada a pH 5.0 y pasada a través de una columna IRC-50 equilibrada al mismo pH y eluida con buffer a pH 6.0 corriendo a través de la columna hasta que ya no sea eluida más proteína. El eluato es dializado y liofilizado, (paso III) dando una fracción de Epo con una potencia de 3 U/mg de proteína con un rendimiento de aproximadamente 35%. [4]

La Epo del paso III es fraccionada con sulfato de amonio. La fracción precipitada entre 0.53 de saturación a pH 6.3 y 0.67 de saturación a pH 3.3 es disuelta, neutralizada, dializada y liofilizada y esto da la Epo del paso IV con una potencia aproximada de 15-30 U/mg de prot. con un rendimiento aproximado de 20%. [4]

La Epo del paso IV puede ser aún más purificada pasándola a través de una columna de sulfoetilsephadex (SE) poniéndola en un buffer de acetato 0.005M a pH 4.5 y eluyendo la columna con buffer incrementando la concentración de acetato y el pH para la segunda elución con acetato 0.015M y pH 5.0, obteniéndose la fracción SE-5 con una potencia aproximada de 130-140 U/mg de proteína y un rendimiento de aproximadamente 10%. [4]

Después de obtener SE-5 ésta fracción es fijada por absorción sobre gel fosfato de calcio y dializada contra agua destilada hasta que la conductividad sea menor de 100 $\mu\text{mho/cm}$, después del paso de absorción, el gel es eluido dos veces con fosfato 5×10^{-3} M y dos veces con fosfato 10^{-3} M ambos a pH 7.4.

La segunda fracción con el buffer más diluido es lo que da la fracción Cap-2B con una potencia de 8500 U/mg de proteína y un rendimiento aproximado del 2%, lo que representa una purificación de 930,000 veces sobre el plasma original del borrego anémico. Fig. 4, Tabla 1.

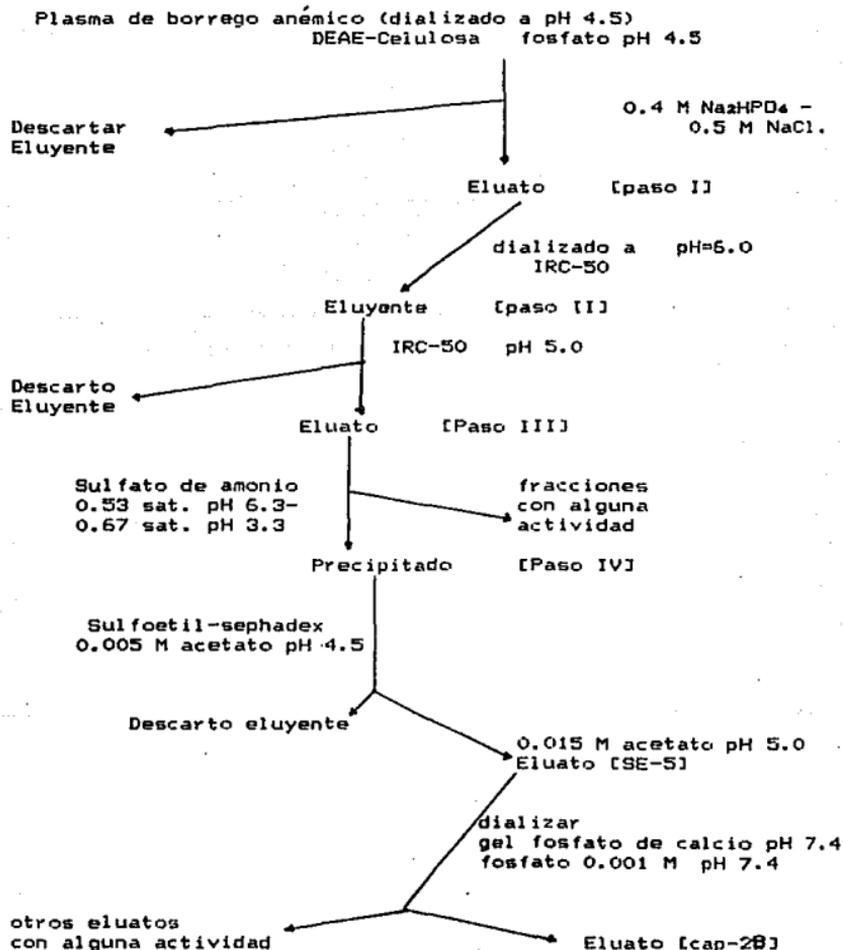


Fig. 4.- Purificación de Epo. Se obtiene [Se-5] y Cap-2B con una potencia de 9,200 U/mg de proteína y con un rendimiento muy bajo del 2-5%. [4]

Tabla 1.- Purificación de Epo

Fracción	Potencia (U/mg proteína)	Rendimiento (%)	Purificación
Plasma de borrego	0.007	100	-----
Paso I	0.5	75-100	17x
Paso III	3	35	430x
Paso IV	15-30	20	2150-4300x
SE-5	130-140	10	18600-20000x
Cap-2B	6500	2	930000x

Tabla que muestra la potencia, rendimiento y purificación obtenidos en cada uno de los pasos para la purificación de Epo. [4]

En 1972, Espada purificó Epo empleando filtración en sephadex G-100, electroforesis en gel de poliacrilamida y una doble inmunodifusión en gel de agar.

La purificación fue hecha de orina de pacientes anémicos, llevando a cabo los siguientes pasos:

- 1) Primero una adsorción con ácido benzoico.
- 2) Tratamiento con calor
- 3) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa,
- 4) Cromatografía sobre hidroxilapatita
- 5) Cromatografía sobre DEAE-celulosa empleando pH diferencial de elución
- 6) Filtración en gel con columna de sephadex.
- 7) Electroforesis de poliacrilamida con buffer tris-glicina, para revelar las electroforesis se empleo negro de amido.

Para la identificación de la Epo empleo:

- 1) Determinación de proteínas por el método de Lowry, empleando albúmina sérica bovina (ASB) como estándar.
- 2) Hexosas por el método de Roe, con estándar de galactosa
- 3) Hexosaminas por el método de Reissing, con estándar de glucosamina-HCl
- 4) Acido siálico, por medio de hidrolisis de la muestra en 0.05 M

de H_2SO_4 durante 1 hr a 80 °C ,por el método de Warren, empleando ácido N-acetilneuramínico como estándar.

5) La composición de aminoácidos fue llevada a cabo en un autoanalizador Becman 120. Fig. 5 [27]

Por otro lado se ha reportado que la Epo de orina humana con una actividad de 14 UI /mg de proteína al ser eluida en una columna inmunoabsorbente (con anticuerpos monoclonales anti-Epo fijados) con buffer de acetato a pH 2.5, se obtiene a la Epo con una actividad de 59,000 UI/mg de proteína, que al ser filtrada en gel sobre sephadex G-100 proporciona Epo con 81,600 UI/mg de proteína. [4]

Dando de esta manera un paso para obtener Epo pura en grandes cantidades y que pueda ser aplicable para fines clínicos y de laboratorio. [4]

Ha sido también reportado un método de un solo paso para la purificación de Epo y es por medio de cromatografía con azul cibacrón F3GA-agarosa carboximetilada (CM-affi-gelblu), obteniendo una actividad específica de 200 UI/mg de proteína y aparentemente libre de toxinas y otros factores de crecimiento hematopoyéticos diferentes a la Epo. [4]

Otros procesos de purificación parcial incluyen: Electroforesis, electroenfoque, isotachophoresis, cromatografía de interacción hidrofóbica sobre fenil sefarosa CL4B, y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). [8,91]

La HPLC permite la separación con alta eficiencia y resolución, pudiendo emplear tres tipos de cromatografía: medida de exclusión o permeación en gel, fase reversa y columnas de intercambio iónico con diferentes solventes; siendo medida de exclusión e intercambio iónico muy reproducibles, pero fase reversa da una excelente resolución. [21, 52]

Para manejar pequeñas cantidades de Epo se emplea cromatografía con lectinas enlazadas sobre agarosa. [91]

La cromatografía sobre enzimas inmovilizadas puede servir para remover la toxicidad de la hormona extraída de orina. [40]

La adsorción sobre lisado de *Limulus* remueve las endotoxinas de la Epo cruda. [91]

La Epo enlazada a fitohemaglutinina y aglutinina de germen

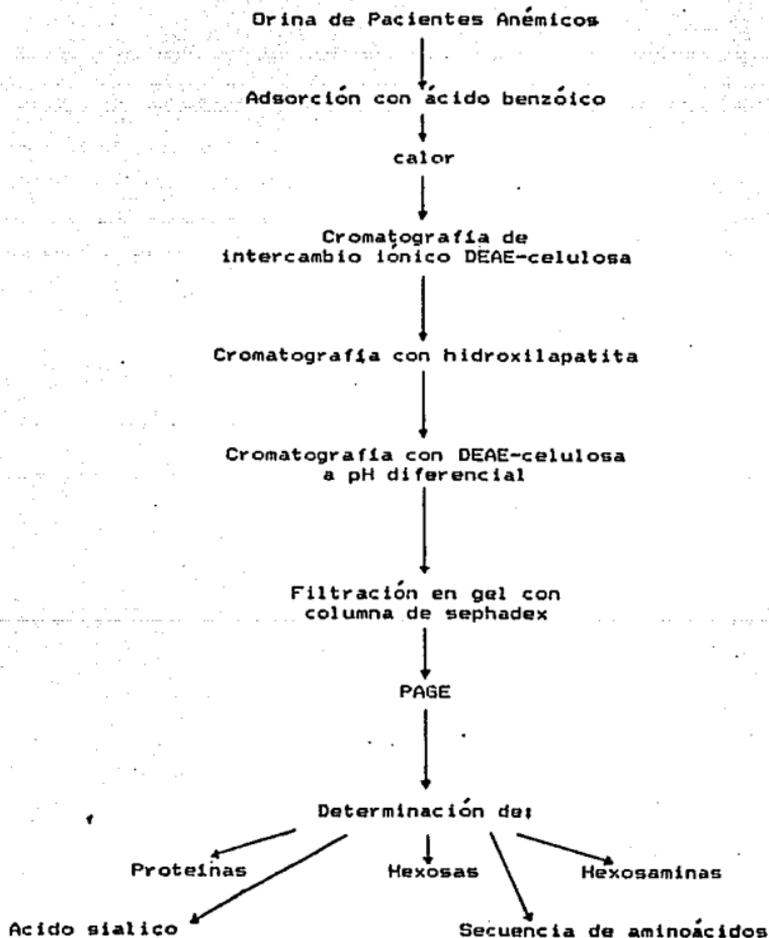


Fig 5.-Método empleado por Espada para la purificación y caracterización de la Epo. [27]

de trigo puede ser liberada con N-acetilgalactosamina o ácido sialico y N,N-diacetilcitobiosa, de hecho éstas fueron inicialmente empleadas para la purificación directa de Epo de orina. [40]

Cromatografía sobre *Rícinus communis* fue usada para liberar Epo salada de desialada, porque la última se enlaza a la lectina a través de residuos galactosil libres. [91]

Para purificar la Epo, al igual que sucede con todos los procesos de purificación, se buscaba una técnica simple, relativamente económica, eficiente para procesar volúmenes pequeños y grandes y que diera un buen rendimiento y recuperación de la hormona, al parecer la purificación de Epo sobre vidrio con poro controlado y ácido sialico reúne éstas características. [95]

4.2.- Propiedades fisicoquímicas

La Epo es una glucoproteína de bajo peso molecular 34000 daltons. Esta compuesta por cuatro diferentes carbohidratos (CHOS): cuatro complejos sacaridos tetraantennarios, en las posiciones 24, 38, 83 y 123. La importancia de estos sitios viene dada por la conservación en las Epos de ratón, mono y humano. [24]

Desde los primeros reportes acerca de esta proteína en 1969 se propuso la presencia de dos tipos de Epo, una con residuos de ácido sialico, y otra carente de éste la primera activa in vivo, y la segunda no. [22]

La Epo es una α -globulina relativamente estable al calor y al pH. La Epo humana en gel de poliacrilamida revela varios componentes de la proteína con pesos moleculares y propiedades antigénicas similares. [60, 86]

Se ha observado que Epo se encuentra entre las hormonas que presenta microheterogeneidad, sobre todo en el contenido de CHOS, dependiendo de las preparaciones. [60]

La heterogeneidad ha sido demostrada en diferentes sueros, encontrándose ésta no solo en su contenido de CHOS, sino también en la carga. [86, 88]

La heterogeneidad de carga ha sido estudiada por motilidad

Tabla 2.- Composición de la Epo

	Plasma de Carnero %	Orina Humana %
Carbohidratos	24	30
Acido Sialico	16-18 (a) [10%]	7.5
Manosa	11-12 [4 %]	13
Galactosa	18 [6 %]	total de
Glucosa	6 [2 %]	hexosas
N-acetilglucosamina	11-12 [4 %]	8.9
Proteinas	76	66
Cis	No detectada (b)	
Met	No detectada (b)	1.4 (c)
Arg	3 (a)	3.6
Tir	5	3.0
Val	8	5.8
Asp	----	9.5
Tre	----	6.9
Ser	----	6.4
Glu	----	12.5
Pro	----	11.1
Gli	----	6.2
Ala	----	7.2
Ile	----	5.4
Leu	----	12.5
Fen	----	2.9
His	----	2.0
Lis	----	3.6

a = residuos por mol

b = menos de 2 residuos por mol

c = moles / 100 moles recuperados

Nota: Esta caracterización fue lograda por Espada en 1972
[27]

electroforética sobre geles de agarosa , demostrándose que en un individuo pueden existir de 20 a 30 formas, lo cual es similar a las hormonas luteinizante, foliculo estimulante y gonadotropinas. [88]

Una de las razones a las cuales se ha atribuido esta heterogeneidad es que sea producida por sitios extrarenales.

En 1972 se llevó a cabo la primera caracterización parcial de la Epo obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 2.

En 1977 se llevó a cabo su purificación a partir de 2550 litros de orina de pacientes con anemia aplásica obteniéndose 10 mg de proteína con una potencia de 70,400 UI/mg de proteína en un rendimiento del 21%. [60]

El proceso de purificación incluyó: cromatografía de intercambio iónico, precipitación con etanol, filtración en gel y cromatografía de adsorción. [60]

El material purificado produjo una sola banda en electroforesis en gel con tritón X-100 a pH 6, y con SDS y mercaptoetanol a pH 7. [60]

Después del fraccionamiento final con hidroxilapatita se obtuvieron dos fracciones la α y la β de peso molecular y potencia similar pero ligeramente diferente en su motilidad a pH 9, toda la composición de aminoácidos de α y β es similar, sin embargo difieren en la composición de carbohidratos, Tabla. 3 [60, 77]

Tabla No. 3.- Carbohidratos para Epo α y β

Carbohidrato	Epo α	Epo β
Fucosa	4	4
Manosa	9	8
Galactosa	11	11
N-acetilglucosamina	12	9
Acido sialico	16	12

Composición de carbohidratos para las Epos alfa y beta, obtenidas por el metodo de Miyake et al. [77]

Acerca de las estructuras α y β al hacer corrimiento electroforético, se observa que α migra más rápidamente que β en gel de poliacrilamida a pH 9. [86]

Algunas de las propiedades de la Epo están resumidas en la Tabla 4.

