

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LA PARTICIPACIÓN DE LA ERITROPOYETINA EN LA FISIOLOGÍA  
VETERINARIA: ESTUDIO DE REVISIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**JESUS ANGEL AGUIRRE PINEDA**

Asesora:

MVZ MC PhD Maricela Ortega Villalobos

México D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer primeramente a Dios, por todos los dones y adversidades con que ha bendecido mi vida.*

*A mi país, a todos los mexicanos honestos y trabajadores que, día a día y en todos los niveles, luchan por una mejor nación, nuestra nación.*

*A la máxima casa de estudios y a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, contribuyen al desarrollo de la esperanza más grande de la humanidad: la educación.*

*A mis padres, Jesús y Alicia, para quienes las palabras de agradecimiento me son irremediamente insuficientes. Su amor y grandeza como seres humanos han sido la mayor fuerza impulsora de mi crecimiento personal.*

*A mi hermano César, mis abuelos Ángel y Ma. de la Luz, Jesús y Ma. del Pilar, mis tías Martha y Elia y mis amigos Carlos García y Fabiola Rocha. Por su cariño y compañía de siempre, por estar conmigo en los momentos hermosos, pero también en los difíciles.*

*A todos mis maestros, compañeros y alumnos, por su continua y valiosa retroalimentación.*

*A la Dra. Maricela Ortega Villalobos, por su gran apoyo y su excelente trabajo como asesora, así como por ser una fuente constante de inspiración.*

*A la Dra. Carmen Frías, quien con su amistad y su ejemplo, y al compartir generosamente sus vastos conocimientos sobre la fisiología, ha hecho contribuciones invaluable a mi formación académica y crecimiento personal.*

*A la Dra. Sara Caballero, la mejor jefa de todas. Amante, como yo, del sushi.*

*A mis amigos Karla Luévanos, Óscat Arellano y Diego Rolón, “viajeros del mismo barco”.*

*A Praxedis Rosales, porque me ha abierto los ojos de muchas maneras, por la madurez que transmite, por su apoyo y compañía durante mi proceso de titulación.*

*A los animales en general, por tantos bienes que nos brindan, por tantas cosas que nos enseñan, y a quienes, para vergüenza de la humanidad, no hemos aprendido a respetar como es debido.*

*Y por último, quiero agradecer nuevamente a Dios, esta vez por haber creado un universo maravilloso, susceptible de ser explorado por el hombre a través de la ciencia.*

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>II. ANTECEDENTES HISTÓRICOS .....</b>	<b>5</b>
<b>III. FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS .....</b>	<b>9</b>
Estructura química de la eritropoyetina .....	9
Regulación de la expresión del gen de la eritropoyetina .....	12
<b>IV. SITIOS DE PRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
Riñones .....	15
Hígado.....	16
Otros sitios.....	18
<b>V. HIPOXIA TISULAR: PRINCIPAL ESTÍMULO DE LA PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA .....</b>	<b>20</b>
Factores que afectan la presión tisular de oxígeno .....	20
Mecanismo molecular de detección de oxígeno .....	26
<b>VI. OTROS FACTORES REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA .....</b>	<b>32</b>
Angiotensina II .....	32
Tejidos fuera del riñón .....	32
<b>VII. LA ERITROPOYETINA EN EL PLASMA .....</b>	<b>37</b>
Dinámica de producción.....	38
Metabolismo .....	39
<b>VIII. EFECTO ERITROPOYÉTICO .....</b>	<b>42</b>
Células blanco: progenitores eritroides.....	42
Mecanismo de acción y receptor .....	43
<b>IX. EFECTOS NO ERITROPOYÉTICOS .....</b>	<b>47</b>

Efectos en el sistema nervioso .....	47
Efectos en el sistema cardiovascular .....	50
Efectos en diversos tejidos .....	53
Aprovechamiento terapéutico de los efectos no eritropoyéticos .....	57
<b>X. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....</b>	<b>59</b>
Exceso .....	59
Deficiencia .....	63
<b>XI. ALGUNOS USOS DE LA ERITROPOYETINA EN MEDICINA VETERINARIA .....</b>	<b>66</b>
Tratamiento de la insuficiencia renal crónica en perros y gatos.....	66
Otros usos terapéuticos .....	70
Dopaje en animales de carrera.....	73
Eritropoyetina recombinante canina (rcEPO), eritropoyetina recombinante felina (rfEPO) y organismos transgénicos.....	74
REFERENCIAS .....	76
FIGURAS.....	114
CUADROS.....	119

## RESUMEN

AGUIRRE PINEDA JESUS ANGEL. La participación de la eritropoyetina en la fisiología veterinaria: estudio de revisión (bajo la dirección de MVZ MC PhD Maricela Ortega Villalobos).

La importancia biológica y el potencial terapéutico de la eritropoyetina han subrayado en los últimos años la necesidad de comprender ampliamente los mecanismos que regulan la producción de esta hormona, así como sus funciones. La eritropoyetina, una glucoproteína producida en los riñones de los mamíferos adultos y en el hígado fetal, provoca aumento de la concentración sanguínea de glóbulos rojos al estimular a los progenitores eritroides en la médula ósea. La hipoxia tisular, que puede ser resultado de la anemia o la hipoxemia, es el principal estímulo que desencadena su producción. La eritropoyetina posee además varias acciones no eritropoyéticas, entre las que podemos citar su participación en el desarrollo embrionario y una amplia gama de efectos neuroprotectores, cardioprotectores, angiogénicos y antiinflamatorios. También puede ejercer una acción hipertensora cuando es administrada de manera prolongada y sus efectos se han visto involucrados de manera controversial en la biología del crecimiento tumoral. Es probable que, además del conocido uso de eritropoyetina recombinante humana (rhEPO) en el tratamiento de la anemia de pacientes con insuficiencia renal crónica, el aprovechamiento de los efectos no eritropoyéticos de la hormona sea beneficioso para la medicina veterinaria en el futuro.

## I. INTRODUCCIÓN

Ha pasado más de un siglo desde que Carnot y Deflandre sugirieron la existencia de una hormona reguladora de la eritropoyesis, a la que nombraron “hemopoyetina”. Con el transcurso de los años, un notable trabajo de investigación (Fisher, 2010) ha hecho posible la consolidación de los conocimientos que hoy se tienen sobre la eritropoyetina en relación con su estructura química, los sitios de su producción, la regulación de su síntesis, su mecanismo de acción y sus diversos efectos. El progreso científico alcanzado ha conducido además al desarrollo de uno de los avances más importantes en el tratamiento de la anemia: el uso de eritropoyetina recombinante humana (rhEPO) y sus análogos en pacientes con insuficiencia renal crónica y tumores malignos (Jelkmann, 2007b). El notable valor terapéutico que ha mostrado la hormona permite afirmar que la disponibilidad comercial de rhEPO es uno de los regalos más grandes que la tecnología de ADN recombinante le ha dado al mundo.

La eritropoyetina, hormona producida principalmente en los riñones de los mamíferos adultos, es el factor responsable de estimular la proliferación y liberación de glóbulos rojos en la médula ósea en respuesta a la anemia o la hipoxemia. Su bien conocido efecto sobre la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre constituye una de las acciones compensatorias más importantes que se desarrollan frente a la falta de disponibilidad del vital gas. Este efecto dista mucho de ser fisiológicamente irrelevante, pues las alteraciones en la producción de la hormona pueden generar trastornos hematológicos graves. Así, una deficiencia de eritropoyetina conduce a anemia, como puede observarse en pacientes con insuficiencia renal crónica, mientras que una producción excesiva de la hormona provoca eritrocitosis, por ejemplo durante la hipoxemia crónica o cuando se desarrollan ciertos tumores (Jelkmann, 1992). Una sólida comprensión de los procesos fisiopatológicos relacionados con estas alteraciones podría

contribuir a establecer diagnósticos más precisos y a orientar adecuadamente los procedimientos terapéuticos.

Aunque el uso de rhEPO ha sido mucho más extenso en medicina humana, también se administra rhEPO para el tratamiento de la anemia de perros y gatos que padecen insuficiencia renal crónica (Langston et al. 2003). En caballos de carrera, el uso de rhEPO para aumentar la capacidad de transporte de oxígeno es una práctica ilícita que conlleva el riesgo de causar trastornos relacionados con un hematocrito elevado e hiperviscosidad de la sangre (McKeever, 2011), así como de generar hipoplasia eritroide y anemia debido a la formación de anticuerpos anti-rhEPO que reaccionan de manera cruzada con la eritropoyetina endógena, lo que resulta en la inhibición de la eritropoyesis (Piercy et al. 1998).

La eritropoyetina no sólo ejerce efectos sobre la médula ósea; se ha reportado además que tiene acciones neuroprotectoras (Sakanaka et al. 1998) y cardioprotectoras (Calvillo et al. 2003). El descubrimiento de estos efectos no eritropoyéticos ha captado recientemente la atención de los investigadores y los clínicos, abriendo la posibilidad de explorar nuevas aplicaciones farmacológicas de la hormona. En la literatura médica humana existen revisiones recientes sobre el uso de eritropoyetina en el tratamiento de diversas alteraciones nerviosas (Sargin et al. 2010; Velly et al. 2010; Xiong et al. 2011) y cardiovasculares (Ruifrok et al. 2008; Tilling y Clapp, 2012). Sin embargo, la información relacionada con estos temas es incipiente en medicina veterinaria.

Ante las importantes funciones que cumple la eritropoyetina en el organismo y el extraordinario impacto que ha tenido la rhEPO como agente terapéutico, parece incuestionable la necesidad de comprender ampliamente la fisiología de la hormona. La información que existe en la actualidad sobre los mecanismos de producción y las funciones biológicas de la eritropoyetina es ciertamente muy extensa pero se encuentra dispersa. En varios libros de texto de fisiología se expone este importante tema en un espacio menor que una cuartilla, si acaso se hace. Además, no hay revisiones recientes que aborden los complejos aspectos biológicos de la hormona desde una perspectiva veterinaria.



El objetivo de este estudio es ofrecer una revisión concisa y actualizada sobre la fisiología de la eritropoyetina. Su contenido se sustenta en el análisis e integración de la información que ha sido publicada hasta el momento en revistas de bioquímica, biología molecular, endocrinología, hematología, fisiopatología, terapéutica y práctica clínica. Comienza con una breve reseña histórica que retoma los sucesos más relevantes que permitieron establecer los conocimientos actuales sobre la fisiología de la hormona. Posteriormente se revisa lo concerniente a su estructura química, sus sitios de producción, la regulación de su síntesis, su cinética en el plasma, así como los efectos que ejerce al actuar sobre diversos tejidos. Algunos aspectos fisiopatológicos y clínicos se discuten en la parte final del trabajo.

## II. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La historia de la eritropoyetina, una de las más fascinantes en el campo de la medicina, comienza en la segunda mitad del siglo XIX, cuando se identificó la alta capacidad de transporte de O<sub>2</sub> de la sangre de los individuos que residen a grandes altitudes. En un principio se creyó que esta característica era hereditaria; sin embargo, la observación de un incremento del conteo de glóbulos rojos en humanos y animales que viajaron a sitios elevados dejaría claro que la eritropoyesis es en realidad estimulada por la hipoxemia (Jelkmann, 1992; Jelkmann, 2007b; Fisher, 2010).

En 1906, Carnot y Deflandre sugirieron por primera vez la existencia de un factor humoral que regula la eritropoyesis (“hemopoyetina”), esto después de observar un incremento rápido del número de glóbulos rojos en conejos a los que inyectaron suero de donadores ligeramente anémicos. No obstante, para que la aplicación de eritropoyetina realmente induzca eritrocitosis se requiere de un lapso de varios días, por lo que estos resultados fueron quizás un capricho de la casualidad, controversiales y difíciles de reproducir, lo que provocó que la existencia de la “hemopoyetina” fuera puesta en duda durante el transcurso de los años siguientes. Aunque engañosas, las observaciones de Carnot y Deflandre sentaron las bases del concepto actual, que establece la participación de un factor hormonal en la estimulación de la eritropoyesis cuando los animales sufren de anemia o hipoxemia (Jelkmann, 1992; Jelkmann, 2007b; Fisher, 2010).

En 1948 se introdujo el término “eritropoyetina” (Bonsdorff y Jalavisto, 1948), el cual hace referencia a un efecto más específico que el nombre anterior.

La idea de la existencia de un factor humoral capaz de estimular la eritropoyesis retomó fuerza cuando Reissmann (1950), trabajando con un par de ratas parabióticas, indujo hipoxemia crónica a una de ellas, mientras que mantuvo a la

otra en condiciones normóxicas; ambos animales mostraron un aumento de los reticulocitos, brindando evidencia de la producción de un factor humoral en el animal hipóxico que, transportado a través de la circulación parabiótica, lograba estimular la eritropoyesis en el animal que respiraba aire normal. Tres años después, Erslev (1953) reportó un aumento significativo del número de reticulocitos en conejos normales a los que inyectó grandes cantidades de plasma procedentes de donadores anémicos, con lo que se apoyaba la hipótesis de la existencia de la eritropoyetina. En su trabajo, proclamó: “Posiblemente el aislamiento y la purificación de este factor proporcionarían un agente útil en el tratamiento de condiciones asociadas con la depresión eritropoyética, como la infección crónica y la enfermedad renal crónica”. De esta manera Erslev predijo, hace 60 años, el impacto que más tarde tendría la eritropoyetina como un agente terapéutico. Finalmente, a mediados de la década de los 50, en pacientes con ducto arterioso persistente, se reportó el hallazgo de hiperplasia de la médula ósea en algunas zonas que presentaban una presión normal de oxígeno, con lo que se siguió descartando un efecto directo de la falta de O<sub>2</sub> sobre la proliferación de los progenitores de glóbulos rojos, y se reafirmó idea de que era un factor humoral el responsable de estimular la eritropoyesis ante la hipoxia (Stohlman et al. 1954; Schmid y Gilberstsen, 1955).

Durante los años siguientes se haría evidente el hecho de que los riñones participan en la producción del factor eritropoyético. Jacobson et al. (1957) publicaron sus hallazgos de que la nefrectomía bilateral en ratas prevenía el aumento de la eritropoyetina plasmática que se presenta durante el estrés hipóxico. Gallagher et al. (1959) reportaron que, a diferencia de los pacientes con otros tipos de anemia, cuyo plasma contiene al factor eritropoyético, el plasma de los pacientes anémicos urémicos carecía de tal factor. Por su parte, Kuratowska et al. (1961) perfundieron con sangre varios órganos aislados de conejo y los expusieron a la hipoxia experimental, encontrando que sólo los riñones generaban el factor eritropoyético.

A pesar de los hallazgos anteriores, la producción renal de eritropoyetina no fue reconocida durante muchos años, principalmente por la falta de éxito en los intentos realizados para extraer la hormona de los riñones. En su lugar, se postuló que los riñones hipóxicos liberaban una enzima (“eritrogenina”) capaz de generar eritropoyetina a partir de un precursor hepático presente en la sangre (Gordon et al. 1967). El concepto de la eritrogenina perdió fuerza cuando Erslev (1974) demostró actividad de eritropoyetina en riñones de conejo perfundidos con líquido libre de suero. En la década siguiente, el hallazgo de eritropoyetina y de ARNm de eritropoyetina en riñones hipóxicos brindaría evidencia definitiva de la producción de la hormona en las células renales, como se expone en la sección IV.

La purificación de la eritropoyetina humana fue lograda a finales de la década de los 70 (Miyake et al. 1977), mientras que el aislamiento y la clonación de su gen se consiguieron en 1985 (Jacobs et al. 1985; Lin et al. 1985). Con el tiempo, estos avances condujeron de manera exitosa a la producción comercial de rhEPO con fines terapéuticos y de investigación. Desde entonces, el progreso científico relacionado con la eritropoyetina ha tenido un rápido avance.