Tabla No. 4.- Caracterización de la Epo

Proteína ácida	70% proteína
Punto isoeléctrico	30% carbohidratos 3.5 - 4.5
Peso molecular	34000 daltons (electrofo- resis en gel SDS)
Estabilidad	pH estable (rango de 3.0 - 9.0) Termoestable (se puede hervir durante 5 minutos)
Actividad específica	70400 UI/mg de proteína
Coefficiente de sedimentación	2.63 s
Absorbancia máxima	279 nm
Radio fraccional	1.58

[27, 91]

Como se puede observar la sialo Epo tiene un punto isoeléctrico de 3.5 a 4.0 en tanto que el de la desialada es de 5.0 a 6.0. [91]

La actividad biológica in vivo es destruida por un amplio rango de enzimas proteolíticas incluyendo: pepsina, tripsina, papaina, quimiotripsina A, elastasa, bromelina y una proteasa de Streptomyces griseum. [40]

La actividad de la Epo in vivo es perdida cuando los residuos de ácido sialico son removidos con neuraminidasas o hidrólisis ácida. [38]

Las enzimas tripsina y sialidasa causan completa inactivación de la Epo, indicando que la molécula contiene ácido sialico con un mínimo residuo de arginina o lisina. [38]

El tratamiento de la Epo con sialidasa, la cual remueve residuos de ácido N-acetilneuramínico terminal de la glucoproteína ocasiona la pérdida de la actividad biológica in vivo con actividad total medible in vitro. [24]

Cuando se ensayo Epo desialada en cultivos celulares de médula ósea se encontró que tenía completa actividad, lo cual indica que la Epo con o sin ácido siálico puede actuar sobre las células blanco. [91]

La oxidación de la asialo Epo con galactosa oxidasa restaura la actividad biológica in vivo. [40]

60% de los residuos de Epo urinaria ocurren como NeuAc α 2 3 grupo galactosa y los otros ocurren como NeuAc α 2 6 galactosa ligados, siendo el ácido siálico no solo importante para su aclaramiento, sino que también contribuye a la estabilización conformacional, ya que la asialo-Epo llega a ser sensible a la desnaturalización por calor y a la digestión por tripsina. [81]

Al ser deglucosilada la molécula con fluoruro de hidrógeno son removidos 75% de los carbohidratos. [38]

En presencia de 6-M-guanidina ó 2% de SDS no puede ser incorporada a Epo NEM (N-etil-2-mielamina) marcada, indicando que no tiene grupos sulfhidrilo libres, cuando se reducen los grupos sulfhidrilo se puede incorporar un poco de 6-M-guanidina. [38]

Los enlaces sulfhidrilo son importantes para el correcto funcionamiento de la molécula. [38]

Existe una pequeña región en la cadena polipeptídica susceptible a digestión por tripsina, quimiotripsina, v-8 proteasa y endoproteinasa. [38]

Tiene dos regiones fuertemente enlazadas o protegidas por cadenas de oligosacáridos, que son resistentes a proteólisis. [38]

Al ser cortada con tripsina, la molécula da origen a dos polipeptidos T1 y T2, con peso molecular aproximado de 16000, determinado en gel SDS, siendo el contenido de carbohidratos de T1 aproximadamente 3 veces mayor que el de T2; a pH 4 con pepsina se obtienen los mismos patrones. [86]

T1 y T2 no sufren proteólisis, lo que indica que ambas son

cadenas polipeptídicas solas y no contienen enlaces disulfuro. [86]

Se dice que contiene también residuos de iodotirosina y que es probablemente ésta región la del receptor a las células blanco ya que también es el sitio en donde se sabe tiene actividad inmunológica. [91]

La actividad biológica de la Epo no es alterada por hervirla varios minutos a pH neutro, pero su actividad in vivo es rápidamente reducida en condiciones fuertemente ácidas ó básicas. [38]

La reducción en condiciones de desnaturalización .provocan pérdida total de la actividad. [38]

La actividad de la Epo es usualmente reportada en unidades internacionales (UI). una UI fue definida inicialmente como la cantidad con la cual se produce el mismo estímulo de eritropoyesis que 5 μ mol de cobalto. [91]

En ensayos in vitro la potencia de la Epo es medida por la incorporación de fierro marcado a las nuevas células rojas formadas. [91]

Como se ha mencionado anteriormente ha sido identificada la estructura primaria de la Epo, encontrandose que las estructuras primarias de ratón, mono y humano son altamente homólogas (entre humano y mono se tiene un 90% de homología). [21, 75]

Se sabe que la molécula consta de 166 aminoácidos y contiene dos puentes disulfuro Fig. 6. [39]

Parece ser que en las regiones 102 y 109 se localizan dos zonas hidrofóbicas y que en la región 126 posee un oligosacarido O-ligado. [45]

En 1986 se presentó un reporte de como se llevó acabo la secuenciación de la Epo. Para determinar la secuencia completa de la estructura primaria de la Epo se emplearon 565 mg de Epo. encontrando lo siguiente:

Los residuos cargados constituan 27% del total y son irregularmente distribuidos, excepto que no hay residuos cargados en las regiones 77-88 y ambas regiones, la amino y carboxi terminal estan relativamente cargadas. [46]

Es interesante notar que aunque los residuos de prolina y glicina, los cuales se conoce que son altamente receptores de la

ala-pro-pro-arg-leu-ileu-cis-asp-ser-arg-val-leu-glu-arg-tir-leu-
 leu-glu-ala-lis-glu-ala-glu-asn-ile-ile-tre-tre-gli-cis-ala-glu-
 his-cis-ser-leu-asn-glu-asn-ileu-ile-tre-val-pro-asp-tre-lis-val-
 asn-fen-tir-ala-trip-lis-arg-met-glu-val-gli-gln-gln-ala-val-glu-
 val-trip- gln-gly-leu-ala-leu-leu-ser-glu-ala-val-leu-arg-gli-gln
 ala-leu-leu-val-asn-ser-ser-gln-pro-trip-glu-pro-leu-gln-gln-leu-
 his-val-asp-lis-ala-val-ser-gli-leu-arg-ser-leu-tre-tre-leu-leu-
 110 arg-ala-leu-gli-ala-gln-lis-glu-ala-ile-ser-pro-pro-asp-ala-ala-
 & ser-ala-ala-pro-leu-arg-tre-ile-tre-ala-asp-tre-fen-arg-lis-leu-
 fen-arg-val-tri-ser-asn-fen-leu-arg-gli-lis-leu-lis-leu-tir-tre
 gli-glu-ala-cis-arg-tre-gli-asp-arg.

Fig. 6.- Estructura primaria de la Epo que indica: Los puentes disulfuro (SH), los sitios de enlace de carbohidratos (*) N-ligados y (&) O-ligados así como la secuencia de aminoácidos. [39]

estructura α -helice y lámina- β , están fortuitamente distribuidos a través de toda la molécula, estos residuos no ocurren en las regiones 4-7 y 30-150 de lo que se deduce que un alto grado de la helice- α puede ser posible en estas regiones. [46]

Se reportan tres posibles sitios de N-glucosilación, en las posiciones 24, 38 y 83 de acuerdo a la presencia de asn-x-ser/thr y un sitio O-ligado en la ser [24, 81]

Los oligosacaridos N-ligados fueron identificados por la conversión de la Epo por la endoglucosidasa F (específica para el complejo de oligosacaridos aspargina ligados) de una glucoproteína con peso molecular de 34000 a una proteína con peso molecular de 22000. [38, 81]

Se ha puesto especial atención a los CHOS, dado que se ha visto son importantes para la biosíntesis y/o maduración de la Epo. [55, 61, 77]

La secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica es importante, porque al parecer ésta controla la síntesis de las cadenas de azúcar. [75, 81]

Como se puede observar, la Epo contiene cuatro residuos de cisteína (cis), asignando cis en las posiciones 7, 29, 33 y 161, de aquí se deduce que la Epo contiene dos puentes disulfuro formados entre cis 7 y cis 161 y el otro entre cis 29 y cis 33. [38, 46]

Es interesante notar que el segundo puente disulfuro, esta sandwichado entre dos sitios de glucosilación cercanos a aspargina 29 y aspargina 38. [46]

Al parecer la estructura secundaria esta compuesta por una buena parte de la helice α y otro tanto de la lámina β , aunque dependiendo del método empleado para evaluarla se obtienen porcentajes diferentes de cada una. Fig. 7. [46]

Las estructuras esperadas para la Epo, se pueden observar desde la distribución de los aminoácidos prolina, ácido aspártico y los residuos de ácido glutámico mostrados en la molécula de la Epo, estos residuos son altamente desfavorables para la estructura de la lámina β . [46]

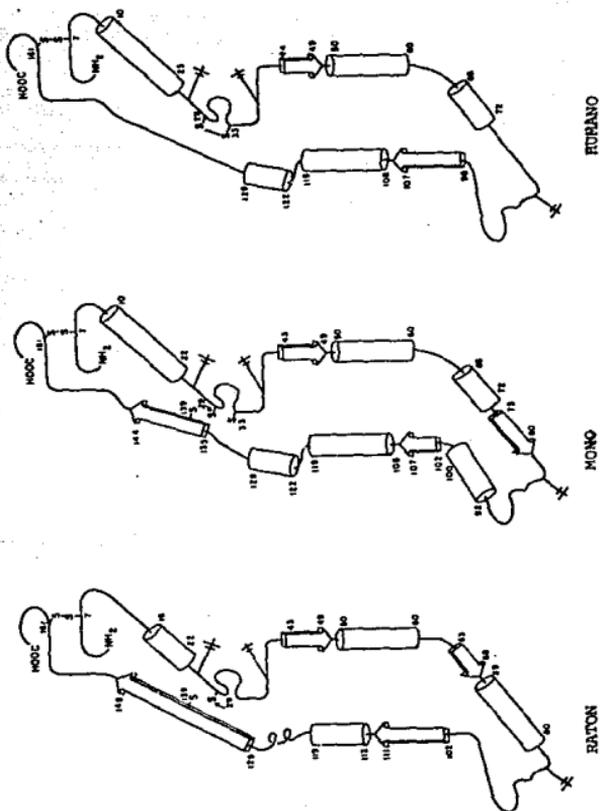


Fig. No. 7.- Estructura secundaria predicha para las Epos de tres mamíferos, humano, mono y ratón. Las helices alfa son indicadas con un cilindro y la lámina beta con una flecha. [46]

4.3. - Sitios de Producción

La síntesis de Epo ocurre inicialmente en el saco vitelino, sin embargo el hecho de saber si existe una Epo fetal y una adulta como en el caso de las Hb(α), ha sido descartado debido a que sólo se encuentra un gene estructural para Epo en el genoma humano. [22]

4.3.1.- Riñón

Para estudiar el origen de la síntesis de Epo inicialmente se emplearon las técnicas clásicas endócrinas, como son: escisión y reemplazamiento del órgano, notándose que en el adulto humano el riñón es el órgano asociado con la producción de Epo en tanto que en el feto es el hígado. [40]

En pacientes con falla renal y anemia asociada a ella se ha observado muestran bajos niveles o no detectables niveles de Epo, que los pacientes con anemia de severidad comparable debida a otra etiología. [25, 40]

El principal órgano de producción de Epo es el riñón, aunque no esta bien definido el sitio exacto de producción en éste. Se ha sugerido que el epitelio renal tubular es el sitio probable de producción de la Epo renal. [31]

Al no detectar Epo en extractos de riñón, se sugirió que el riñón produce un precursor inactivo, o un activador de enzimas el cual actúa sobre un precursor de la Epo en la sangre, en un sistema análogo al de la renina-angiotensina, en el que la Epo llegaba a ser el producto activo, comparable con la angiotensina II [79]

Al aislar riñones de perro y conejo se observó que éstos producían Epo en respuesta a estímulos hipóxicos, pero no logaron aislar Epo del riñón, sino más bien un precursor que producía Epo después de ser incubado con suero, y al cual llamaron eritrogenina o factor eritropoyético renal, sin embargo otros investigadores encontraron que los extractos de riñón normal de rata, buey, perro y conejo contenían Epo y no un precursor de la "hormona". [40]

Cuando la Epo no había sido obtenida de extractos renales se

penso en la posibilidad de que la hormona fuera activada extracelularmente o secretada en el espacio intersticial inmediatamente después de que la glucosilación terminal era completada. [78]

Al no encontrar Epo en riñón se empezó a usar lo que se llama la hipótesis de la eritrogenina. De acuerdo a ésta hipótesis los riñones hipóxicos liberan un enzima lisosomal (eritrogenina) la cual libera Epo de una α -globulina (eritropoyetínógeno) en el plasma. [11, 78]

Se propuso que la eritrogenina presente en el riñón es liberada en respuesta a hipoxia renal y activa un eritropoyetínógeno que puede estar presente en el plasma normal. [78]

Una posible respuesta de porque no se encontró Epo en el riñón es la presencia de algún inhibidor, debido a que extractos del riñón que contengan lípidos pueden inactivar a Epo. [78]

Al evaluar en un sistema in vitro por inmunofluorescencia directa, se observó Epo en el epitelio glomerular del riñón.

Experimentos realizados con riñones aislados de conejos, perros y mandriles han demostrado que pueden producir Epo. [40]

La deducción de que la Epo se produce en el riñón surgió a partir la realización de una nefrectomía bilateral, la concentración de Epo disminuía reteniéndose un 10% de la producción, la cual es pérdida cuando se hace hepatectomía parcial (70%) y se recupera conforme va regenerándose el hígado. [31]

El hecho de que se logró extraer Epo de riñones de roedores después de la exposición a hipoxia, hipobaría, sangrado y tratamiento con cobalto, llevó a la conclusión de que efectivamente el riñón era el productor de la Epo. [28]

Aunque no está claramente definido el sitio exacto de producción en el riñón, al obtener Epo de el sobrenadante de riñones homogeneizados se centrifugó de 2000 a 16 000 g y en los paquetes obtenidos se encontró Epo, indicando que la hormona se encuentra en la fracción compuesta por los microsomas y el fluido intra y extracelular. [25, 48]

Se ha reportado que el 70% de de la Epo activa in vivo se

encuentra en el fluido extracelular del riñón libre de sangre. [25, 48]

Varios investigadores han obtenido una actividad generadora de Epo de la fracción lisosomal de homogeneizados de riñones hipóxicos cuando estos son incubados con suero de animales normales, pero no tienen una actividad eritropoyética intrínseca.

Por otro lado el rNAm que codifica para la Epo fue aislado del riñón de mandriles anémicos y tradujo Epo en oocitos de *xenopus laevis*. [91]

Debido a lo altamente irrigada que esta la corteza renal, se debería de suponer que ésta es relativamente insensible a pequeñas variaciones de oxígeno, en cambio la punta de la médula renal es relativamente hipóxica y por tanto ser esta la zona que funja como aparato sensible al oxígeno. Sin embargo algunos investigadores han aislado más Epo de corteza que de médula, aunque los restos de la "hormona" extraídos de la médula puedan ser derivados de fluido tubular. [11]

Se ha reportado que no existe actividad de Epo en la linfa de los nódulos, lo cual es muy importante ya que la linfa renal es producida por la corteza. [78]

Debido a que la sangre venosa renal está relativamente bien oxigenada se asume que las células de la corteza renal reciben suficiente oxígeno, sin embargo mediciones con microelectrodos revelan áreas con muy baja tensión de oxígeno en la corteza renal de perro y rata. [78]

La tensión de oxígeno bajo marcadamente durante la anemia en la corteza mientras que la normalmente baja tensión de oxígeno en la médula tendió a incrementar. [40]

Aunque no han sido bien definidas las células que producen Epo, estudios en inmunofluorescencia histoquímica han mostrado que los anticuerpos a Epo enlazan selectivamente a las células glomerulares de riñón de borrego y humano. [91]

La localización exacta de las células que producen Epo ha permanecido controversial. Estudios de hibridación in vitro han sugerido que el mRNA para la Epo en el riñón está localizado en las células peritubulares. [74]

Se ha sugerido que las células que contienen el mRNA para la Epo están en la base de la membrana de los túbulos renales,

siendo candidatas las células de los capilares tubulares, sugiriéndose además que solo una subclase de los capilares peritubulares contienen mRNA-Epo. [51]

Lo anterior fue llevado a cabo mediante una hibridización "in situ" las células fueron encontradas primeramente en la región cortical del riñón, no del glomerulo, pero si en el área peritubular. [51]

Se ha favorecido la opción de que la Epo tenga un origen tubular debido a que ha sido aislada tres veces más Epo de la masa tubular que de cualquier otra región del riñón.