Al finalizar la década de los 80, aunque se sabía que la hipoxia tisular era el principal estímulo que induce la producción de la hormona, los mecanismos bioquímicos subyacentes aún eran desconocidos. Incluso era incierto si la detección de oxígeno y la producción de eritropoyetina eran funciones realizadas por una misma célula (Jelkmann, 1992). A principios de la década de los 90, se reportó la unión de un factor de transcripción inducido por hipoxia a un potenciador del gen de la eritropoyetina (Semenza et al. 1991b; Semenza y Wang, 1992). Este avance fue de crucial importancia para comprender el mecanismo molecular mediante el que la hipoxia tisular induce la producción de eritropoyetina. La caracterización y la purificación del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1, por su nombre en inglés: *hypoxia-inducible factor 1*) fueron reportadas por Wang y Semenza (1995).

El descubrimiento de nuevos efectos de la eritropoyetina ha sido unos de los aspectos más llamativos de la fisiología de la hormona durante los últimos 15

años. A finales de la década de los 90 se encontró que la eritropoyetina tiene un efecto neuroprotector frente a la isquemia (Sakanaka et al. 1998) y, unos años más tarde, que protege al miocardio del daño causado por la isquemia-reperfusión (Calvillo et al. 2003). Desde entonces, una abrumadora cantidad de estudios, en los que se reconocen los efectos no eritropoyéticos de la hormona, ha dejado en el pasado la idea de que la eritropoyetina actuaba únicamente sobre la médula ósea. Estos descubrimientos continúan resaltando el potencial terapéutico de esta glucoproteína, así como la importancia de seguir realizando investigación en torno a sus aspectos fisiológicos y sus posibles aplicaciones clínicas.

### III. FUNDAMENTOS BIOQUÍMICOS

En esta sección se abordan algunos aspectos bioquímicos de la eritropoyetina humana, lo que se justifica no sólo porque es la más estudiada, sino también por la disponibilidad comercial de rhEPO como producto utilizado incluso en la práctica veterinaria. Desde los puntos de vista físico-químico y biológico, la eritropoyetina humana purificada a partir de la orina es prácticamente indistinguible de la rhEPO producida en células CHO (del inglés “Chinese hamster ovary”) (Imai et al. 1990), y esta última ha sido utilizada rutinariamente en la clínica tanto veterinaria como humana.

#### **Estructura química de la eritropoyetina**

*La eritropoyetina circulante es una glucoproteína que cuenta con 165 residuos de aminoácidos y cuatro cadenas laterales de oligosacáridos.*

El gen de la eritropoyetina humana codifica una prohormona de 193 aminoácidos, la cual incluye una secuencia líder hidrofóbica de 27 residuos (Lin et al. 1985), cuya escisión se lleva a cabo en la terminación amino del polipéptido (Recny et al. 1987). Lo anterior podría hacer pensar en una proteína constituida por 166 aminoácidos; sin embargo, la eritropoyetina madura (circulante) contiene en realidad 165 residuos de aminoácidos, ya que además carece de la arginina en la posición 166 carboxilo-terminal que es predecible a partir de la secuencia de nucleótidos (Recny et al. 1987; Imai et al. 1990).

Durante el siglo XX, numerosas investigaciones, particularmente en la década de los 80, contribuyeron al conocimiento preciso de la estructura química de la eritropoyetina humana. Actualmente se sabe que se trata de una glucoproteína

con una masa molecular de 30 400 y un contenido de carbohidratos de aproximadamente 39% (Davis et al. 1987). Posee dos puentes disulfuro: uno entre el residuo Cys-7 y el Cys-161 y el otro entre Cys-29 y Cys-33 (Lai et al. 1986). La porción de carbohidratos de la molécula consiste en cuatro cadenas laterales de oligosacáridos distribuidas de la siguiente manera: tres N-glicosilaciones en los residuos de asparagina en las posiciones 24, 38 y 83, y una O-glicosilación en el residuo de serina en la posición 126 (Lai et al. 1986; Broudy et al. 1988). Las cadenas posicionadas en los enlaces N-glicosídicos forman principalmente complejos tetra-antenarios (Sasaki et al. 1987). Se han identificado algunos dominios funcionalmente importantes en la superficie de la molécula de la eritropoyetina, en sitios comparables con los establecidos para otras citocinas (Wen et al. 1994). La estructura de la eritropoyetina humana en solución también se ha determinado mediante la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Cheetham et al. 1998). En la figura 1 se representa la estructura primaria de la eritropoyetina humana.

*La porción de oligosacáridos es esencial para la actividad in vivo de la eritropoyetina.*

La glicosilación de la proteína en los sitios específicos es esencial para la biosíntesis, secreción y función biológica de esta hormona (Dubé et al. 1988). La eliminación enzimática de la mayor parte de los carbohidratos de la molécula de eritropoyetina resulta en pérdida de la actividad biológica cuando se prueba en ratones, pero no cuando se prueba en cultivos celulares, lo que indica que la porción de los oligosacáridos es necesaria para la actividad *in vivo* de la hormona, pero no propiamente para la estimulación de sus células blanco en la médula ósea (Dordal et al. 1985). Los residuos terminales de ácido siálico son particularmente importantes, ya que determinan el destino metabólico de la molécula: su simple eliminación origina que la galactosa, que ocupa la penúltima posición, quede expuesta, lo que provoca que la hormona sea rápidamente removida del plasma mediante la participación de receptores para galactosa localizados en el hígado

(Spivak y Hogans, 1989). Por el contrario, la N-glicosilación adicional experimental ha mostrado un aumento de la actividad *in vivo* de la hormona y una mayor duración de su acción (Elliott et al. 2003). Esto puede tener un impacto positivo en la clínica, pues permite la reducción de la frecuencia de administración del fármaco a los pacientes. Al respecto, ha sido sintetizado el darbepoetin alfa, un análogo de la eritropoyetina humana que presenta una mayor glicosilación y tiene una vida media más prolongada (Macdougall, 2002; Cases, 2003).

Por otro lado, la adición de polietilenglicol mejora la actividad *in vivo* de la eritropoyetina recombinante humana no glicosilada (resultado de la expresión del gen en bacterias como *Escherichia coli*), conocimiento que podría ser útil para el desarrollo de nuevos fármacos estimuladores de la eritropoyesis a un menor costo de producción (Wang et al. 2010b).

*La eritropoyetina humana muestra un alto grado de homología en la secuencia de aminoácidos con respecto a la eritropoyetina de otros mamíferos.*

Es importante señalar que la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina muestra un alto grado de homología entre diferentes especies de mamíferos (Wen et al. 1993), lo que explica la actividad biológica cruzada de la hormona que se ha observado en numerosos experimentos. La clonación del gen de la eritropoyetina de mono, por ejemplo, reveló una homología del 92% en la secuencia de aminoácidos (y del 94% en la secuencia de nucleótidos) con respecto a la eritropoyetina humana (Lin et al. 1986), en concordancia con la relación filogenética existente entre ambas especies. También se ha encontrado la conservación del 80% en la secuencia de aminoácidos entre la eritropoyetina de ratón y la humana (Shoemaker y Mitssock, 1986). Asimismo se ha señalado que la eritropoyetina humana es 85% idéntica a la eritropoyetina canina y felina, y entre 81-82% idéntica a las eritropoyetinas del cerdo, el borrego y la rata (Wen et al. 1993). A partir de la clonación del gen de la hormona, ha sido posible estudiar su transcripción en varias especies de interés veterinario como son la bovina



(Suliman et al. 1996), la ovina (Fu et al. 1993) y la porcina (David et al. 2001), poniéndose de manifiesto, mediante la determinación de la secuencia de aminoácidos, un alto grado de homología con respecto a la eritropoyetina humana.

Por el contrario, se ha encontrado que los factores eritropoyéticos de anfibios o de aves no logran estimular la eritropoyesis en mamíferos, y viceversa (Rosse et al. 1963; Rosse y Waldmann, 1966). No sorprende entonces que el primer gen de eritropoyetina de origen no-mamífero que fue clonado, el del pez globo *Fugu rubripes*, codifique una proteína que es sólo 32 – 34% idéntica a la eritropoyetina de varios mamíferos (Chou et al. 2004). Aunque, curiosamente, se ha reportado que la rhEPO es capaz de estimular a los linfocitos-B de la trucha arcoíris (Körbel et al. 2004).