4.3.2.- Sitios Extrarenales

En 1964 Nathan et al. reportaron datos de pacientes nefrectomizados en los cuales después de la nefrectomía disminuía el hematocrito, pero después se recuperaban. De allí se pensó que había otros factores extrarenales que regulaban la producción de Epo, aunque éstos no siempre llegaban a tener los valores de un individuo normal, sugiriéndose entonces que la producción de Epo por sitios extrarenales esta regulada por la demanda de oxígeno. [28]

Se ha reportado que 5 a 10 % de la Epo del plasma proviene de sitios extrarenales, siendo el hígado el principal productor de Epo extrarenal. [25, 28]

Durante la primera semana anterior al nacimiento y durante la vida fetal, el hígado es el principal órgano eritropoyético, conservando parte de su actividad (10%) aún después del nacimiento y sirviendo como órgano eritropoyético cuando se dan enfermedades que afecten el buen funcionamiento del riñón, como en el caso de la falla renal aguda o bien nefrectomía. [28]

Se ha pensado en las células de Kupffer como el sitio de producción de Epo en el hígado. En 1984 se reportó la producción de Epo en las células de Kupffer de ratas adolescentes. [28]

Además se ha pensado en los macrófagos como origen local de Epo en los tejidos eritropoyéticos. [28]

Otro sitio extrarenal que ha sido propuesto como productor de Epo es la glándula submandibular. Títulos positivos fueron

encontrados en animales a los que se les sometio a hipoxia en los túbulos secretores de la glándula submaxilar. [25]

En gatos los cuerpos carótidos se han asociado también con una actividad estimuladora de la eritropoyesis. Se ha reportado que el remover los cuerpos carótidos causa incremento en la producción de Epo en gatos, ratas y conejos expuestos a hipoxia hipobárica. [40, 91]

La síntesis de Epo ha sido también asociada con neoplasma renal, de sistema nervioso central, útero, adrenal, ovario, pulmón y timo. Infiriendose que el mecanismo que controla la producción de Epo no puede ser el mismo en todos los casos; sugiriendose que pueden producir hormonas como resultado de vasoconstricción ó inducir isquemia renal localizada o bien ser producida directamente del riñón. [22]

4.4. - Biosíntesis de eritropoyetina

El control fisiológico y fisiopatológico de la Epo no esta claramente definido, la hipoxia parece ser el factor fundamental para su producción; postulandose que está regulada por un nivel de oxígeno en un sensor celular eritrocítico. [47]

Al probar la producción de Epo por riñones hipóxicos y normóxicos, se observó que se producía más Epo en los hipóxicos, lo que indica que el riñón está involucrado en el mecanismo de sensibilización de oxígeno el cual controla la producción de Epo [28]

4.4.1.- Teorías Propuestas

Se postuló la existencia de un factor liberador de Epo producido por SNC, pero no pudo confirmarse. [78]

Otros investigadores propusieron que el riñón produce una enzima activadora de Epo que actúa sobre un sustrato producido en algún otro sitio, por ejemplo el hígado. [78]

También se postuló la teoría de que se produce una prohormona en el riñón y que se activa en el plasma. [78]

Por último se propuso que el riñón produce tanto la hormona

como un inhibidor, éste último activado por el plasma. [78]

Por otro lado se ha postulado que:

- 1) El incremento de Epo en la circulación es el resultado de la síntesis de novo de proteínas y no solo la liberación de la hormona almacenada.
- 2) Una vez disparada la síntesis de la hormona, continua algún tiempo después de la terminación de las condiciones hipóxicas.
- 3) El disparo inicial de la síntesis de la hormona probablemente involucra síntesis de DNA dependiente de RNA. [22]

4.4.2.- Mecanismos más aceptados

Se han asumido dos fases en la producción de Epo

- 1) La sensibilización de oxígeno y
- 2) La síntesis de la hormona.

Se ha observado que al aumentar o disminuir la hipoxia los túbulos renales son los encargados de regular el nivel de Epo. [68]

El efecto no depende de la tensión de oxígeno en la sangre o en la saturación de Hb, pero si de la tensión de oxígeno en los tejidos; encontrándose que los niveles de Epo en los ratones anémicos disminuye hasta niveles no detectables después de la exposición a oxígeno hiperbárico. [68]

Cuando hay baja afinidad de Hb por el oxígeno, entonces el oxígeno baja en los tejidos y se incrementa la Epo. [40]

Las grandes alturas provocan hipoxia aguda, entonces la Epo se incrementa en el plasma llegando a sus niveles más altos después de la exposición por 18 hrs. a 4360 m. [40, 66]

Se ha observado que durante la hipoxia se tiene una presión de oxígeno menor de 25 mmHg. Aunque la producción de Epo correlaciona inversamente con el nivel de oxígeno, aún no esta bien esclarecido el mecanismo por el cual las células sienten y responden a la hipoxia. [73]

En lo que respecta a su producción durante la hipoxia y algunos otros mecanismos como la anemia, la isquemia, la hipobaría y agentes químicos como el cobalto, se ha propuesto un mecanismo que involucra la producción de adenosina después de la hipoxia. [73]

Fisher ha propuesto que la secreción y biosíntesis de la Epo puede ser iniciada por la hipoxia a través de la liberación de varios agentes químicos que activan receptores en la membrana celular incrementando las proteínas estimuladoras (Gs) de Epo, éstos agentes pueden ser: las prostaglandinas E₂ e I₂ (PGE₂ y PGI₂) un derivado de la prostaglandina E₁ como es la 6-ketoprostaglandina E₁ (6kPGE₁), radicales del oxígeno como son peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ión superóxido (O₂⁻) y agonistas β₂ adrenérgicos (β₂-Adr-Ago). [31]

Las proteínas Gs activan la adenilato ciclasa, la cual incrementa el AMPc, el AMPc activa a la cinasa A para llevar a cabo la fosforilación de proteínas, importantes en los estados de transcripción y traducción de la biosíntesis y/o secreción de Epo. [31]

Los mensajeros externos activan los receptores de membrana sobre la superficie de las células que producen Epo iniciando una cascada de eventos dentro de la célula, lo que hace que se liberen segundos mensajeros, tales como calcio, AMPc e inositol fosfato. [31]

Propone que éstos agentes son liberados por la hipoxia dependiendo de la severidad del estímulo. Las prostaglandinas y los agonistas β₂ adrenérgicos probablemente juegan el papel de mediador del estímulo, mientras que la adenosina y los radicales libres de oxígeno pueden estar involucrados en estímulos hipóxicos severos; pudiendo actuar solos o en concierto, para disparar los receptores de membrana que activan a una proteína G estimuladora de la membrana, permitiendo la activación de la adenilato ciclasa, que genera AMPc a partir de ATP, causando disociación de la unidad reguladora de la protein cinasa A. [31]

Importantes fosfoproteínas generadas a partir de protein cinasa A en el riñón pueden permitir tanto el incremento en la biosíntesis de Epo a nivel de transcripción del mRNA en la células renal así como liberar la Epo de éstas células. Fig. B [31]

El mismo mecanismo fue descrito anteriormente por Fisher, pero involucrando otros factores. En éste, los estímulos son los mismos, todos ellos conducen a hipoxia la que a su vez nos va a estimular el sensor de oxígeno localizado en los túbulos

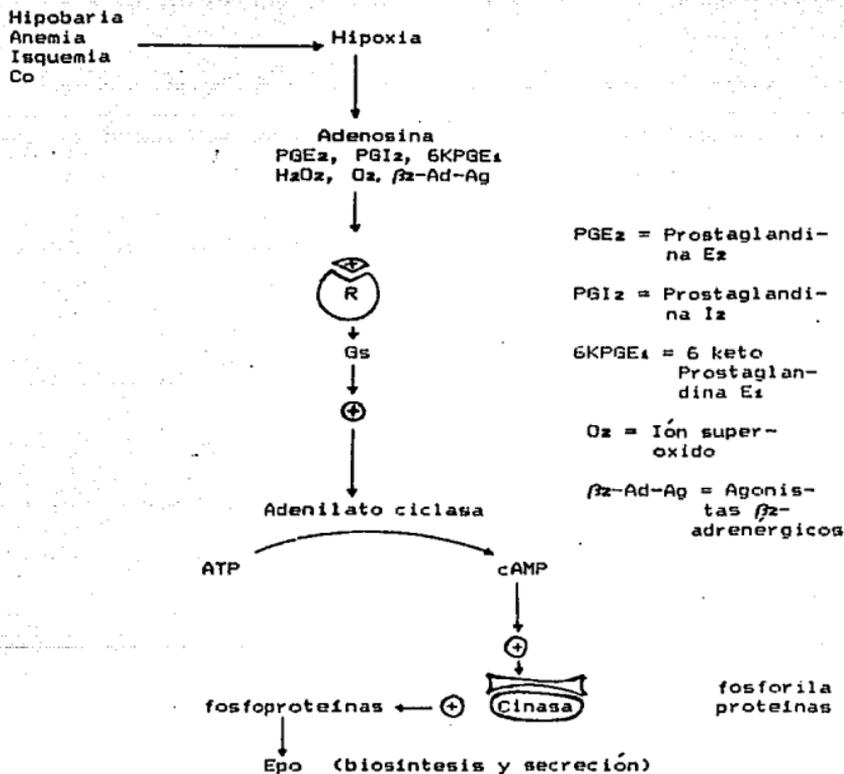


Fig. 8. - modelo esquemático del papel de los mensajeros externos e hipoxia en la producción de Epo por el riñón. La respuesta a la hipoxia es la síntesis y liberación de adenosina por el riñón. Cabe resaltar que las fosfoproteínas son importantes para la transcripción y/o traducción de la biosíntesis y/o secreción de Epo. [31]

glomerulares y ante el cual éstos producirán prostaglandinas. [30]

Las prostaglandinas van a activar a la fosfolipasa que hará que los fosfolípidos pasen a araquidonato y éste estimule a la ciclooxigenasa que dará origen a los endoperoxidos, como son el peróxido de hidrógeno, y el ión superóxido activando prostaciclina I₂ y prostaglandina E₂ que a su vez estimularán la adenilato-ciclasa para transformar el ATP en AMPc y a través de éste segundo mensajero activar la protein cinasa que nos llevará finalmente a la fosforilación de proteínas y a la biosíntesis de la Epo. [30, 64, 84]

Al mismo tiempo que se activa la fosfolipasa, se incrementa el GMPc conduciendo a una labilización de la membrana lisosomal, entonces el riñón libera hidrolasas lisosomales que nos activarán la fosforilación de proteínas, conduciendonos finalmente a la biosíntesis de la Epo. Fig. 9 [30]

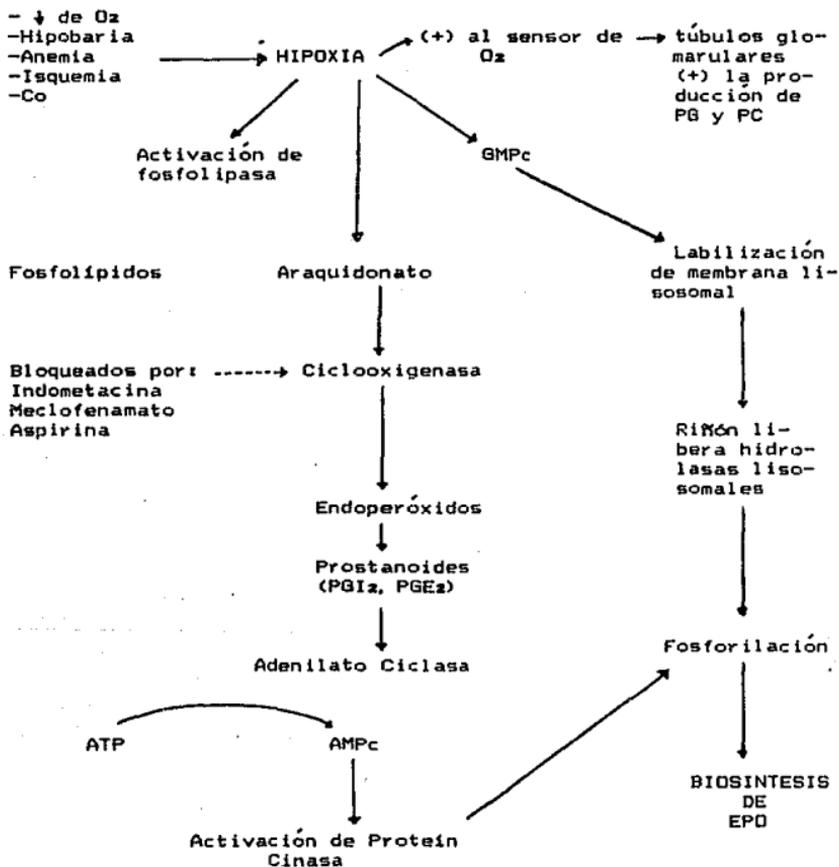
En la hipoxia las células tubulares y glomerulares responden produciendo prostaciclina, aunque se ha reportado que la PGI₂ es también producida por las células mesangiales, indicando que los prostanoídes más abundantes como es la 6-keto PGF₁ es producido en las células del endotelio vascular. [30]

En la liberación de las células lisosomales está involucrado un evento colinérgico relacionado con un incremento del GMPc en las células renales, el cual después de la fosforilación activa la protein cinasa siguiendo la estimulación prostanoide de la adenilato ciclasa renal; resultando con ello un incremento en la biosíntesis de la Epo. [10, 30]

Hasta ahora se ha reportado que el parámetro más importante en la síntesis de la Epo es la relación entre la demanda de oxígeno y la tensión de oxígeno en las células renales.

Es desconocido el mecanismo de traducción de la hipoxia para el reclutamiento de las células renales productoras de Epo.

Entre las teorías que se han propuesto acerca de como el oxígeno estimula la producción de la Epo esta la siguiente: Cuando el hierro en el centro de la porfirina se enlaza al oxígeno entonces la Hb cambia de una configuración deoxi o tensa (T) a una oxi o relajada (R), cuando la tensión de oxígeno es suficientemente baja esta hemoproteína esta en conformación



(+) = estimula

Fig. 9.- Modelo Esquemático de la influencia de los mensajeros externos y las prostaglandinas, propuesto por Fisher [30]

deoxi, con lo cual se dispara la producción del gene para Epo, cuando hay suficiente oxígeno la hemoproteína esta en posición oxi y no estimula la producción de Epo. [36]

Sobre la base de muchos experimentos se ha postulado que la hipoxia renal puede dar como resultado la liberación de prostaglandina E la que a su vez puede incrementar el AMPc y así la síntesis de Epo [31]

Se ha reportado que al adicionar AMPc a ratones, se incrementa la producción de Epo y la masa de eritrocitos. El AMPc puede actuar a través de la disminución de calcio intracelular porque el cobalto que estimula la producción de Epo es en general un inhibidor de los canales de calcio y con la disminución de calcio en el medio se incrementa la producción de Epo por las células de carcinoma renal in vitro. [44]

El traductor químico para la hipoxia ha sido difícil de estudiar en células hepáticas o renales, debido a que no se tiene bien claro las células productoras de Epo en estos sitios y a la falta de purificación de las mismas. [31]

Sin embargo han sido encontradas varias líneas celulares que responden a la producción de Epo después de la hipoxia. De las cuales las más empleadas para estudiar el mecanismo de acción de la Epo han sido las células Hep-3B (línea celular de carcinoma hepático). [68]

Cuando los animales son sometidos a hipoxia el mRNA se acumula muy rápidamente en el riñón y llega a ser detectable después de una hora de estimulación de la hipoxia. [31]

Cuando se clona el gen que codifica para la Epo y pudo analizarse, se propuso que las regiones más altamente conservadas, como son partes iniciales del primer exón y primer intrón y la parte no traducida del quinto exón resultan ser muy importantes para la expresión del gene y que los elementos que responden a la hipoxia se localizan al final de una región de 120 pares de bases (pb) del sitio de poliadenilación, confirmandose que la hipoxia regula primeramente a nivel de transcripción. [6]

5.- MECANISMO DE ACCION DE LA ERITROPOYETINA

Debido a la dificultad que anteriormente se tenía para poder obtener la "hormona" purificada, por las razones anteriormente expuestas, poco fue lo que se pudo elucidar hasta hace algunos años acerca del mecanismo de la Epo, e incluso en la actualidad no se tiene la última palabra acerca de esto.