## **Regulación de la expresión del gen de la eritropoyetina**

*La secreción de eritropoyetina depende fundamentalmente de la regulación de la expresión de su gen.*

La secreción de eritropoyetina en respuesta a la hipoxia ha mostrado ser regulada en gran medida al nivel de la transcripción (Fandrey y Bunn, 1993). Así, la identificación y cuantificación del ARNm de la hormona ha sido de gran utilidad para el estudio de su producción en diferentes tipos celulares, en numerosos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

El gen de la eritropoyetina humana, ubicado en el cromosoma 7 (Powell et al. 1986), contiene cuatro intrones y cinco exones (Lin et al. 1985). Su expresión es controlada de manera específica en cada tejido por diferentes elementos reguladores frente a un estímulo fisiológico fundamental: la hipoxia (Semenza et al. 1991a).

Múltiples factores de transcripción, incluyendo varios factores GATA (Imagawa et al. 1997; La Ferla et al. 2002; Dame et al. 2004; Makita et al. 2005; Obara et al.

2008), están involucrados en la regulación del gen de la eritropoyetina. Por ejemplo, los altos niveles de GATA-4 que se han ubicado en los hepatocitos fetales en comparación con el hígado adulto (Dame et al. 2004) podrían explicar el declive de la participación del hígado en la producción de eritropoyetina que se presenta después del nacimiento. En cambio, los factores de transcripción GATA-2 y NF-kappaB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) parecen participar en la inhibición de la expresión del gen de la eritropoyetina que ejercen determinadas citocinas (La Ferla et al. 2002; Batmunkh et al. 2006), lo cual se ha relacionado con la disminución de la producción de la hormona que tiene lugar durante procesos inflamatorios crónicos. Durante cierta etapa de la vida fetal, la expresión del gen de la eritropoyetina parece estar bajo control del ácido retinoico (Makita et al. 2001; Makita et al. 2005).

Algunos compuestos activos administrados por vía oral son capaces de modificar la expresión del gen de la eritropoyetina y se encuentran en estudios preclínicos y clínicos para su utilización como agentes terapéuticos (Jelkmann, 2007a).

*El factor de transcripción inducido por hipoxia (HIF) estimula la expresión del gen de la eritropoyetina.*

Los trabajos de Semenza et al., realizados hace ya más de veinte años, hicieron aportaciones importantes para dilucidar las bases del mecanismo molecular que regula la expresión del gen de la eritropoyetina ante la hipoxia. De crucial importancia es un potenciador 3' (Semenza et al. 1991b) al cual pueden unirse algunos factores de transcripción, como el factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) (Semenza y Wang, 1992) y el factor nuclear hepático 4 (HNF-4) (Galson et al. 1995). La inhibición del HNF-4 $\alpha$  por parte de la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Krajewski et al. 2007) podría explicar, al menos en parte, la anemia que se presenta en la inflamación crónica. El p300, que forma un ensamblaje macromolecular con HIF y con HNF-4 (Bunn et al. 1998), juega un papel

coactivador central en la inducción de la expresión de la eritropoyetina por la hipoxia (Wang et al. 2010a). La activación del HIF en un ambiente con baja presión de oxígeno es de vital importancia para inducir la transcripción del gen de la eritropoyetina, como se revisará en la sección V.

## IV. SITIOS DE PRODUCCIÓN

### Riñones

*Los riñones son el principal sitio de producción de la eritropoyetina circulante en el adulto.*

Como se ha reseñado en la sección II, ya para inicios de la década de los 70 numerosas observaciones experimentales y clínicas señalaban que los riñones están involucrados de alguna manera en la producción de eritropoyetina, pero el mecanismo preciso mediante el cual este órgano sintetiza la hormona aún se desconocía. En 1974, Erslev (1974) demostró actividad de eritropoyetina en riñones de conejo perfundidos con líquido libre de suero, indicando que la hormona como tal es sintetizada en el tejido renal, y que no es producida, como solía pensarse, mediante la intervención de una enzima liberada por los riñones capaz de actuar sobre un precursor plasmático.

Reafirmando lo anterior, en los años 80, a partir de extractos de riñones sometidos a hipoxia, pudo aislarse tanto eritropoyetina (Fried et al. 1981; Jelkmann y Bauer, 1981; Caro y Erslev, 1984) como ARNm de eritropoyetina (Beru et al. 1986; Bondurant y Koury, 1986; Schuster et al. 1987), en cantidades que contrastaban con la poca eritropoyetina que puede obtenerse de este órgano en animales normales (Jelkmann y Bauer, 1981). En esta misma época se encontró que, además de la hipoxia, la administración de cobalto podía provocar un incremento en los niveles de la hormona (Katsuoka et al. 1983) o de su ARNm (Beru et al. 1986) en los riñones.

Estas observaciones, en conjunto con los experimentos que en los años anteriores habían descartado a otros órganos como sitios importantes en la producción de la

hormona, mostraron que los riñones son, por mucho, la principal fuente de eritropoyetina circulante en el mamífero adulto.

*La eritropoyetina es producida por fibroblastos peritubulares.*

La identificación del tipo celular específico que produce la hormona dentro del riñón no fue tarea fácil; los esfuerzos experimentales de varios investigadores dieron origen a opiniones encontradas acerca de tal interrogante (Jelkmann, 1992). En 1981 se encontró que la eritropoyetina es bastante más abundante en la corteza de los riñones que en la médula (Jelkmann y Bauer, 1981), y posteriormente, en 1993, gracias a la técnica de hibridación *in situ*, fue posible concluir que el sitio de producción de la hormona son los fibroblastos peritubulares (Bachmann et al. 1993).

## **Hígado**

*El hígado ocupa el segundo lugar en producción de eritropoyetina circulante en el adulto.*

Se ha encontrado que la extirpación de una buena parte del hígado (aproximadamente el 80%) suprime el incremento de eritropoyetina plasmática que se observa en ratas nefrectomizadas sometidas a hipoxia (Fried, 1972). Con base en ello, se ha reconocido a este órgano como el segundo productor de la hormona en el animal adulto. Sin embargo, es importante señalar que el hígado no puede compensar la falta de eritropoyetina que se presenta en la insuficiencia renal crónica, por lo que en tal condición se desarrolla anemia.

Además de la hipoxia, la anemia (Bondurant y Koury, 1986) y la administración de cobalto (Beru et al. 1986) pueden inducir la acumulación de ARNm de eritropoyetina en el tejido hepático.

En el hígado, se han reconocido como células productoras de eritropoyetina a los hepatocitos (Koury et al. 1991; Schuster et al. 1992) y a las células de Ito; estas últimas están ubicadas en el espacio de Disse y presentan muchas similitudes con los fibroblastos productores de la hormona en el riñón (Maxwell et al. 1994).

La cuantificación del ARNm en ratas ha permitido estudiar la contribución del hígado a la producción de eritropoyetina. Por ejemplo, la reducción experimental del hematocrito de 0.40 a 0.15 – 0.20 resultó en un aumento de 300 veces en los niveles de ARNm de eritropoyetina en el riñón, que comprendía un 80 % del total de ARNm de eritropoyetina contra un 20 % del hígado (Fandrey y Bunn, 1993). No obstante, la respuesta del hígado parece variar según el grado de estimulación con hipoxia o anemia, pues se ha encontrado que el porcentaje de contribución de este órgano al total de ARNm de eritropoyetina es mayor conforme el grado de hipoxia o anemia hemorrágica aumenta (Tan et al. 1992).

*Durante la vida fetal, el hígado es un sitio importante de producción de la eritropoyetina.*

Con base en observaciones en diferentes especies de mamíferos, se ha establecido que el hígado es el principal sitio de producción de eritropoyetina en el feto (Zanjani et al. 1977; David et al. 2002b), aunque también existe evidencia de una marcada expresión del gen de la eritropoyetina en el riñón fetal (Lim et al. 1994; Moritz et al. 1997; David et al. 2002a). En humanos, la cuantificación del ARNm ha sugerido que el hígado es el principal sitio de expresión del gen de la eritropoyetina, no sólo en la vida fetal, sino también en la vida neonatal. No obstante, se señala la existencia de un aumento de la expresión del ARNm de la hormona en el riñón en la semana 30 de gestación, lo que podría indicar el inicio del cambio en el dominio de la producción de eritropoyetina del hígado al riñón (Dame et al. 1998).

## Otros sitios

*Se ha encontrado ARNm de eritropoyetina en varios órganos.*

Las mediciones del ARNm de eritropoyetina en animales sometidos a hipoxia o anemia experimental indican que la producción de la hormona en tejidos fuera del riñón o el hígado es cuantitativamente insignificante (Tan et al. 1992; Fandrey y Bunn, 1993). No obstante, se ha encontrado ARNm de eritropoyetina en sitios como el bazo (Tan et al. 1991; Tan et al. 1992; Fandrey y Bunn, 1993), los pulmones (Tan et al. 1991; Fandrey y Bunn, 1993), los testículos (Tan et al. 1992; David et al. 2002b), la placenta (David et al. 2002a) y el útero. En este último, la producción de eritropoyetina es estimulada por acción de los estrógenos y parece estar implicada en la angiogénesis local (Yasuda et al. 1998).

También se ha encontrado la expresión del gen de la eritropoyetina en varias regiones del cerebro de diferentes especies de mamíferos en respuesta a estímulos hipóxicos (Marti et al. 1996). En el tejido nervioso, los astrocitos (Masuda et al. 1994; Marti et al. 1996; Bernaudin et al. 2000) y las neuronas (Bernaudin et al. 2000) han sido referidos como células productoras de eritropoyetina. Asumiendo que la barrera hematoencefálica no permite el paso de cantidades importantes de la glucoproteína de origen nervioso a la sangre (y desde luego, que también restringe la llegada de la hormona de origen renal hacia el tejido cerebral), se ha pensado que la eritropoyetina actúa de manera paracrina en esta parte del organismo (Masuda et al. 1994; Marti et al. 1996; Marti et al. 1997), cumpliendo la función de un agente neuroprotector que se describe más adelante.

Adicionalmente, el hallazgo de ARNm de eritropoyetina en algunas células de la médula ósea (Stopka et al. 1998) ha hecho pensar en la interesante posibilidad de que la eritropoyetina participe en un mecanismo autocrino que regula la diferenciación de células eritroides.

La existencia de diversos sitios productores de eritropoyetina abre numerosas interrogantes sobre los mecanismos que regulan la expresión de su gen en cada órgano. Por ejemplo, ¿puede la hipoxia inducir la producción de eritropoyetina en todos esos sitios? Como parte de la respuesta a esta pregunta se ha señalado que la expresión del gen de la hormona parece estar regulada de manera específica en cada uno de los tejidos involucrados, de acuerdo con las diversas funciones cumplidas por la eritropoyetina en distintos sitios y bajo diferentes situaciones. Un ejemplo de ello puede ser la observación de que el ARNm de eritropoyetina en el útero es inducido por la hipoxia, pero sólo en presencia de estrógenos (Chikuma et al. 2000).

*Los sitios de producción de eritropoyetina varían entre los vertebrados.*

Mientras que los riñones han sido considerados como principal sitio de producción de eritropoyetina en el caso de los mamíferos y las aves, se ha identificado al corazón como el sitio más importante de expresión del gen de la eritropoyetina en peces teleósteos (Chou et al. 2004; Katakura et al. 2013), y se ha encontrado una notable expresión del ARNm de la eritropoyetina en los pulmones del anuro *Xenopus laevis* (Nogawa-Kosaka et al. 2010). Evidentemente, hay variaciones importantes en los sitios de producción de la hormona entre diferentes vertebrados. Sin embargo, la evidencia de que el riñón es una fuente de eritropoyetina también en peces teleósteos ha hecho reflexionar sobre la base evolutiva de la producción de la hormona en este órgano (Wickramasinghe, 1993).



## V. HIPOXIA TISULAR: PRINCIPAL ESTÍMULO DE LA PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA

La función primordial de la eritropoyetina es estimular la producción de glóbulos rojos, lo que permite que los niveles de éstos en la sangre se mantengan dentro de un rango fisiológicamente adecuado. Asimismo, un aumento de la concentración de glóbulos rojos en la sangre puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la síntesis de la hormona. Sin embargo, resulta necesario aclarar que, en este sistema de retroalimentación negativa, es la *presión tisular de oxígeno* (y no la concentración de eritrocitos o de hemoglobina en la sangre) lo que regula directamente la síntesis de la hormona. Así, la hipoxia tisular es el principal estímulo de la producción de eritropoyetina.

La presión tisular de oxígeno depende de varios factores como la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, la presión de oxígeno en la sangre arterial, la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y el flujo sanguíneo. Por lo tanto, cualquier alteración de estos factores que conduzca a una menor oxigenación tisular puede estimular la producción de eritropoyetina, como se describe a continuación.

### **Factores que afectan la presión tisular de oxígeno**

La producción de eritropoyetina es estimulada por: 1) la disminución de la capacidad de transporte de oxígeno (por ejemplo, durante la anemia), 2) la disminución de la presión arterial de oxígeno (es decir, la hipoxemia) y 3) el aumento de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno (desplazamiento de la

curva de disociación de la hemoglobina hacia la izquierda). Esta información se resume en el cuadro 1.

### *1. Capacidad de transporte de oxígeno de la sangre.*

La molécula de hemoglobina, localizada en los glóbulos rojos, cumple la vital función de transportar oxígeno a los tejidos. Estructuralmente está conformada por cuatro subunidades, cada una de las cuales consiste en un polipéptido y un grupo hemo, al que se fija el oxígeno. Puesto que la mayor parte del oxígeno (cerca del 98.5% en el caso de la sangre arterial) se transporta unido a esta molécula, es evidente que la capacidad de la sangre para transportar oxígeno depende de su contenido de hemoglobina.

Un gramo de hemoglobina es capaz de combinarse hasta con 1.34 mL de oxígeno. En varios mamíferos, un decilitro de sangre normal contiene aproximadamente 15 g de hemoglobina. Por lo tanto, los 15 gramos de hemoglobina presentes en un decilitro de sangre pueden combinarse con unos 20.1 mL de oxígeno ( $15 \times 1.34$ ) cuando la hemoglobina se satura por completo. Un decilitro de sangre que contuviera únicamente 10 g de hemoglobina (anemia) podría transportar sólo 13.4 mL de oxígeno ( $10 \times 1.34$ ) unidos a la hemoglobina. En el caso opuesto, un decilitro de sangre que contuviera 20 g de hemoglobina (eritrocitosis) sería capaz de transportar hasta 26.8 mL de oxígeno ( $20 \times 1.34$ ) combinados con la hemoglobina. Nótese, con base en estos ejemplos, que la capacidad de transporte de oxígeno aumenta cuando la concentración de hemoglobina también lo hace.

La actividad de eritropoyetina en el plasma aumenta conforme la capacidad de transporte de oxígeno se reduce. Es bien conocido el hecho de que la concentración de eritropoyetina circulante se encuentra considerablemente incrementada en animales con anemia, excepto en aquellos con insuficiencia renal crónica (Cook y Lothrop, 1994; Pechereau et al. 1997), en los que la disfunción del riñón provoca deficiencia de eritropoyetina, la cual precisamente es la causa de

esta anemia. En ratas, los títulos de eritropoyetina en el plasma aumentan de manera exponencial tras la inducción de anemia isovolémica (Jelkmann y Seidl, 1987). Las hemorragias, al disminuir la disponibilidad de hemoglobina en la sangre, han mostrado inducir la producción de la hormona en varios animales experimentales (Beru et al. 1986; Bondurant y Koury, 1986; Fu et al. 1993).