5.1.- Mecanismo de acción sobre células blanco.

En animales intactos, la administración de Epo o el incremento en su secreción endógena, normalmente induce policitemia. Este efecto de la Epo está mediado por la estimulación de la formación de una nueva generación de pronormoblastos y de la proliferación de células menos maduras responsivas a Epo. [40]

Los efectos intracelulares de la Epo incluyen el desarrollo de sistemas para la síntesis de Hb, no presentes en los precursores tempranos de los eritrocitos. Estos incluyen la síntesis de RNA y la estimulación para la incorporación de hierro inicialmente en la célula y posteriormente en la Hb. [40]

El papel de la Epo como factor de crecimiento es estimular la actividad mitótica de las células progenitoras eritroides tales como: BFU-E y CFU-E y actuar como factor de diferenciación disparando la diferenciación de CFU-E a proeritroblasto. [23]

Hasta 1989, a pesar de que la Epo se tenía pura poco se sabía acerca del mecanismo por el cual induce la proliferación y diferenciación de los eritroblastos. [23]

Se ha reportado que la Epo actúa a tres niveles:

1) Incrementa el número de CFU-E induciendo su maduración y producción de células.

Esto es probablemente, debido a que al incrementar la concentración de Epo, recluta el sistema de células eritroides que son menos sensibles a bajos niveles de Epo posiblemente

porque ellos tienen pocos receptores, pues es sabido que Epo actúa sobre un receptor de Epo y estimula la transcripción.

2) Incrementa el contenido de Hb de los eritrocitos.

La Epo actúa sobre progenitores eritroides maduros. In vitro induce la síntesis de RNAm para la globina e incrementa la concentración de Hb en las células rojas individuales. Así mismo puede disminuir el tiempo de generación de células rojas y brincarse las divisiones celulares por influencia de la Epo.

3) Promueve la liberación temprana de los eritrocitos de la médula ósea.

Altos niveles de Epo estimulan la liberación de las células rojas maduras de la médula.

Con altos niveles de Epo los eritrocitos son enviados a la circulación.

El alcance de la liberación de la médula es proporcional a la severidad de la anemia y presumiblemente al nivel de Epo.

Este cambio se refleja en el corto tránsito en la médula (definido como el intervalo en el cual 50% de las células periféricas desaparece de la circulación).

Así el tránsito normal es de 80 hrs y puede ser reducido a 36 en pacientes con anemia severa. [22]

En la Fig. 10 se ilustra la forma posible de como la Epo lleva a cabo el control fisiológico de la producción de eritrocitos. [26, 48]

Hasta ahora el mecanismo por el cual Epo induce proliferación y transformación blastoide no está esclarecido, se sugiere que ésta puede causar directamente una depresión de la proliferación del RNAm que codifica la enzima clave para la síntesis de Hb, tal como la ácido δ -aminolevulínico sintetasa (ALA). [38]

Aunque también es posible que actúe sobre la transcripción del DNA activando a la adenil ciclasa de la membrana que a su vez incrementa la producción de AMPc un segundo mensajero común en la acción hormonal. [31]

La interacción de las hormonas con las células y cómo éstas transmiten el mensaje al núcleo ha sido estudiada, estableciéndose que primero sucede la interacción con el receptor de superficie específico, para las hormonas. La mayoría de los

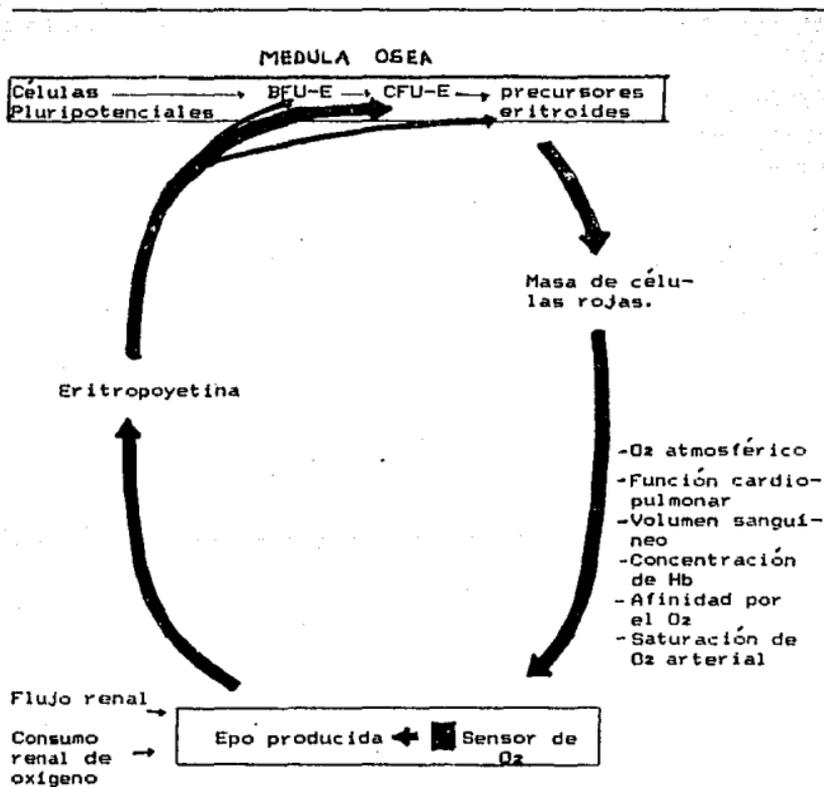


Fig. 10.-Esquema de como la Epo lleva acabo el control fisiológico de la eritropoyesis (se ilustra el mecanismo de retroalimentación). [48]

enlaces son llevados a cabo en la superficie y entonces la hormona es degradada y el receptor internalizado, sin embargo en el caso de la Epo la "hormona" es internalizada (por endocitosis), esto fue observado al poner en contacto células de eritroleucemia murina (inducida por el virus Friend) con 125 I-Epo midiendo la cantidad de Epo enlazada, y después del tratamiento con pronasa los productos de degradación. [37, 70]

Al parecer el enlace de la hormona a su receptor se lleva a cabo en un minuto y la internalización de la "hormona" ocurre 5 minutos después de su adición a las células, dando origen a un incremento en la acumulación de calcio y la ocupación de los sitios de enlace por 125 I-Epo. El enlace es reversible y la Epo es degradada 90 minutos después de ser removida. [70]

Aún con estos estudios era poco lo que se sabía acerca de los eventos intracelulares después de la unión de la Epo a su receptor en la célula blanco.

Los cambios ocurridos en la Epo por el calcio intracelular duran de 3-5 minutos, indicando que la membrana celular se abre mediada por la difusión de un segundo mensajero, más que por la liberación de sustancias almacenadas intracelularmente por inositol trifosfato. [57]

Las dos señales prototipo activadas por los receptores de las hormonas peptídicas son:

- a) la ruta de calcio / fosfolípidos dependiente de protein cinasa C (PKC) y
- b) la ruta del AMP dependiente de PKC . [79, 80]

En 1991 Spangler reporta que la Epo induce la activación inmediata del gene c-myc, requiriendo PKC y que el enlace de Epo causa rápida fosforilación del sustrato de PKC. [79]

Las señales prototipo de PKC se pueden identificar mediante el uso de bloqueadores específicos (inhibidores de la actividad fosfotransferasa de PKC) tales como derivados de la isoquinolina H7. La adición de H7 y otros bloqueadores específicos de PKC como son: staurosporina (alcaloide microbiano), esfingosina (componente natural de la membrana celular) y la sangivamicina (nucleótido analogo a la esfingosina) a las células EMSII (transformadas por el virus Raucher) antes de adicionar Epo bloquea c-myc, deduciéndose que Epo activa PKC, además de que Epo

incrementa la fosforilación de una proteína de 80 Kd y punto isoeléctrico de 4.8, coincidiendo éste con el sustrato principal para PKC. [79, 80, 82]

La Epo actúa a través de la unión a un receptor de la célula blanco. In vitro ataca al vidrio y no pierde su capacidad de estimular la síntesis del hem. [91]

La forma y los detalles de como la Epo estimula a sus receptores, aún no esta completamente esclarecida.

Se ha creado cierta controversia con respecto a los receptores para Epo sobre la célula blanco pues se ha reportado que tiene pocos sitios receptores, pero la discrepancia radica en el hecho de que si los receptores para Epo son de baja o alta afinidad y de cuales son los importantes para la unión de la Epo a la célula blanco.

Al poner en contacto células de eritroleucemia murina producida por el virus Friend (que se ha demostrado responden en cultivo a Epo para diferenciarse en reticulocitos y eritrocitos), con ^{125}I -Epo, se observó que las células presentaban de 800 a 1000 receptores de superficie, encontrando que 300 son de alta afinidad ($K_d=0.09\text{nm}$) y los restantes de baja afinidad ($K_d=0.57\text{ nm}$) a 4°C y que este enlace incrementa aproximadamente dos veces cuando se incubaba a 37°C . [70]

Se sugiere que los receptores de alta afinidad, son importantes para que se lleve a cabo la completa actividad de la hormona, al analizar una línea celular de eritroleucemia murina que no responde a Epo, se observó que solo presentaba receptores de baja afinidad. [70]

En contraste con los reportes anteriores, se ha reportado que las células blanco para Epo poseen un solo tipo de receptores. [13, 14]

Lo anterior se hizo examinando los receptores para Epo durante la maduración y diferenciación normal eritroide, desde la BFU-E hasta el reticulocito.

A diferencia de estudios anteriores, en este caso se emplearon células frescas de aspirado medular, muestras de hígado fetal y reticulocitos de sangre periférica. Los receptores fueron cuantificados con ^{125}I -Epo por RIA, encontrando que los eritroblastos de hígado fetal y médula ósea solo exhiben un solo

sitio de enlace de alta afinidad ($K_d=100\text{pmol/l}$) y de 135 a 250 receptores por célula, en tanto que las BFU-E presentan receptores de un poco menor afinidad ($K_d=210-220\text{ pmol/l}$) y los reticulocitos no presentaron receptores. [14]

Por otro lado se realizaron análisis de los receptores para Epo a partir de células de bazo de ratón anémico de lo cual se obtuvieron: eritroblastos inmaduros, eritroblastos maduros, células rojas nucleadas, neutrofilos, eosinofilos, linfocitos y macrófagos; con porcentajes respectivos de 24, 50, 12, 8, 3 y 3 %; Obteniendo los resultados mostrados en la tabla No. 5. [33]

Tabla No. 5.- Receptores para Epo

Célula	%	Densidad (receptores/célula)
Eritroblastos inmaduros	24	910
Eritroblastos maduros	50	400
Células rojas nucleadas	12	210
Neutrófilos	8	---
Eosinófilos	3	---
Linfocitos y Macrófagos	3	---

Densidad de receptores para Epo, en células de bazo de ratones hechos anémicos por fenilhidrazina [33]

Demostrando que el enlace es proporcional al número de células, llegando a su máximo a los 60 min de incubación. [71]

Akahane realizó experimentos con diferentes células de médula ósea encontrando resultados similares. Tabla No. 6 [2]

Wognum analizó la evolución de los receptores para Epo en las células CD34 de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica, corroborando que los receptores para Epo

desaparecen con la maduración de las células eritroides. [89]

Tabla No. 6.- Receptores para Epo

Célula	Promedio de receptores estimados por célula
Proeritroblasto	390
Eritroblasto basófilo y policromatófilo	190
Eritroblasto ortocromático	< 20
Células mieloides	< 20
Linfocitos	< 10
Otras	< 10

Distribución de los receptores para Epo en las células de la médula ósea [2]

Aún es desconocido si existen uno o dos tipos de receptores para Epo.

Se pensó que el clonar el gene que codifica para el receptor de Epo (EpoR) ayudaría a tener su mecanismo de acción en la estimulación del crecimiento y diferenciación de los progenitores eritroides. [63]

Sin embargo, al clonar el gene que codifica para EpoR se observó que aunque se clonó un solo gene, éste codifica para dos receptores, uno de alta y otro de baja afinidad, asumen que esto puede ser debido a una variabilidad de los CHOS, a una modificación del receptor en el citoplasma, pudiendo ocurrir una fosforilación ó bien interactuar con algunos polipéptidos endógenos. Además encontraron que la molécula clonada presenta discrepancia con los reportes anteriores, acerca del peso molecular del receptor. [23, 47, 56, 63]

Se propone que el EpoR se encuentra tanto dentro como fuera de la célula, pues se observó que posee muchos residuos básicos, lo cual es común en la fase citosólica de los segmentos que están en el espacio transmembrana de muchas proteínas. [23]

Posee una parte hidrofóbica de 23 aminoácidos en el segmento entre los aa 250 a 272, lo que sugiere que el receptor tiene una región amino terminal exoplásmica y una carboxi terminal citoplásmica, características de una proteína transmembrana tipo I. [23]

Debido a que son muy pocos los receptores expresados para Epo sobre la superficie de la célula y la vasta mayoría esta sobre la membrana intracelular ha sido muy difícil analizar la estructura funcional de los receptores de la superficie celular. [16, 94]

Se ha reportado que el EpoR es sintetizado como una especie principal de 64 kd, llevando oligosacáridos de manosa N-ligados y una especie menor deglucosilada de 62 kd y que la forma de 64 kd es procesada a una forma madura de 66 kd con azúcares tipo complejo de la cual una fracción muy pequeña está por algún tiempo sobre la superficie de la célula; las tres formas son degradadas rápidamente teniendo una vida media de 40 min. [94]

El hecho de que exista heterogeneidad en los receptores, o bien que se hable de un precursor puede deberse a que recientemente se han encontrado dos clases de DNA para los receptores de Epo, uno que codifica para los auténticos receptores de membrana y otro para receptores solubles carentes de dominio transmembrana y citoplásmico. [83]

Por otro lado, se reportó que estructuralmente el gene para EpoR es un miembro de una familia de genes con propiedades compartidas con los receptores para It1-1, It1-6, GM-CSF y otras citocinas. [5, 59]

Son pocas las células que se unen a la Epo en la médula. Se ha reportado que las células BFU-E tienen menos receptores para Epo que las CFU-E y que el número de receptores para BFU-E incrementa conforme ésta madura. Los análisis de células de médula ósea indican que el enlace específico de Epo es mayor en los pronormoblastos y declina durante la maduración de las células eritroides. [72]

Al realizar experimentos in vitro se ha observado que si se emplean anticuerpos anti-Epo y Epo marcada con I^{125} la superficie marcada disminuye con el estado de maduración de las células, siendo más extensa sobre las células primitivas no diferenciables

y sobre el eritroblasto policromatófilo temprano. [70]

Los eventos siguientes a la unión de la Epo al receptor no están claramente definidos.