Tratando de comprender los mecanismos reguladores de la eritropoyesis, en un estudio se practicó el desangramiento experimental y la hiperhidratación en ratones, observándose que en ambas situaciones, que implican una reducción del hematocrito, se generó un incremento del número de progenitores eritroides en la médula ósea y de reticulocitos periféricos. Por el contrario, un aumento del hematocrito, provocado por transfusión sanguínea o mediante deshidratación, mostró un decremento en el número de progenitores eritroides y reticulocitos. Estos autores han sugerido que, además de otros factores relacionados con el balance entre el aporte y el consumo de oxígeno, el hematocrito afecta significativamente la eritropoyesis (Misago et al. 1986).

## *2. Presión de oxígeno en la sangre arterial.*

El porcentaje de saturación de la hemoglobina es determinado por la presión de  $O_2$  en la sangre. La presión de oxígeno en la sangre arterial ( $PaO_2$ ) depende directamente de la presión de oxígeno en los alveolos ( $PAO_2$ ), la cual a su vez está en función de la  $PO_2$  del aire inspirado. Puesto que la  $PO_2$  en la atmósfera disminuye conforme la altitud aumenta, la exposición de un animal a grandes altitudes le provoca hipoxemia, lo que origina un aumento en la producción de eritropoyetina y eritrocitosis.

El aumento de los niveles de eritropoyetina inducido por la exposición a un ambiente hipóxico es transitorio. Se ha observado que, a las pocas horas o días de residir a grandes altitudes, la concentración plasmática de eritropoyetina disminuye a valores no muy distintos de aquellos registrados antes de la exposición a la hipoxia en caballos (McKeever et al. 2010), humanos y ratones

(Abbrecht y Littell, 1972). Este fenómeno exige algún tipo de explicación y se abordará más adelante, en la sección VII.

Tratando de dilucidar el mecanismo de la adaptación hematológica de los équidos a las grandes altitudes (aumento de ~28 % en el volumen de glóbulos rojos), McKeever et al. (2010) midieron la concentración plasmática de eritropoyetina antes, durante y después de la exposición de seis animales a un ambiente hipóxico (altitud de 3 800 m, presión barométrica = 487 mmHg). Los niveles de la hormona aumentaron considerablemente durante el primer día de exposición a la hipoxia, pero al segundo día ya habían regresado al nivel basal y no cambiaron durante los días restantes en que permanecieron a gran altitud. Por lo tanto, la adaptación hematológica a las grandes altitudes parece ser resultado del incremento rápido y transitorio en los niveles plasmáticos de eritropoyetina. En este estudio, la realización de ejercicio agudo no alteró significativamente la concentración plasmática de la hormona a nivel del mar o a 3 800 m, sugiriendo que el ejercicio es incapaz de potenciar la respuesta frente a la hipoxia.

Por otro lado, la eliminación de los cuerpos carotideos (lo cual implica una inhibición de la respuesta a la hipoxia mediada por los quimiorreceptores periféricos) acentuó la respuesta eritropoyética en gatos expuestos a la hipoxia (Paulo et al. 1972), probablemente como resultado de la disminución de la actividad refleja del centro respiratorio, lo que exacerba la disminución de la presión arterial de O<sub>2</sub>.

### *3. Afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.*

Cuando la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> es alta, se compromete el aporte del vital gas a los tejidos. El aumento del pH, la disminución de la temperatura y la reducción de la concentración de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) son algunos de los factores fisicoquímicos capaces de desplazar la curva de disociación de la hemoglobina hacia la izquierda, es decir, de aumentar la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> y dificultar la entrega del gas a los tejidos.

Se ha observado un aumento en la concentración plasmática de eritropoyetina en ratas provistas de sangre altamente afín al  $O_2$  (Lechermann y Jelkmann, 1985). Además, la exposición de animales experimentales a diferentes tipos de estrés hipóxico ha brindado evidencia de que un desplazamiento de la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la izquierda estimula la producción de eritropoyetina, particularmente cuando la capacidad de transporte de  $O_2$  de la sangre es baja (Jelkmann y Seidl, 1987).

El descenso del pH disminuye la afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$ , lo que se conoce como efecto Bohr. En aparente concordancia con esto, el aumento de  $CO_2$  en la sangre (Zucali et al. 1978; Miller y Howard, 1979) y la acidosis (Eckardt et al. 1990a) han sido asociados con una disminución de la producción de eritropoyetina ante la hipoxia. En cambio, la alcalosis respiratoria, como la que se desarrolla durante las primeras horas de exposición a la hipoxia, genera definitivamente una mayor afinidad de la sangre por el  $O_2$ , lo cual se ha relacionado con el incremento de la concentración sérica de eritropoyetina observado durante la fase inicial de exposición a la hipoxia (Miller et al. 1973).

El 2,3-DPG es un fosfato que, en los glóbulos rojos, disminuye la afinidad de la hemoglobina por el  $O_2$ . Durante la exposición a las grandes altitudes, la alcalosis y la hipocapnia continuas generan un incremento gradual de la concentración de 2,3-DPG, el cual, al dar como resultado una menor afinidad de la sangre por el  $O_2$ , podría contribuir a explicar la disminución de la concentración de eritropoyetina que se observa durante la exposición prolongada a la hipoxia (Miller et al. 1973). Los perros con anemia por insuficiencia renal crónica muestran concentraciones elevadas de 2,3-DPG, lo que en estos animales representa un mecanismo compensatorio que facilita la entrega del gas a los tejidos (King et al. 1992). Por otro lado, los escasos niveles de 2,3-DPG presentes en la sangre almacenada para transfusión, que en consecuencia presenta una alta afinidad por el  $O_2$ , poseen relevancia clínica; este tipo de sangre no genera una caída tan importante de los niveles séricos de eritropoyetina como la que se observa con la transfusión

de sangre fresca. Así, la afinidad por el O<sub>2</sub> de la sangre transfundida afecta la oxigenación tisular (Napier, 1980).

De los estudios sobre los efectos de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno sobre la producción de eritropoyetina se han obtenido resultados interesantes. En comparación con las ratas control, las ratas con sangre altamente afín al oxígeno presentan mayores niveles plasmáticos de eritropoyetina cuando se exponen a una altitud de 300 o de 4 750 m, pero prácticamente los mismos niveles a una altitud de 7 000 m (que son desde luego niveles altos de eritropoyetina, pues se trata de una hipoxia severa) (Lechermann y Jelkmann, 1985). Por lo tanto, una alta afinidad de la sangre por el oxígeno acentúa la producción de eritropoyetina en condiciones normóxicas o de hipoxia moderada; sin embargo, cuando los animales se someten a una hipoxia verdaderamente extrema (altitud simulada de 7 000 m), la desventaja de una menor oxigenación tisular que representa la alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es compensada por una mejor captación del gas en los pulmones (Lechermann y Jelkmann, 1985). En relación con esto, se ha planteado que, fisiológicamente, la afinidad óptima de la sangre por el oxígeno varía según el grado de hipoxia (Shimizu et al. 1989).

La inhalación de monóxido de carbono (CO) estimula de manera impresionante la producción de eritropoyetina como consecuencia de una capacidad de transporte de O<sub>2</sub> disminuida (poco oxígeno puede ser transportado) y de la alta afinidad de la carboxihemoglobina por el O<sub>2</sub> (el ya de por sí poco oxígeno que se puede transportar, no es cedido fácilmente a los tejidos) (Jelkmann y Seidl, 1987). El CO también es responsable de la hipoxia tisular crónica que se presenta en los fumadores, en quienes de manera compensatoria puede apreciarse un hematocrito considerablemente aumentado (Sagone et al. 1973).

#### *4. Flujo sanguíneo.*

La localización de las células productoras de eritropoyetina en la corteza renal resulta fisiológicamente adecuada. En este sitio, la presión de O<sub>2</sub> depende del

consumo del gas durante la reabsorción tubular de sodio, proceso que ocurre de manera aproximadamente proporcional a la filtración glomerular. Por lo tanto, dentro de límites fisiológicos, la disminución del flujo de sangre a los riñones se acompaña de una reducción paralela del consumo local de O<sub>2</sub>, de modo que no se presenta hipoxia tisular. Erslev et al. (1985) han señalado que esta particularidad es lo que evita el desarrollo de un círculo vicioso durante la eritrocitosis severa, en el cual la hiperviscosidad de la sangre y la consecuente disminución del flujo a los riñones provocarían hipoxia tisular, estimulación de la síntesis de eritropoyetina y una mayor producción de glóbulos rojos.

En efecto, en ratas experimentales, la reducción del flujo sanguíneo a los riñones mediante la oclusión de ambas arterias renales no mostró ser un estímulo muy importante para la síntesis de eritropoyetina (Pagel et al. 1989). La producción de la hormona se incrementa de manera mucho más notable durante la hipoxia sistémica, la cual es resultado de la anemia o la hipoxemia (Jelkmann, 2011).

## **Mecanismo molecular de detección de oxígeno**

Como se ha mencionado, la inducción de la expresión del gen de la eritropoyetina depende de manera muy importante del factor inducido por hipoxia (HIF, del inglés “hypoxia-inducible factor”), el cual es activado en un ambiente con baja presión de O<sub>2</sub>. En realidad, los HIF no sólo son importantes en sitios que expresan el gen de la eritropoyetina, sino en una gran variedad de células de mamífero (Wang y Semenza, 1993). De hecho, participan en la regulación de decenas de genes diferentes (Wenger et al. 2005), incluyendo algunos involucrados en la codificación de transportadores de glucosa (Allen et al. 2006), la angiogénesis (White et al. 2004) y la homeostasis del hierro (Peyssonnaud et al. 2007; Kapitsinou et al. 2010).

El factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1) fue descrito en la década de los 90. Estructuralmente, dicho factor está conformado por dos subunidades diferentes:

una subunidad alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y una beta (HIF-1 $\beta$ ) (Wang y Semenza, 1995); ambas son proteínas hélice-bucle-hélice-básica que contienen un dominio PAS (Wang et al. 1995).

*La activación del HIF depende de la acumulación de su subunidad alfa.*

Mientras que los niveles de la subunidad HIF-1 $\beta$  permanecen constantes independientemente de la oxigenación de la célula, la subunidad HIF-1 $\alpha$  es difícilmente detectable en condiciones normóxicas (Huang et al. 1996). Así, la activación del HIF depende fundamentalmente de la acumulación de su subunidad alfa, acontecida en células desoxigenadas. El HIF-1 $\alpha$  es rápidamente degradado a través del sistema ubiquitina-proteasoma en presencia de oxígeno (Salceda y Caro, 1997), para lo cual es necesaria la interacción del HIF-1 con la proteína supresora de tumores del síndrome de von Hippel-Lindau (pVHL) (Maxwell et al. 1999). Una mutación que genere una pVHL disfuncional puede causar una menor tasa de degradación del HIF1- $\alpha$ , conduciendo a una incrementada expresión del gen de la eritropoyetina, como puede observarse en individuos con policitemia chuvasiana, un desorden autosómico recesivo endémico de la región media del río Volga (Ang et al. 2002).

*La enzima HIF- $\alpha$  prolil-hidroxilasa funciona como el sensor celular de oxígeno.*

En el caso del HIF1- $\alpha$ , la presencia de un residuo de prolina en la posición 564 es de particular importancia para su degradación; este residuo es hidroxilado por una enzima llamada HIF- $\alpha$  prolil-hidroxilasa en células provistas de O<sub>2</sub> y hierro. Esta hidroxilación es lo que permite la interacción entre el HIF- $\alpha$  y la pVHL (Jaakkola et al. 2001), con la subsecuente adición de moléculas de ubiquitina que culmina con la proteólisis del HIF- $\alpha$  (Cockman et al. 2000).

En resumen, el HIF es inactivado en presencia de oxígeno y hierro. Cuando el ambiente se torna hipóxico se inhibe la degradación de la subunidad HIF- $\alpha$ , lo que



permite que ésta se acumule y forme el heterodímero HIF, que posteriormente puede inducir la transcripción del gen de la eritropoyetina. Las reacciones químicas que conducen a la degradación del HIF- $\alpha$  en células normalmente oxigenadas se representan en la figura 2.

Se ha sugerido que la enzima HIF- $\alpha$  proлил-hidroxilasa funciona como el sensor celular de oxígeno (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001) y desempeña un papel muy importante en el control de la producción de eritropoyetina al limitar la entrada de HIF- $\alpha$  al núcleo celular cuando la presión de O<sub>2</sub> es normal. Esta acción explica lógicamente que los agentes inhibidores de HIF-proлил-hidroxilasas induzcan la producción de eritropoyetina (Hsieh et al. 2007). De hecho, varias observaciones indican que la deficiencia de esta hidroxilasa, particularmente de la isoforma PHD2, es suficiente para inducir la expresión del gen de la eritropoyetina a tal grado que genera incrementos enormes en la producción de glóbulos rojos (Percy et al. 2006; Minamishima et al. 2008; Takeda et al. 2008).

*Los genes de las proлил-hidroxilasas PHD2 y PHD3 son regulados por factores inducidos por hipoxia.*

Curiosamente, el HIF parece promover su propia destrucción al estimular la formación de las proлил-hidroxilasas PHD2 y PHD3, planteándose así un mecanismo que limita la acumulación de HIF- $\alpha$  durante la hipoxia (Marxsen et al. 2004). Este hallazgo podría contribuir a explicar la disminución de la producción de eritropoyetina que ocurre durante la residencia prolongada en lugares elevados. Ante la atenuación de la acumulación de HIF- $\alpha$  que se presenta de manera paralela a la inducción de las PHDs por parte de la hipoxia, se ha propuesto que los PHDs tienen propiedades óptimas de detección de O<sub>2</sub> bajo diferentes condiciones fisiológicas de oxigenación, constituyendo un sistema de detección de oxígeno autorregulado (Stiehl et al. 2006).

*El HIF-2 es el principal factor de transcripción que induce la expresión del gen de eritropoyetina.*

Al menos tres isoformas de la subunidad alfa del HIF han sido identificadas, denominadas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (también llamada EPAS-1) (Tian et al. 1997) y HIF-3 $\alpha$  (Gu et al. 1998). El HIF-2, cuya regulación se lleva a cabo a través de la proteólisis oxígeno-dependiente de su subunidad HIF-2 $\alpha$  (de manera similar a lo descrito en el caso del HIF-1), también juega un papel importante en la respuesta a la hipoxia *in vivo* (Wiesener et al. 2003). De hecho, aunque un gran número de genes inducibles por hipoxia requieren HIF-1 $\alpha$  (Warnecke et al. 2004), el gen de la eritropoyetina parece ser sensible de manera crítica al HIF-2 $\alpha$  (Warnecke et al. 2004; Scortegagna et al. 2005; Gruber et al. 2007; Paliege et al. 2010). En el riñón adulto, el HIF2- $\alpha$  y el ARNm de la eritropoyetina se manifiestan juntos sólo en los fibroblastos intersticiales corticales (Paliege et al. 2010). En el hígado, la eritropoyetina también es regulada de modo preferencial por el HIF-2 (Rankin et al. 2007), factor que toma el control de los niveles séricos de la hormona durante la anemia renal (Kapitsinou et al. 2010).

Recientemente, se ha presentado una nueva línea celular renal (llamada REPC, del inglés “renal Epo-producing cells”) como herramienta para la investigación de los mecanismos de regulación celular y molecular de la producción de eritropoyetina en los riñones. En estas células se observa el incremento transitorio típico de la producción de eritropoyetina inducido por la hipoxia, y la expresión de la hormona es dependiente, en buena medida, de la activación del HIF-2 (Frede et al. 2011).