Aparentemente el efecto nuclear más temprano inducido por la Epo es a nivel de la transcripción, ya que la síntesis de RNA es rápidamente estimulada. El efecto de la Epo sobre la transcripción está posiblemente mediado por una proteína citoplasmática que actúa sobre un segundo mensajero intracelular sobre RNA polimerasas. [91]

La administración in vivo de Epo resulta en una activación secuencial de las RNA polimerasas nucleares en el bazo de ratones policitémicos. [91]

Es asumido que los diferentes tipos de RNA son producidos subsecuentemente incluyendo el RNA de globina siguiendo la síntesis de RNA y DNA, la división celular y en eritroblastos la captación de hierro y síntesis de Hb. [70, 91]

Todos los efectos arriba mencionados fueron producidos por la Epo humana sobre cultivos de médula ósea de rata y ratón.

En experimentos realizados sobre la línea celular 32D, (línea celular de ratón) para evaluar la expresión de gene para EpoR en la diferenciación eritroide, midiendo los niveles de mRNA de rEpo, la proteína receptora y la aparición del EpoR sobre las células; se encontró que el principal paso regulador que determina la respuesta específica eritroide a Epo no es la simple activación del gene que codifica para el receptor, sino la eficiencia de la traducción de la proteína receptora a Epo en la superficie celular. Esta dependencia puede ser debida a la cantidad de Epo disponible, o al procesamiento específico del mRNA del EpoR. [59]

Otros procesos celulares que son activados en asociación con la acción de la Epo son: acetilación y metilación de proteínas nucleares, incorporación de glucosamina, flujo transmembrana de la síntesis de proteínas de membrana y producción de nucleótidos cíclicos. [59]

Algunos autores han observado un incremento en los niveles de AMPc en las células estimuladas por la Epo. [31]

Los efectos de la Epo sobre los niveles de GMPc parecen ser secundarios a los cambios cíclicos inducidos en la célula. [31]

Coincidiendo con otros autores, por estudios histoquímicos e in vivo se ha sugerido que CFU-E es la primera célula blanco de la Epo. [91]

Hay que notar que la disminución de la Epo se da antes de que la masa de células rojas sanguíneas incremente considerablemente. [26]

El hecho de que haya un mecanismo de feedback es soportado por la razón de que los títulos de Epo son usualmente más elevados en pacientes con hipoplasia de médula ósea que en los pacientes con eritropoyesis activa. [26]

El papel del hígado en el aclaramiento de la Epo no ha sido bien entendido, pero se sugiere que debido a la desialización de la molécula está exponga los azúcares dando la pauta para el aclaramiento. [31]

Por otro lado, es sabido que las glucoproteínas se encuentran en el plasma por ello se piensa que los carbohidratos le sirven como etiqueta para abandonar la célula que la produce y que por esta misma razón cuando los residuos osídicos más externos se separan el hígado reconoce que las proteínas se han vuelto incompletas, las fija sobre receptores específicos y las destruye. [3]

6.- REGULACION DE LA PRODUCCION DE ERITROPOYETINA

6.1.- Factores que estimulan

La Epo está regulada por un mecanismo de feedback, sin embargo además de los factores endócrinos que se encargan de la regulación de la Epo existen factores externos, como son factores químicos que estimulan o inhiben por lo general indirectamente la producción de Epo.

Se ha reportado que las demás hormonas juegan un papel importante en la producción de la Epo y este puede ser llevado a cabo de dos formas.

- 1) Pueden influenciar la producción de la Epo pero en si no estar involucradas en el proceso de hipoxia.
- 2) Pueden actuar como un intermediario obligado en la cadena de eventos que permiten la producción de Epo en la hipoxia. [91]

En el último caso la hormona puede no estimular la producción de la Epo pero puede ser liberada por si sola en un proceso oxígeno dependiente. En adición la inactivación de la hormona puede abolir la respuesta de la Epo a la hipoxia. [91]

Varias evidencias sugieren que las prostaglandinas juegan un papel importante en el mecanismo por el cual la hipoxia produce la estimulación de la producción de la Epo. [22]

Las prostaglandinas del tipo E y A así como la prostaciclina 2 (PGI 2) y un metabolito estable el 6-keto-PGE₁ estimulan la eritropoyesis in vivo, mientras que las prostaglandinas del grupo F la inhiben. [28]

La PGE₁ estimula la actividad de la fosfolipasa A₂. Se sabe que las prostaglandinas particularmente de la clase E son potentes vasodilatadores y se ha prestado atención en su relación al flujo de sangre renal. [28]

Al administrar PGE₁, PGE₂, y PGF_{2α} a dosis de 1 μg/g de peso corporal se incrementa o estimula significativamente la

eritropoyesis en ratones. [58]

Lo que se ha sugerido es que PGE₂ y PGE₁ causan una redistribución del flujo renal con una disminución en la tensión de oxígeno en algún tejido apropiado, resultando con ello el aumento en la producción de Epo. [28]

La angiotensina causa marcado incremento en la producción de Epo por sitios extrarenales. [31]

Como es sabido la angiotensina tiene una potente actividad vasoconstrictora y también promueve la liberación de sustancias biológicamente activas de las células endoteliales, una de ellas es la PGE₂. [28]

La hipoxia en el riñón puede ser producida por diferentes agentes, induciendo la liberación de varios mensajeros externos que son liberados localmente por las células o removidos. Estos mensajeros estimulan los receptores de membrana de las células productoras de Epo con lo cual inicia la cascada de eventos que liberan al segundo mensajero. [28]

Además de la hipoxia existen otros factores que han sido determinados como posibles inductores de la producción de Epo estos son: constricción de la arteria renal, daño intrarenal, cistis renal, hidronefrosis, así como otros estímulos que producen aumento en el AMPc el cual activa la protien-cinasa-AMPc incrementando entonces la producción de Epo. [11, 80]

Se ha reportado también la estimulación de la Epo por catecolaminas, a través de un mecanismo β -adrenérgico. [91]

En la tabla No. 7 se muestran algunos agentes farmacológicos que estimulan la producción de Epo.

En lo que se refiere al sistema renina angiotensina, no se ha observado relación entre los dos sistemas, e incluso se les estudia separadamente, sin embargo se ha reportado que altas dosis de renina incrementan los títulos de Epo en la hipoxia efecto que probablemente resulte de la hipoxia isquémica causada por la angiotensina II. [28]

Durante la hipofisectomía disminuye el consumo de oxígeno basal, llevando a un incremento en los niveles de Epo y por tanto a la producción de células rojas. [11, 91]

La glándula pituitaria es requerida para la respuesta normal

de la Epo en la hipoxia.

Tabla No. 7.- Agentes farmacológicos que estimulan la producción de Epo

Glucocorticoides
 Hormona tiroidea
 Hormona del crecimiento
 Testosterona
 Nucleótidos cíclicos
 Agonistas β_2 -adrenérgicos
 Prostanoides

Al parecer la hormona del crecimiento, y la prolactina estimulan la producción de Epo. [91]

Se sabe que las hormonas producidas por el sistema nervioso autónomo tienen alguna relación en la producción de Epo, aunque aún no se ha establecido bien cual es el mecanismo. Fig. 11

Las catecolaminas pueden estimular la eritropoyesis a través de un mecanismo β_2 -adrenérgico. Estudios in vitro indican que éstos agentes hormonales incrementan la producción de Epo renal y también estimulan directamente a los tejidos eritropoyéticos. [91]

La testosterona, tiroxina, hormona del crecimiento y agonistas β_2 -adrenérgicos aumentan el efecto de la Epo sobre el crecimiento in vitro de la CFU-E, pero son inefectivos en la ausencia de Epo. [65, 91]

Tiroxina, hormona del crecimiento y agonistas β_2 -adrenérgicos también estimulan el crecimiento in vitro de BFU-E. Los agonistas β_2 -adrenérgicos probablemente actúan a través de receptores de superficie ligados a adenil ciclasa. [91]

Los glucocorticoides reportan datos controvertidos ya que estimulan e inhiben a las BFU-Es y CFU-Es. [65, 91]

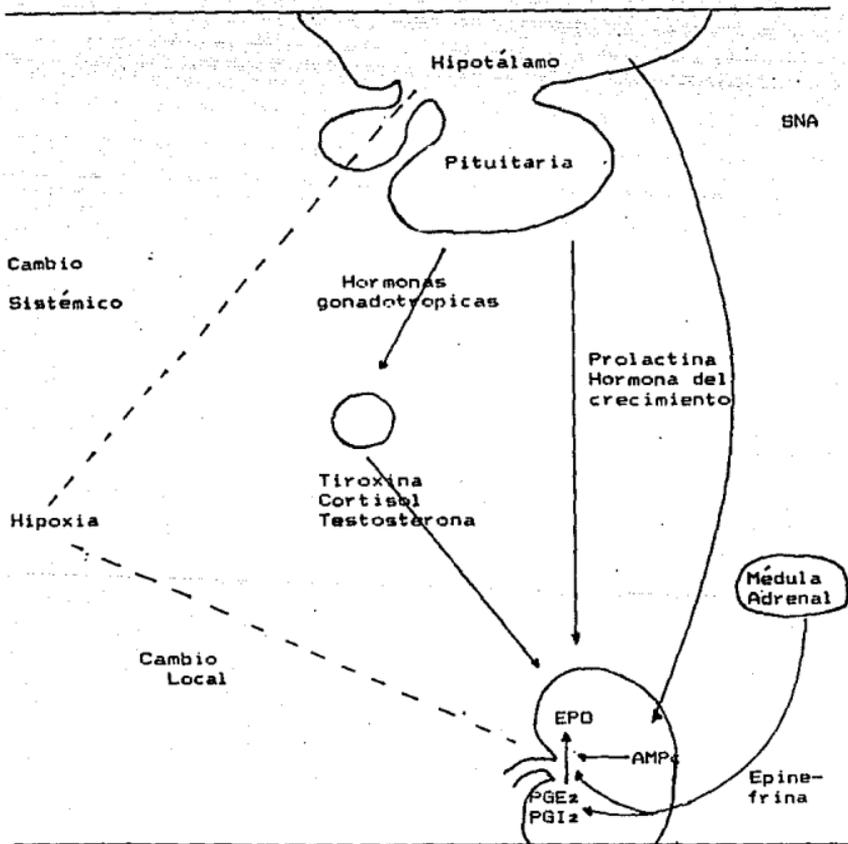


Fig. 11.- Factores renales y sistémicos que regulan a la Epo. El sistema de prostaglandinas renales parece estar involucrado directamente por la hipoxia, el sistema nervioso simpático parece estar involucrado a través de adrenoreceptores- β_2 y de los demás agentes hormonales el mecanismo es incierto, pero pueden actuar como soporte ya que incrementan el metabolismo celular. [91]

Se ha sugerido que la región oxígeno sensible del hipotálamo puede influenciar en la producción de Epo a través de mecanismos hormonales y nerviosos. [65, 91]

Los esteroides androgénicos estimulan la producción de Epo por el riñón y la producción de los progenitores eritrocíticos. El macho adulto humano excreta aproximadamente 3 veces más Epo bioactiva en la orina que la mujer o los muchachos en etapa prepubertal por ello las diferencias en la cantidad de eritrocitos en los dos sexos han sido relacionadas a lo anterior. [91]

Cuando los riñones extirpados son tratados con testosterona producen significativamente más cantidad de Epo. [91]

Parece ser que la 5- α dehidrotestosterona es el compuesto eritropoyético más potente, estableciéndose cierta relación entre la función y la estructura. Por ejemplo: se pudo observar que el grupo 19-metil fue requerido para la estimulación de la producción de Epo. [91]

Los esteroides estrogénicos inhiben la eritropoyesis tanto a nivel de riñón como de médula ósea. Dando esta la pauta para decir que la inhibición por estrógenos y la estimulación por andrógenos dan las diferencias sexuales para la producción de Epo. [91]

Es conocido ya el efecto del cobalto sobre la producción de Epo y que este efecto no es compartido por otros iones metálicos divalentes tales como el magnesio, hierro y zinc. [36]

El cobalto induce la hipoxia en los tejidos porque su inoculación produce un cambio en la isoenzima lactato deshidrogenasa del riñón de conejo, similar a la que se observa en la anemia. [28]

Tanto el GMPc como el AMPc han sido implicados en el mecanismo de acción del cobalto.

El cobalto en ratas causa incremento en GMPc renal el cual es acompañado con un incremento en la cantidad de enzimas lisosomales en el plasma, como éstos efectos junto con la respuesta de la Epo fueron estimulados por la atropina e incrementados por la fisostigmina se ha asumido un mecanismo colinérgico. [28]

Sustancias que incrementan el AMPc renal ó adenilciclasa renal, cuando son adicionados en el tejido in vitro inducen el incremento de Epo e inducen el incremento en el plasma cuando son adicionados in vivo, entre éstas estan: hormona tiroidea, lactato, estimulantes β -adrenérgicos (salbutanol e isoprenalina) y PGE₂. [40]

Epo se encuentra aumentada en hipoplasia tiroide, aplasia primaria de células rojas, hipoplasia de médula ósea (anemia aplásica), anemia por deficiencia de fierro, anemia megaloblástica, anemia hemolítica autoinmune, talasemia y hemoglobinuria paroxística nocturna. [40]

Existen manipulaciones que causan un profundo incremento en los títulos de Epo en el plasma de ratas hipóxicas, éstas son: intervenciones experimentales que causen demanda del hígado (tales como hepatectomía parcial), la adición de renina angiotensina y tratamiento con tetracloruro de carbono. [32]

El mecanismo por el cual angiotensina incrementa la producción de Epo se debe probablemente a que angiotensina II es un potente vasodilatador y promueve la salida de sustancias biológicamente activas de las células endoteliales, una de estas sustancias es la PGE₂ que se sabe incrementa la producción de Epo tanto en sitios renales como extrarenales. [32]

Agentes químicos como el dimetil sulfoxido y el butirato de sodio amplifican la respuesta a Epo, esta sensibilidad incrementa porque incrementa el número de receptores. [92]

6.2.-Factores que inhiben la producción de Epo.

Circunstancias que disminuyen la demanda de oxígeno por los tejidos, disminuyen los niveles de Epo (Por ejemplo: deprivatización de proteínas, hipofisectomía ó tiroidectomía).

La magnitud de la respuesta a hipoxia es mitigada por las adaptaciones agudas y crónicas a la hipoxia, incluyendo cambios en el pH. [22, 28]

La presencia de metahemoglobina disminuye los niveles de Epo debido a que es incapaz de transportar oxígeno. [22]

Se ha estudiado la relación que tienen ciertas citocinas

sobre la inhibición de la eritropoyésis e incluso directamente sobre la Epo. [5, 32]

Empleando las células Hep62 productoras de Epo, se probó el efecto de la It1-1 α , It1-1 β , It1-6 y el factor α de necrosis tumoral (TNF- α) e Interferon γ (INF- γ), encontrándose que la It1-1 α y It1-1 β disminuyen la producción de Epo en ésta células, al igual que el TNF- α , en tanto que la It1-6 y el INF- γ incrementan su producción, siendo la It1-1 α el más fuerte inhibidor. [32]

Se ensayaron éstas citocinas, porque son típicos representantes de la familia de las citocinas inflamatorias, postulando contribuyen a bloquear la respuesta de la Epo en la anemia, tanto en enfermedades renales asociadas con un incremento local de la producción de It1-1 y TNF- α y en infecciones, inflamaciones, o enfermedades malignas en las cuales It1-1 ó TNF- α están incrementados. [32]

7. - ERITROPOYETINA RECOMBINANTE

Como ya se ha mencionado al principio del presente trabajo, la cantidad de Epo eliminada por orina, así como sus concentraciones en plasma en pacientes normales es mínima, por ello para su estudio desde hace varios años se ha pretendido o se ha venido buscando un modelo celular, en el cual se pueda reproducir una buena cantidad de la hormona, así como el uso de células específicas y la evaluación de características ultraestructurales de líneas celulares homogéneas que den a los investigadores el tipo de células específicas productoras de Epo.

En suma los mecanismos celulares que controlan la producción de Epo y que puedan ser estudiados bajo condiciones definidas además de líneas celulares renales humanas para la producción de Epo para usos analíticos y terapéuticos.

Ya desde 1967 se cultivaron células de riñón de conejo recién nacido con células de médula ósea de conejo en el mismo tubo de cultivo, estimulándose la síntesis del heme cuando la concentración de oxígeno cambio del 21% al 3%, no siendo estimulada al 1% o cuando se adicionó cobalto, observándose además que sólo los cultivos de la corteza renal estimulaban la síntesis del heme. [22, 40]

En 1969 se observó que al cultivar células de bovino con oxígeno al 5% se estimuló la eritropoyesis en ratones policitémicos. [40]

En 1972 Se detecta actividad eritropoyética en cultivos de riñón de rata. [22, 39]

Así mismo se han empleado cultivos in vitro de médula ósea, bazo y células de hígado fetal para estudiar las interacciones de la Epo con el resto de las células blanco. [9, 42]

Otras líneas celulares que han sido empleadas para su estudio son: médula de riñón de cordero, cultivos de riñón de

conejo, glomérulo renal de cabra, células mesangiales derivadas del glomérulo de rata y ratón, células de carcinoma renal y células de riñón de hamster bebe entre otras. [9, 40]

En 1985 en Francia se reportó un tipo de células cancerosas de eritroleucemia murina (células IW32) , que producían un factor eritropoyético que estimulaba la maduración de los eritrocitos y que era similar al que se producía en el riñón. Comparando las características bioquímicas del factor eritropoyético producido por IW32 con las eritropoyetinas de plasma de ratón y de borrego, y después de llevar a cabo el análisis con agentes reductores, desnaturalizantes y oxidantes, se llegó a la conclusión de que las células IW32 producían una auténtica Epo. [19]

Es precisamente de las células cancerosas de donde algunos autores han aislado el DNA para producir Epo recombinante (rEpo) que pudiera tener uso clínico, terapéutico y de investigación.

7.1. -- Métodos de obtención.

Entre 1985 y 1986 dos firmas biotecnológicas, Amgen (Canadá) y Genetics Institut (U.S.A.) se dedicaron a la tarea de clonar el gene de la Epo y lo lograron, obteniendo así la caracterización del gene que codifica a la hormona. [45, 54]

El gene de la Epo fue clonado partiendo únicamente de la secuencia de aminoácidos de la Epo, ya que no contaban siquiera con el RNAm que codificaba para la hormona. [45, 54]

Tanto Jacobs que trabajó con el Genetics Institut como Fu-Kuen Lin que trabajó con Amgen, emplearon el método de oligonucleótidos sintéticos para clonar el gene de la Epo. [45, 54]

7.1.1.- Método empleado por Fu-Kuen Lin.

Después de someter la orina de pacientes con anemia aplásica a digestión triptica, los fragmentos obtenidos se analizaron con

un biosecuenciador de fase de gases. A partir de los cuales encontraron varios péptidos, eligiendo para su estudio un hexapéptido y un heptapéptido que contenían por lo menos un codón degenerado.

Partiendo de estos dos péptidos siendo de 17 mer y 20 mer de longitud respectivamente, construyeron varias mezclas de oligonucleótidos de 128 secuencias. Empleando como vector el bacteriófago λ Charon 4A lograron proyectar una librería genómica de 1,500 000 clonas.

Posteriormente de las clonas obtenidas se llevaron a cabo análisis de hibridización en placa con DNA obtenido de células de hígado fetal. Observando que de las clonas obtenidas, 272 placas hibridizaban para la mezcla de 20 mer y aproximadamente 4000 para la mezcla de 17 mer, en tanto que solo 4 placas hibridizaban con ambas.

Mediante el análisis con Southern blot y el análisis de la secuencia del DNA encontraron que de éstas 4 clonas 3 contenían por lo menos una porción del gene, y que la clona denominada λ HE1 contenía el gene completo.

Posteriormente mediante el análisis con endonucleasas de restricción fue mapeado el gene para obtener su secuencia. Fig. 12

Una vez obtenido el gene se llevó a cabo el análisis para ver las regiones que codificaban para la secuencia de aminoácidos, es decir, la localización de los exones, esto se hizo mediante la comparación de la secuencia de nucleótidos a la secuencia de aminoácidos de la Epo humana y por la secuencia derivada del RNAm aislado de las células CHO en las cuales se produjo la rEpo.

Se encontró que el gene estaba compuesto por 5 porciones codificables (exones) y cuatro porciones no codificables (intrones).

Una vez obtenido el gene, y mediante el análisis con endonucleasas de restricción, se empleó un fragmento HindIII-BamHI de λ HE1 que contenía el gene completo de la Epo. Este fragmento fue insertado en el vector de expresión plásmido pSV4ST obteniéndose el plásmido resultante pSV4ST-gHuEpo el cual

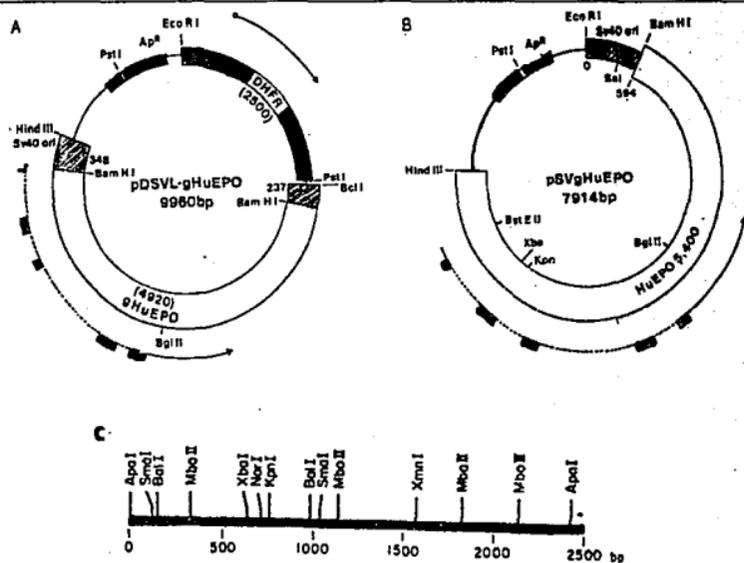


Fig. 12.- Ensamble de los plásmidos de expresión para el gene de Epo. A) pDSVL-gHuEpo contiene un minigene DHFR, virus de simio 40 (SV40) como origen de la replicación, los promotores inicial y terminal en el fragmento Hind III-RamHI y el fragmento EstEII-RamHI del gene de la Epo. El promotor terminal SV40 conduce la expresión del gene de Epo. B) pSVgHuEpo contiene al SV40 como origen de replicación, los promotores inicial y terminal y una señal inicial poly(A) en el fragmento EcoRI-RamHI del gene de la Epo. Las flechas indican la orientación de la transcripción C) Representación esquemática del fragmento de restricción ApoI que contiene las secuencias del gene de la Epo humana. [54]

fue transferido a células CHO, produciendo rEpo.

Finalmente de los resultados obtenidos se encontró que el gene clonado codifica para una proteína de 193 aa de los cuales los últimos 166 residuos codifican para la proteína madura calculando un peso molecular de 18,399 daltons para la proteína deglicosilada. Esta proteína posee tres sitios de glucosilación en el primero, segundo y tercer exón, éste último por la secuencia Asn-X-Ser/Thre.

Al final de la región 3' del último exón hay una región de 565 pb no transcritas. En las secuencias intervenidas entre los exones III y V se encuentra un miembro de la familia Alu de secuencias repetidas.

La rEpo producida en células CHO usando BV40 como vector después de 5.5 días de cultivo en el medio NZYAM, presentó una actividad de 18 U Epo/ml, de la cual al llevarse a cabo los ensayos in vivo e in vitro se obtuvo una potencia de 16.8 +/- 3.0 U Epo/ml y 15.8 +/- 4.6 U Epo/ml respectivamente (analizado por RIA) lo que demuestra que la Epo obtenida por técnicas recombinantes es biológicamente activa.

Finalmente al hacer la comparación con un banco de genes, no se encontró homología entre el gene clonado para la Epo y algún otro gene reportado para alguna otra proteína, incluyendo al angiotensinógeno. [54]

7.1.2.- Método empleado por Jacobs.

La Epo empleada por Jacobs fue purificada de orina de pacientes con anemia aplásica y digerida con tripsina por el método de Miyake et al. en una columna C-4 de HPLC en fase reversa usando un gradiente de 0-95% de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoroacético /100 min.

La posición de la Epo fue determinada por electroforesis en gel y el análisis de secuenciación de los aa N-terminal.

La Epo eluida a 53% de acetonitrilo se ajustó a pH 7.0 y se digirió con tripsina TPCK (2% w/w enzima/sustrato). Los fragmentos obtenidos se sometieron a cromatografía en fase reversa de HPLC monitoreandose las absorbancias de los eluyentes

a 280 y 214 nm y de las fracciones obtenidas en los picos a éstas absorvancias se llevó a cabo la secuenciación empleando un secuenciador de fase de gases.

Las secuencias elegidas finalmente fueron parecidas a las que empleo Fu-Kuen Lin, solo que aquí se empleó un nucleótido de 17 mer y otro de 18 mer.

Empleando el fago λ crearon una librería genómica usando tetraetilamonio como sal de hibridación. De aquí escogieron una clona denominada λ Epo1 la cual fue digerida con Sau 3A y subclonada en M13 para el análisis de la secuencia del DNA, usando el método de terminación de cadena dideoxi.

Encontrando que la Epo se encuentra contenida en una secuencia de 579 nucleótidos y que codifica para una región hidrófoba de 27 aa, seguida de la proteína madura de 166 aa.

La rEpo fue producida a partir de un cDNA insertado en un plásmido p91023B y transferido a células COS-1. Al comparar la proteína obtenida, con la Epo aislada de orina se encontró que tenía un corrimiento en geles de poliacrilamida-SDS idéntico.

Encontraron también que el gen que codifica para la Epo se encuentra localizado en una región de 3.4 kb y que el mRNA para la Epo es codificado por los exónes II, III, IV y parte del I y V, mientras que el resto de los exónes I y V codifican las secuencias 5' y 3' no traducidas respectivamente. [45]

7.1.3.- Método empleado por Powell

Por otro lado, Powell apoyado por la firma Zimogenetics, clonó el gen que codifica para la Epo, la produjo en una línea celular obteniendo rEpo con mayor potencia de la obtenida por Fu-Kuen Lin y Jacobs y localizó el cromosoma en el que se encuentra el gen.

El gen fue clonado a partir de un péptido de 18 aminoácidos de la región amino terminal, creando primeramente una librería genómica en el fago λ .

La replicación fue hecha por plásmidos, utilizando el vector pDII contenido en SV40.

Empleando las endonucleasas de restricción Apa I, EcoRI, y

Bam HI. Un fragmento BamHI fue ligado en ambas terminaciones e insertados en el fragmento de restricción del plásmido, los plásmidos fueron clonados en E. coli HB101 y purificados por centrifugación en cloruro de cesio.

Las células empleadas para producir la rEpo fueron COS-7 (de riñón de mono) y BHK (riñón de hamster bebé).

Para la expresión del gene de la Epo se empleó el vector plásmido conteniendo el gene y DNA de esperma de salmón.

El mapeo del DNA fue llevado a cabo por enzimas de restricción.

En la expresión del DNA sobre las células, se emplearon controles con células no transferidas y paralelamente cultivos de células transferidas con plásmidos que contenían DNA que codificaba para otras proteínas, tales como acetil transferasa y proteínas de la coagulación humana.

El ensayo in vitro para la Epo estuvo basado en la formación de colonias eritroides en cultivos de médula ósea de ratón.

Obteniéndose lo siguiente: en los cultivos de células COS-7 se produjeron 3.2 +/- 0.4 µg de Epo/ml con una actividad de 270 +/- 16 U/ml y para las células BHK 3.4 +/- 0.2 µg de Epo/ml con una actividad de 255 +/- 32 U/ml.

Como se puede observar, el nivel de Epo obtenido fue más alto que el reportado por Jacobs y Fu-Kuen Lin. Las razones de este incremento no están claras, pero pudieron ser debidas al empleo del gene de DNA con secuencias intervenidas más que al cDNA ó que el vector plásmido empleado es más adecuado para su expresión.

Para el estudio de localización cromosomal se eligieron dos fragmentos, SmaI de 916 pb de la región 5' y un fragmento XmnI-ApaI de la región 3'. Las suspensiones de cromosomas fueron aisladas de una línea celular de linfocitos en buffer tris/espermina y fijadas con DIPI-cromomicina /A3.

30,000 cromosomas humanos de cada tipo fueron fijados en filtros de nitrocelulosa por medio de "sorter dual laser" de alta resolución e hibridizados con los fragmentos de restricción marcados con ³²P. Obteniéndose las autoradiografías correspondientes, que muestran que el gene que codifica para la

Epo se localiza en el cromosoma 7. Fig. 13 [67]

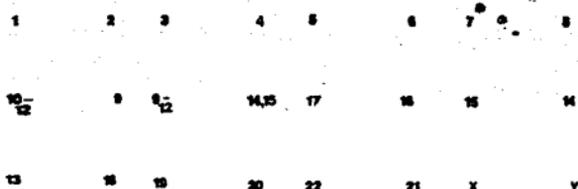


Fig. 13.- Autoradiograma que muestra el cromosoma que contiene el gen que codifica para la Epo humana. los cromosomas fueron fijados en filtros de nitrocelulosa e hibridizados con fracciones de la región 5' y 3' del gene, dando autoradiogramas idénticos. El cromosoma 7 produce una intensa señal de hibridización. [67]

Por otro lado al emplear células Hep 3B (de carcinoma hepático), se observó que éstas producen Epo en forma regulatoria, por tanto son un buen modelo para la producción de Epo. [74]

Al llevarse a cabo la clonación tanto del gene de humano, como de el de mono y ratón, se encontró que existe una gran homología entre las tres especies y que dicha homología ocurre en tres partes de secuencia no codificables como son:

- a) 140 pb antes del sitio de iniciación de la transcripción
- b) dos fragmentos en el primer intrón
- c) de 100 a 200 pb al final del codón de terminación de la transcripción.

con lo cual se evidencia que los elementos 5' y 3' altamente conservados no codificables confieren la respuesta a hipoxia y a cobalto. [74]

De los estudios de clonación se ha deducido que ambas Epos, la de humano y la de ratón tienen la capacidad de hacer proliferar de humano a ratón y de ratón a humano.

Una vez que se tuvo el gene que codifica para la Epo, éste ha sido empleado en la mayoría de los estudios realizados acerca de la hormona y cada investigador ha ido implementando algunas modificaciones tanto en el tipo de células empleadas, así como los vectores para inducir su clonación .

Con el fin de identificar las células productoras de Epo han sido precisamente las líneas celulares las que han sufrido más variaciones.

Entre las células más empleadas tenemos: Las células de carcinoma hepático Hep 3B [6, 68, 74], células COS (de riñón de mono) [74], células CHO [54, 68], células Hela [6] y células Hep G2 (de carcinoma hepático) [20,68]. Así como una gran variedad de células de mielomas tanto humano como de ratón, como es el caso de las células de eritroleucemia murina inducida por el virus Friend que ha sido ampliamente utilizada. [18]

En cuanto a los vectores empleados, la variación ha sido menor, y la mayoría a empleado el bacteriófago λ y el M13, debido probablemente a que el primero presenta la ventaja de que el DNA clonado puede ser manipulado como el fago, y en el segundo el DNA clonado puede ser obtenido en una sola hebra y por tanto ser más fácilmente secuenciado. [51]

En tanto que el microorganismo empleado para inducir la clonación han sido diferentes cepas de E.coli.

El mapeo del gene se ha llevado a cabo mediante enzimas de restricción, de las cuales las más empleadas han sido, Apa I, Hind III, Bam HI y XbaI entre otras. [49]

Debido a que Amgen ha lanzado comercialmente su producto, en la actualidad los estudios acerca de Epo se llevan a cabo con el producto comercial, e incluso éstas preparaciones son empleadas como estándares cuando se llevan a cabo estudios cuantitativos.

Sin embargo Amgen no es la única que la produce la rEpo es producida por Amgen Inc, Thousand Oaks C.A., Genetics Institute , Cambridge M.A. [1]

Ensayos clínicos han sido conducidos por: Amgen en Estados Unidos y su socio Kirin en Japón, Jhonson and Jhonson (J & J) Ortho Pharmaceutical Corp. en Cánada y Estados Unidos , J & J Cilag Pharmaceutical Corp. en el oeste de Europa y por Chugai (socios de Genetics Institute) en Japón, Upjohn Co. en Estados Unidos y Boehrnger-Mannheim en el oeste de Europa. [1]

La Epo de Amgen ha sido aprobada por la FDA y el producto fabricado por Cilag ha sido aprobado en Europa. [1]

Por último, cabe mencionar que con el auge que tiene en la actualidad la ingeniería genética, no sólo Epo, sino varios factores que influyen en la eritropoyesis han sido clonados.

8.- APLICACION TERAPEUTICA DE LA ERITROPOYETINA RECOMBINANTE

Se ha observado que en pacientes con falla renal, así como en otros estados patológicos asociados a falla renal, en algunos síndromes nefróticos y durante el embarazo, disminuye la producción de Epo, conduciendo a cuadros de anemia de diferentes severidades y en algunos casos haciendo a los pacientes dependientes de transfusiones; por ello a raíz de que se clonó el gen se pensó en él como un posible reemplazador en la terapia de pacientes con anemia. [7, 35]

Inicialmente la rEpo se empezó a usar en pacientes que tenían la capacidad de producirla, pero en bajas cantidades. Principalmente se enfocó a pacientes con falla renal y a los que era necesario dializar periódicamente, a causa de lo cual llegaban a tener anemia y posteriormente se hacían dependientes a transfusiones sanguíneas. [26]

Lo anterior basado en el hecho de que cuando el flujo sanguíneo se reduce por anemia, disminuye el oxígeno y por tanto se dispara la síntesis de Epo; de modo que si el hematocrito llega a 20% entonces se dispara hasta 100 veces ó más. [26]

En 1985 se empezó a probar la rEpo en pacientes normales pero con insuficiente producción de Epo. [26]

Entre 1986-1987 se confirmó que la rEpo podía entrar como sustituto en la terapia en pacientes dializados. Esto fue gracias a los estudios realizados en Estados Unidos e Inglaterra. [26]

Los estudios iniciales se hicieron empleando rEpo de Amgen's en Estados Unidos, posteriormente se extendió hacia Europa, Canadá y Japón. Básicamente se observó que todos los pacientes con hemodialisis respondían al tratamiento incrementando su hematocrito. [1]

Se observó que la administración de 25-500 U/Kg de peso tres

veces por semana, causan un incremento en el hematocrito dependiente de la dosis, con lo cual se eliminó la necesidad de transfusiones. Además de funcionar de igual manera en pacientes con falla renal crónica antes de ser dializados, aunque en ellos la anemia no sea tan severa y no sean tan dependientes de transfusiones. [25]

Con lo que respecta a las dosis se sugirió que con 80 U/kg de peso 3 veces por semana son suficientes y que dosis superiores son innecesarias. [1, 26]

La dosis inicial aprobada por la FDA fue de 50-100 U/Kg de peso intravenosamente 3 veces por semana. Mientras que la National Kidney Foundation recomendó una dosis inicial de 150 U/Kg de peso intravenosamente 3 veces por semana y cuando el hematocrito fuera de 30-34% ó el nivel de hemoglobina fuera de 100-115 g/lit la dosis tenía que ser reducida. [26]

La respuesta a la dosis varía dependiendo del producto comercial que se este empleando, ya que las presentaciones farmacológicas incluyen dos tipos de Epo, la α y la β , comparandose y comprobandose que se obtienen respuestas diferentes de cada una. [41]

La Epo β presenta eliminación prolongada con respecto a α y un mayor aumento en el número de reticulocitos, pero α presenta mayor absorción por vía subcutánea, aunque todavía no han definido claramente éstas diferencias y lo han atribuido más al vehículo que a las "hormonas". [41]

Se sabe que con 10-20 U de Epo /lit de plasma se induce suficiente producción de eritrocitos para reemplazar las células viejas y mantener un flujo de oxígeno suficiente al sensor renal de oxígeno para asegurar los niveles basales de la síntesis de Epo. [1]

Una respuesta pobre a la administración de rEpo viene dada por la deficiencia de hierro o bien por la deficiencia en la captación del mismo. Por ello es importante el monitoreo del hematocrito y los niveles de hemoglobina, la capacidad para captar hierro y la ferritina ya que las necesidades variarán dependiendo de cada paciente. [26]

En términos prácticos si los niveles de ferritina son

menores de 200 $\mu\text{g}/\text{lit}$ o la saturación de transferrina menor del 15% , se debe de dar un tratamiento a base de hierro lo cual se consigue administrando 300 mg de sulfato ferroso por vía oral (200 mg de hierro de 1 a 3 veces al día). [26]

También se puede obtener una baja respuesta a rEpo en el caso de algunas infecciones o procesos inflamatorios. [26]

Como ya se mencionó la primera vía de inoculación que se empleó fue la intravenosa, sin embargo la farmacocinética por ésta vía se caracteriza por los relativamente bajos incrementos en el plasma o relativamente poca distribución del volumen y la corta vida media en circulación de aproximadamente 6-8 hrs. [26]

Debido a las razones expuestas anteriormente se empezó a examinar la vía subcutánea, en la que se da una liberación lenta de Epo de los depósitos subcutáneos produciendo bajos, pero más sostenidos niveles en el plasma. Fig. 14 [26]

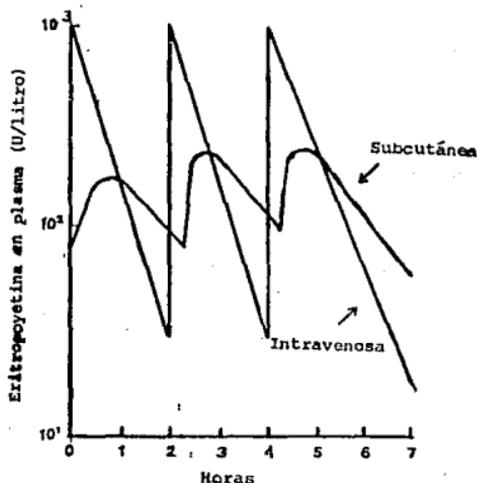


Fig. 14.- Niveles plasmáticos de Epo después de las inoculaciones intravenosa o subcutánea de 40 U de rEpopor kilogramo de peso tres veces por semana. [26]

Al probar la vía subcutánea en pacientes con enfermedad renal asociada con algún tipo de anemia se observó que ésta vía precisamente por liberar la Epo más lentamente resulta en la reducción de la dosis, ya que en lugar de administrar tres dosis por vía subcutánea se sugiere la administración de una dosis por semana de 75-106 U/kg de peso, cantidad suficiente para incrementar el nivel de Hb 10g/dl. [1, 66]

El tratamiento con rEpo aún no está completamente calificado o cualificado, ya que ha llegado a haber problemas con pacientes hipertensos o con isquemia cerebral. Además de tomar en cuenta que la mayoría de los pacientes con falla renal son propensos a ser hipertensos. [15]

Lo anterior en virtud de que al incrementar el hematocrito, incrementa la viscosidad de la sangre y un incremento en la viscosidad ó una disminución en la vasodilatación puede agravar la hipertensión. Además de tener efectos sobre la función de la glándula pituitaria anterior. [87]

Para evitar éste tipo de problemas, recientemente se ha planteado un modelo matemático computarizado mediante el cual se han establecido ecuaciones para determinar los valores esperados de hematocrito, Hb, Epo y número de células rojas en respuesta a una dosis determinada de Epo. [85]

Entre otros problemas que se han tenido con el tratamiento estan el incremento de plaquetas y la disminución en el tiempo de sangrado, ya que en algunos pacientes con anemia asociada a falla renal a los que se les administró rEpo en dosis de 150 a 300 U/Kg de peso tres veces a la semana durante 2 semanas, con lo que incrementaron las células rojas progenitoras, dandose también un incremento de CFU-GM y megacariocitos. [50]

Lo anterior puede deberse a que se han encontrado receptores para Epo sobre la superficie del megacariocito y del megacarioblasto, siendo la densidad de los receptores del megacariocito, similar a la del pronormoblasto en la rata , en tanto que en el ratón es de 60% y aunque éstos receptores son similares, no son idénticos. [34]

La aplicación de la Epo esta aún limitada a anemia asociada a falla renal, ya que en otro tipo de enfermedades, como es la

enfermedad de Gaucher asociada con anemia severa, con niveles de Hb de 5-6 g/dl, llegando a tener niveles de Epo de hasta 3,440 U/ml no se observan mejorías en la anemia y tiene que llevarse a cabo la transfusión. [69, 76]

Se ha intentado también corregir la anemia en el caso de pacientes con β talasemia, asociada a falla renal, sin embargo las dosis recomendadas no son suficientes para corregir la anemia en estos pacientes, debido a que se necesitan dosis más altas, pero eso aún está en estudio, debido a las complicaciones que esto traería. [62]

Un problema más adicionado a los anteriores es el costo de la terapia, ya que es considerable. En Estados Unidos el costo es de aproximadamente un centavo por unidad. [26]

Por otro lado, la terapia no elimina los problemas ni traumas ocasionados por la diálisis, en el caso de pacientes dializados, pero sí elimina el de las transfusiones continuas que además en la actualidad pueden llevar consigo otros agravantes, como es el caso de que las muestras de sangre vengán contaminadas con citomegalovirus, virus de la hepatitis o bien virus del SIDA. [26]

Lo anterior ha sido comprobado por ejemplo en niños con edad promedio de 10 años en estado final de falla renal, a los que se les administró rEpo en dosis de 50 U/kg de peso tres veces por semana hasta que el hematocrito fuera de 33 +/- 3% y que 12 meses antes del tratamiento habían recibido entre 3 y 4 transfusiones y después del mismo ya no requirieron más; con lo cual se demostró que la rEpo resultó ser efectiva en niños con diálisis peritoneal cíclica continua. [66]

Parece ser que la anemia en bebés prematuros está relacionada con la deficiencia de Epo. Ya que se ha observado que en algunos mamíferos hay un cambio en la producción de Epo hepática a Epo renal durante el nacimiento y es así como se describe en los niños prematuros. [26]

Sin embargo el monitoreo en los bebés no es muy bien seguido debido a la poca cantidad de sangre que se obtiene y no se logra definir bien la ganancia. [26]

Durante la preñez, la anemia ha sido asociada a una

disminución de la Epo, en el primer trimestre de embarazo, ya que al analizar los niveles de Epo durante los tres trimestres, se ha observado que durante el primero disminuyen los niveles de Epo en el plasma. Tabla 8 [7]

Lo anterior ha sido atribuido a varias razones:

- a) adaptaciones fisiológicas que incrementan el oxígeno en el sensor renal de oxígeno,
- b) durante el primer trimestre incrementa el flujo renal y
- c) Se ha sugerido que el lactógeno placentar disminuye la Epo. [7]

Tabla No. 8 Niveles de Epo durante la preñez

Trimestre	Epo mU/ml de plasma
Primero	19.1 +/- 6.2
Segundo	28.4 +/- 15.5
Tercero	37.7 +/- 24.2
Durante el Parto	33.9 +/- 22.3
Postparto	35.1 +/- 34.7

Beguin 1991 [7]

Otra aplicación que se ha visto a la Epo es que en donadores sanos al administrar 600 U de Epo /Kg de peso dos veces por semana, se incrementa el hematocrito y puede donar más sangre durante las cirugías. Y en el caso de pacientes normales con cirugías electivas disminuye la dependencia a las donaciones.

Si bien en los atletas causa un incremento del hematocrito, también puede traer graves consecuencias ocasionadas por la deshidratación que ocurre durante el ejercicio exhaustivo, con lo cual se incrementa la viscosidad de la sangre, siendo esto detrimental no solo para la acción muscular sino también porque

puede causar trombosis, a pesar de lo cual algunos deportistas han empezado a utilizarla, e incluso, la determinación de Epo se ha implementado en el antidopin.

Debido a que la Epo presenta heterogeneidad en cuanto a carga; la segunda referencia internacional y las Epos de pacientes sanos presentan más cargas negativas que la rEpo alfa, se puede identificar su presencia en parsonas con producción normal de Epo endógena. [88]

9. - CONCLUSIONES

Como se ha observado a lo largo de la presente revisión, el estudio de la Epo, si se compara con el de algunas otras hormonas como la insulina ó las hormonas hipotalámicas, es relativamente nuevo, sobre todo, debido a la baja disponibilidad de la "hormona".

Si bien los detalles a cerca de sus propiedades fisicoquímicas son conocidos, las variaciones que de ellos se llegan a encontrar son debidas a la heterogeneidad de la hormona reportada por algunos autores.

Es confirmado que el ácido siálico le sirve a la molécula como indicativo de su presencia en el plasma, ya que cuando es escindido la Epo es eliminada de la circulación.

La biosíntesis de la Epo es iniciada cuando existe hipoxia, sin embargo aún existen ciertas controversias con respecto al mecanismo exacto, al parecer la hipoxia estimula el sensor renal de oxígeno localizado en las células del epitelio tubular que contienen el mRNA para la Epo y que dentro de éste, el sensor de oxígeno se localiza en las regiones más altamente conservadas, siendo la más aceptada la siguiente al sitio de poliadenilación.

Cabe resaltar las regiones más altamente conservadas del gene en las tres especies mamíferas más estudiadas (humano, mono y ratón) debido a que los investigadores han coincidido en que aquí se localiza el sitio de sensibilización del oxígeno.

El mecanismo de acción no ha sido completamente definido, y esto no podrá ser resuelto hasta que no se tengan bien definidas las células que la producen, ya que si bien las líneas celulares han provisto un excelente método de estudio, existen algunos factores in vivo que pueden influir en el proceso aunado a ésto esta por resolver la cuestión de si los receptores son de baja o de alta afinidad y si los de baja afinidad son o no importantes para la unión de la Epo a su célula blanco y en principio si

existen dos tipos de receptores.

Definitivamente el hecho de haber clonado el gen ha proporcionado un gran avance para el estudio de la Epo, ya que gracias a esto y a la clonación del gene que codifica para el receptor y que aún no ha sido bien definido, se podrán resolver más fácilmente las interrogantes que aún se plantean.

La obtención de rEpo ha beneficiado a muchas personas principalmente las que padecen anemia asociada a falla renal, ya que ha evitado el problema de transfusiones continuas, que les pudieran traer (además del trauma de la transfusión) consecuencias secundarias como son: las infecciones postransfusionales por la contaminación de las muestras sanguíneas.

En México la terapia se ha empezado a aplicar en algunos pacientes, sin embargo su empleo resultará un poco más difícil, ya que de por sí la terapia resulta cara en Estados Unidos.

Si bien la rEpo ha sido benéfica para algunas personas, el uso inadecuado de la "hormona", hablando de ella como medicamento, tiene que ser controlado, ya que si en un inicio puede resultar benéfico ayudando a incrementar la oxigenación en los tejidos, y por tanto el rendimiento físico, también puede llevar al deterioro del buen funcionamiento del organismo.

Por último, la presente revisión cumple con los objetivos propuestos, tomando en cuenta que aún no se tiene la última palabra respecto al tema.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

10.- REFERENCIAS

- 1.- Ad Hoc. Committee for the National Kidney Foundation (1989) "Statement on the clinical use of recombinant erythropoietin in anemia of end-stage renal disease" Am. J Kidney Dis. XIV (3):163-169
- 2.- Akahane, K. et al. (1989) "Binding of iodined erythropoietin to rat bone marrow cells under normal and anemic condition" Exp. Hematol. 17(2):177-182.
- 3.- Barel, Randoux et al. (1989) *Bioquímica Dinámica Panamericana*, Mexico, pp. 1994, 3025d.25d.
- 4.- Barson S.A., Yalow R.S. 1973 *Methods in investigative and diagnostic endocrinology* 2-B Part III Non pituitary hormones. Netherlands pp. 1091-1142.
- 5.- Bazan J. F. et al (1989) "A novel family of growth factor receptor: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and *Il1-6* receptors and the *p75 Il1-2* receptor *b-chain*." Biochem. Biophys. Res. Comm. 169:788-793
- 6.- Beck, Ingrid et al. (1991) "Enhancer element at the 3 flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene" J. Biol. Chem. 266(24): 15563-15566
- 7.- Beguin Y. et al. (1991) "Blunted erythropoietin production and decreased erythropoiesis in early pregnancy" Blood 78 (1):89-93
- 8.- Bernard, M. J. (1978) *Methods of hormone radioimmunoassay* Academic Pres, U.S.A. Cap. 20 pp. 421-434
- 9.- Beru, N.; McDonald, F. and Goldwasser, E. (1989) "Studies of the constitutive expression of the erythropoietin gene" Ann. N.Y. Acad. Sci. 554:29-35.
- 10.- Bonaou-Tzedak, S.A. et al (1986) "Stimulation of the adenilate cyclase activity of rabbit bone marrow immature eritroblast by erythropoietin and haemin" Eur. J. Biochem. 155: 363-370.
- 11.- Brenner, Barry M. and Rector, FLoid C. (1976) *The Kidney* W.B.Saunders, U.S.A., pp. 488-489, 1105-1106

- 12.- Brouncy, V.C. et al. (1988) " *Recombinant erythropoietin: Purification and analysis of carbohydrate linkage* " Arch. Biochem. Biophys. 265 (2):329-336
- 13.- Brouncy, VC. et al. (1990) " *Dynamics of erythropoietin receptor expression on erythropoietin responsive murine cell lines* " Blood 75 (8):1622-1626
- 14.- Brouncy, V.C. et al. (1991) " *Erythropoietin receptors. Characteristics on primary human erythroid cells* " Blood 77 (12):2583-2590
- 15.- Canella, G. et al. (1990) " *Recombinant of high cardiac output and of left ventricular size following long-term recombinant human erythropoietin treatment of anemia dialyzed uremic patients* " Clin. Nephrol 34 (6):272-278
- 16.- Casadevall, Nicole. et al. (1991) " *Multimeric structure of the membrane erythropoietin receptor of murine erythroleukemia cells (Friend-cells)* " J. Biol. Chem. 266 (24):16015-16020
- 17.- Clement A. Finch (1982) " *Erythropoiesis, erythropoietin and iron* " Blood 60 (6):1241-1246. Review
- 18.- Chern, Y. et al. (1991) " *Erythropoietin activates the receptor in both Rauscher and Friend murine erythroleukemia cells* " J. Biol. Chem. 266 (2):681-684
- 19.- Choppin, J. et al. (1984) " *Characterization of erythropoietin produced by IW32 murine erythroleukemia cells* " Blood 64 (2):341-347
- 20.- Costa-Giomi, P. et al. (1990) " *Enhancement by hypoxia of erythropoietin gene in vitro* " J. Biol. Chem. 265 (18): 10185-10188.
- 21.- Cutler, R, et al (1985) " *Characterization of murine erythropoietin* " Exp. Hematol. 13(9):899-905.
- 22.- De Groot, Leslie (1989) *Endocrinology* Second Edition vol.3 W.B. Saunders Co., U.S.A., pp. 2613-2618
- 23.- D'Andrea, A. et al. (1989) " *Expression cloning of the murine erythropoietin receptor* " Cell 57:277-285.
- 24.- Dubé, S.; Fisher, W. and Powell J. (1988) " *Glycosylations at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function* " J. Biol. Chem. 263(33):17516-17521.
- 25.- Erslev, Allan J. and Gabzuda, Thomas G. (1985) *Pathophysiology of blood* Third edition W.B. Saunders Co., U.S.A., 1885 pp. 35-45

- 26.- Erslev,, Allan J. (1991) " *Erythropoietin* " N. Eng. J. Med. 324 (19):1339-1344
- 27.- Espada, Joaquin et al. (1972) " *Human erythropoietin: studies on purity and partial characterization* " Biochem. Biophys. Acta 285:427-435
- 28.- Fired, Walter. (1989) " *Factors that affect the rate of the erythropoietin production by extrarenal sites* " Ann. N.Y. Acad. Sci. 554:1-8.
- 29.- Fisher, J.W. (1983) " *Control of erythropoietin production* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 173: 289-305 Mini review
- 30.- Fisher, J.W. and Hagiwara, M. (1984) " *Effects of prostaglandines on erythropoiesis* " Blood Cells 10(2/3):241-260
- 31.- Fisher, J.W. and Muneshida U. (1989) " *Extrarenal messengers and erythropoietin production* " Ann. N.Y. Acad. Sci. 554:9-20.
- 32.- Frandey, J. and Wolfgang, J. (1991) " *Interleukin-1 and Tumor necrosis factor a inhibit erythropoietin production in vitro* " Ann. N.Y. Acad. Sci. 628:250-255.
- 33.- Fraser, J.K. (1988) " *Down-modulation of high affinity receptors for erythropoietin on murine erythroblasts by interleukin-3* " Exp. Hematol. 16(9):769-773
- 34.- Fraser, J. K. et al (1989) " *Expression of specific high affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakariocytes* " Exp. Hematol. 17 (1):10-16.
- 35.- Fuchs D. et al. (1992) " *Erythropoietin and decreased erythropoiesis in pregnancy* " Blood 79 (2): 534 Communications
- 36.- Goldberg, Mark A. et al. (1988) " *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein* " Science 242:1412-1415
- 37.- Goldberg, Mark A. et al. (1991) " *Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and postranscriptional events* " Blood 77(2):271-277
- 38.- Goldwasser Eugene (1984) " *Erythropoietin and mode of action* " Blood Cells 10(2/3):147-162
- 39.- Goldwasser, E. (1991) " *From protein to gene to protein: Molecular biology of Epo.* " Am. J. Kidney Dis. 19 (9)Suppl. 1:
- 40.- Gray, C.H. and James, V.H. (1979) *Hormones in blood* third edition vol. 1, Academic Pres, Great Britain, pp. 473-497.

- 41.- Haltenson, C. E. et al (1991) " Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa and epoetin beta " Clin. Pharmacol. Ther. 50:702-712.
- 42.- Hankins, David et al. (1986) " Erythropoietin an autocrine regulator # Serum free production of erythropoietin by cloned erythroid cell lines " Blood 68(1):263-268
- 43.- Hankins, David W. et al. (1989) " Erythropoietin-depend and erythropoietin-producing cell lines " Ann. N.Y. Acad. Sci. 554:21-27.
- 44.- Imagawa S. Et al. (1989) " The effect to recombinant erythropoietin on intracellular free calcium in erythropoietin responsive cells " Blood 73:1452-1455
- 45.- Jacobs, Kennet et al. (1985) " Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin " Nature 313:806-810
- 46.- Jeffrey, D. Mc.Donald et al. (1986) " Cloning, sequencing and evolutionary analysis of the mouse erythropoietin gene Mol. Cell. Biol. 6 (3):842-848
- 47.- Jones S.S et al (1990) " Human erythropoietin receptor: cloning expression and biologic characterization " Blood 76(24):31-34
- 48.- Joseph, J., and Mazza M.D. (1988) Manual of clinical hematology, first edition Little Brown and Co., U.S.A., pp.39-52
- 49.- Ketchum, Paul A. (1988) Microbiology (Concepts and Applications U.S.A., Johns Wiley and Sons, pp 722- 747
- 50.- Klaus, G. (1989) " Recombinant human erythropoietin and hematopoietic progenitor cells in vivo " Blood 73 (8): 2229 correspondence
- 51.- Koury , S.T. et al. (1988) " Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization " Blood 71 (2): 524-527
- 52.- Lange, R.D. et al (1984) " Preparation of purified erythropoietin by high performance liquid chromatography " Blood Cells 10(2/3):305-314.
- 53.- Levin-Benjamin (1989) Genes España, Reverte, pp. 223-226
- 54.- Lin, Fu-Kuen et al. (1985) " Cloning and expression of the human erythropoietin gene " Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:7580-7584

- 55.- Makoto, Takeuchi et al. (1990) " *Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells* " J. Biol. Chem. 265 (21):12127-12130
- 56.- Maouche, Leita et al. (1991) " *Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor* " Blood 78(10):2557-2563.
- 57.- Masson, G et al. (1990) " *Rapid activation by erythropoietin of protein cinasa C in nuclei of erythroid progenitors cells* " Biochem. Biophys. Res. Commun. 168(2):490-497.
- 58.- Mayeux, P. et al. (1986) " *Mode of action of erythropoietin and glucocorticoids on the hepatic erythroid precursor cells. Role of prostaglandins* " Cell. Differ. 18: 17-26
- 59- Migliaccio, A.R. et al (1991) " *Response to erythropoietin in erythroid subclones of the factor-dependent cell line 32D is determined by translocation of the erythropoietin receptor to the cell surface* " Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88(24):11086-11090.
- 60.- Miyake, T. et al. (1977) " *Purification of human erythropoietin* " J. Biol. Chem. 252 (15):5558-5564
- 61.- Nielsen, D.J. (1987) " *Regulation of erythropoietin production in a human hepatoblastoma cell line* " Blood 70(6):1904-1909.
- 62.- Neg Lai, K. et al (1992) " *Use of recombinant erythropoietin in thalassemic patients on dialysis* " Am. J. Kid. Dis. 19 (3):239-245
- 63.- Noguchi, C.T. et al. (1991) " *Cloning of the human erythropoietin receptor gene* " Blood 78(10):2548-2556
- 64.- Orlic, Donald et al (1985) " *Increased 2-5-adenilate synthetase activity in the spleens of BALB-c mice during hypoxia -stimulated erythropoiesis* " Exp. Hematol. 13(8):821-826.
- 65.- Oliver, Hermine et al. (1991) " *Autocrine role of erythropoietin in mouse hematopoietic cell differentiation* " Blood 78 (9):2253-2260
- 66.- Drigkingko, J.R. et al (1991) " *Use of low-dose subcutaneous recombinant human erythropoietin in end-stage renal-disease: experience with children receiving continuous cycling peritoneal dialysis* " Am. J. Kidney Dis. XVIII (4):446-450.

- 67.- Powell, J.S. et al (1986) " *Human erythropoietin gene: high level expression in stability transfected mammalian cell lines and chromosome localization* " Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:6465-6469
- 68.- Pugh C.W. et al (1991) " *Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene* " Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 10553-10557
- 69.- Rodgers, G. P. and Lessin, L.S. (1989) " *Recombinant erythropoietin improves the anemia associated with Gaucher's disease* " Blood 73 (8):2228-2229
419-434
- 70.- Sawyer, S.T. et al (1987) " *Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells* ". J. Biol. Chem. 262 (12):5554-5562.
- 71.- Sawada, K. et al (1988) " *Quantitation of specific binding of erythropoietin to human erythroid colony forming cells* " J. Cell. Physiol. 137:337-343
- 72.- Sawada, K. et al (1990) " *Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of the erythropoietin receptors* " J. Cell. Physiol. 142: 219-230
- 73.- Semenza, Gregg L. et al. (1990) " *Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements* ". Mol. Cell. Biol. 10 (3): 930-938
- 74.- Shigeiko, Imagawa et al. (1991) " *Regulatory elements of the erythropoietin gene* " Blood 77 (2): 278-285
- 75.- Shoemaker, C.B. and Mitscock, L.D. (1985) " *Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology* " Mol. Cell. Biol. 5 (3): 849-858
- 76.- Bindransky E., Frenkel E. and Bener J.B. (1992) " *Anemic Gauchers patients with elevated endogenous erythropoietin levels may not respond to recombinant erythropoietin therapy* " Blood 79 (2): 532-533
Correspondence
- 77.- Smith, M.D. et al. (1985) " *The role of the carbohydrate in erythropoietin action* " Endocrinol. 116 (6): 2293-2299
- 78.- Sodeman. (1988) *Fisiopatologia Clínica de Sodeman* Septima edición, Mexico, Interamerica pp. 679-680
79. Spangler, R. et al. (1991) " *Erythropoietin increase c-myc mRNA by a protein kinase-C-dependent pathway* " J. Biol. Chem. 266:681

- 80.- Spangler R. and Sytkowsk A.J. (1992) " *c-myc* Is an erythropoietin early response gene in normal erythroid cells: evidence for a protein kinase C-mediated signal " *Blood* 79 (1): 52-57
- 81.- Takeuchi, Makoto et al. (1988) " Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietin purified from urine and the culture medium of recombinant chine hamster ovary cells " *J. Biol. Chem.* 263 (8):3657-3663
- 82.- Todokoro, K. et al (1988) " Down-regulatory of *c-myc* gene expresion is a prerequisite for erythropoietin --induced erythroid differentiation " *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (23):8900-8904
- 83.- Todokoro K. et al (1991) " Isolation of a cDNA encoding a potential soluble receptor for human erythropoietin " *Gene* 106 (2):283-284
- 84.- Tsuda, H., Sawada T., et al. (1989) " Mode of action of erythropoietin (Epo) in a Epo dependent murine cell line. Involvement of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate not as a second messenger but as a regulator of cell growth " *Exp. Hematol* 17 (3):211-217
- 85.- Vehlenger, D.E. et al (1992) " A pharmacodynamic model of erythropoietin therapy for uremic anemia " *Clin Pharmacol. Ther.* 51(1):76-89
- 86.- Wang, F.F. et al. (1985) " Some chemical properties of human erythropoietin " *Endocrinology* 116:2286-2292.
- 87.- Watschinger, B. et al. (1991) " Effect of recombinant human erythropoietin on anterior pituitary function in patients on chronic hemodialysis " *Hormon. Res.* 36(1-2):22-26
- 88.- Wide L. and Bengtsson C. (1990) " Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin " *Br. J. Haematol* 76 (1):121-127.
- 89.- Wognum A. et al. (1990) " Detection and isolation of the erythropoietin receptor using biotinylated erythropoietin " *Blood* 76(4):697-705
- 90.- Wognum A., Krystal G. et al (1992) " Increased erythropoietin-receptor expression on CD34-positive bone marrow cells from patients with chronic myeloid leukemia " *Blood* 79 (3): 642-649
- 91.- Wolfgang, Jelkman. (1986) " Renal erythropoietin: properties and production " *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 104:139-194

- 92.- Yonekura, S. et al (1991) " Erythropoietin receptors induced by dimethyl sulfoxide, exhibit positive cooperativity associated with an amplified biologic response " Proc. Natl. Acad. Sci. 88(6): 2535-2539
- 93.- Yoshimura A. et al (1990) " Friend-spleen focus-forming virus glycoprotein p55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism " Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87(11) : 4139-4145.
- 94.- Yoshimura, A. (1992) " In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and associated protein, p130 " Moll. Cell. Biol. 12 (2):706-715.
- 95.- Zucali, J.R. and Sulhowski E. (1985) " Purification of human urinary erythropoietin on controlled-pore glass and stalic acid " Exp. Hematol. 13(8):833-837.