*El cobalto y los quelantes de hierro activan al HIF.*

El Fe<sup>2+</sup> es necesario para la actividad de la HIF-prolil-hidroxilasa (Ivan et al. 2001). Esto podría explicar al aumento en la producción de eritropoyetina que se presenta cuando hay deficiencia de hierro, como se ha observado en pacientes tratados con el agente quelante deferoxamina (Kling et al. 1996). Se cree que el

cobalto, por su parte, es capaz de desplazar al hierro del sitio activo, promoviendo la estabilización del HIF- $\alpha$  (Bunn, 2013). De esta manera, el cobalto y los quelantes de hierro mimetizan el efecto de la hipoxia al activar al HIF e inducir la producción de eritropoyetina.

*Los HIF regulan la síntesis de eritropoyetina y el metabolismo del hierro de manera coordinada.*

La disponibilidad de hierro en el organismo es fundamental para la formación de glóbulos rojos tanto en condiciones normales como en la hipoxia. Durante la estimulación de la eritropoyesis por parte de la hipoxia, la demanda de hierro en la médula ósea aumenta, por lo que es de suma importancia la participación de mecanismos fisiológicos que simultáneamente aumenten la disponibilidad de este mineral. Los HIF no sólo estimulan la síntesis de eritropoyetina, sino que también favorecen los procesos de absorción, transporte y reciclaje del hierro, como ha sido descrito por Haase (2010). Para promover la estimulación de la eritropoyesis es recomendable el suplemento con hierro en perros y gatos con insuficiencia renal crónica que reciben tratamiento con eritropoyetina, como se señala en la sección XI.

Considerando lo anterior, no sorprende que la producción de varias proteínas involucradas en el metabolismo del hierro sea regulada por el oxígeno, y en especial por los HIF. Por ejemplo, se ha observado que la expresión del citocromo duodenal b (DcytB) y la proteína DMT1 (del inglés “divalent metal transporter-1”), compuestos que median la absorción intestinal de hierro, es activada de manera crítica por el HIF-2 (Shah et al. 2009). Además, existe evidencia de que el HIF-1 regula la expresión del gen de la transferrina (Rolfs et al. 1997) y del gen del receptor de la transferrina (Lok y Ponka, 1999).

La disponibilidad de hierro en el organismo depende en gran medida de su absorción intestinal y de su movilización a partir de las reservas internas. La ferroportina es un transportador presente en la superficie de varios tipos celulares,

cuyo grado de expresión determina cuánto hierro puede ser tomado de la dieta, o liberado a partir de la reserva hepática y reticuloendotelial. La expresión de ferroportina es inhibida por la hepcidina, una hormona peptídica pequeña producida en el hígado (Haase, 2010). Mediante la evaluación de los niveles de ARNm de la hepcidina en modelos experimentales de anemia y el estudio de los efectos de la hipoxia *in vivo* e *in vitro*, tanto la anemia como la hipoxia han sido asociadas con una marcada disminución de la expresión de este péptido (Nicolas et al. 2002). Estos resultados podrían contribuir a explicar el incremento en la absorción de hierro y en la liberación de éste a partir de las células reticuloendoteliales que frecuentemente se presentan en animales con anemia o hipoxia. Por el contrario, en la llamada anemia de la inflamación, la producción de hepcidina se incrementa hasta 100 veces, y esto podría contribuir al secuestro de hierro en los macrófagos que constituye una característica de esta condición patológica (Ganz, 2003).

## **VI. OTROS FACTORES REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA**

### **Angiotensina II**

La angiotensina II, además de poseer gran importancia en el control de la presión arterial, participa en la regulación de la eritropoyesis. No sólo se ha reportado como un factor de crecimiento para progenitores eritroides, sino que también estimula la secreción de eritropoyetina (Vlahakos et al. 2010). El mecanismo mediante el cual produce esta acción está por esclarecerse. Se ha planteado la posibilidad de que el tratamiento con enalapril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, disminuya los niveles de hemoglobina mediante la supresión de la producción de eritropoyetina (Kamper y Nielsen, 1990). En humanos, el tratamiento con eritropoyetina eleva la concentración de hemoglobina mediante dos mecanismos: 1) aumentando el volumen de los glóbulos rojos y 2) disminuyendo el volumen plasmático. Esto último podría ser mediado por una regulación a la baja del eje renina-angiotensina-aldosterona (Lundby et al. 2007).

### **Tejidos fuera del riñón**

*El sistema nervioso y la piel han sido considerados reguladores de la producción renal de eritropoyetina, aunque su participación en este sentido es controversial.*

La participación de algunos tejidos no renales como posibles reguladores de la síntesis de eritropoyetina en los riñones durante la hipoxia ha generado un debate extenso. En esta discusión, muchos investigadores han considerado que tales tejidos no juegan en realidad un papel muy importante, mientras que otros

defienden la idea de que la producción renal de eritropoyetina en condiciones hipóxicas está bajo el notable control de otros órganos. Como se describe a continuación, las investigaciones sobre el tema se han enfocado en la participación del sistema nervioso central y la piel.

En ratas, la estimulación de receptores sensibles al oxígeno localizados en el tallo cerebral se ha asociado con la liberación de factores humorales que desencadenan la producción renal de eritropoyetina (Von Wussow et al. 2005). En ratones en los que la respuesta ante la hipoxia había sido eliminada de manera específica en los astrocitos mediante supresiones genéticas, no se provocó anemia, pero se redujo sustancialmente el número de células progenitoras eritroides y de reticulocitos como respuesta al estrés hipóxico, lo que sugiere que las células gliales del SNC regulan la respuesta eritropoyética ante la hipoxia (Weidemann et al. 2009). Si los astrocitos son capaces de controlar la producción renal de eritropoyetina, es necesario realizar más investigación que permita comprender tal proceso.

Por su parte, la inervación renal no parece ser importante en el control de la expresión de eritropoyetina dependiente de  $O_2$ , pues la denervación unilateral en ratas no afectó significativamente la concentración sérica de la hormona ni los niveles del ARNm de eritropoyetina en los riñones frente a diferentes estímulos, como la hipoxia y el desangramiento (Eckardt et al. 1992).

En cuanto a la participación de la piel, Boutin et al. (2008) reportaron que la supresión del HIF-1 $\alpha$  en la epidermis inhibe la producción renal de eritropoyetina en respuesta a la hipoxia. Estos autores sugirieron que la liberación de óxido nítrico, inducida por el HIF, genera cambios vasculares cutáneos que resultan en un incremento de la producción de la hormona. Sin embargo, la idea de que un aumento en el flujo sanguíneo en la piel provoque disminución en el aporte de oxígeno a los riñones y estimule la síntesis de eritropoyetina es refutada por el hallazgo de que la disminución del flujo sanguíneo renal no es un estímulo importante para la producción de eritropoyetina (Pagel et al. 1989), así como por la falta de evidencia que asigne a la temperatura corporal (la cual afecta

significativamente el flujo a la piel) un papel relevante en el control de la producción de la hormona (Jelkmann, 2011). Haciendo una revisión crítica sobre el tema, Paus et al. (2009) han sugerido que la piel contribuye directamente a la regulación de los niveles plasmáticos de eritropoyetina en respuesta a la hipoxia.

En la revisión sobre la regulación de la producción de eritropoyetina publicada por Jelkmann (2011), la información disponible hasta ese momento, la cual asignaba a los tejidos fuera del riñón un papel contundente en el control de la producción renal de eritropoyetina, fue considerada poco convincente.

#### *Varias sustancias regulan la producción de eritropoyetina.*

Se han identificado varias sustancias involucradas en la estimulación de la producción de eritropoyetina. El ácido retinoico, por ejemplo, ha mostrado aumentar la producción de eritropoyetina *in vitro*, de manera independiente de la presión de O<sub>2</sub> (Okano et al. 1994; Kambe et al. 2000). Además, *in vivo*, la administración de ácido retinoico por vía oral indujo un aumento de la concentración sérica de eritropoyetina en ratas privadas de vitamina A (Okano et al. 1994).

Las hormonas tiroideas también aumentaron la producción de eritropoyetina inducida por la hipoxia en riñones aislados de rata y en una línea celular de hepatoma humano, de manera dependiente de la dosis. En este estudio, las mediciones del consumo de oxígeno indicaron que el aumento del ARNm de eritropoyetina, inducido por la administración de hormonas tiroideas, se debía a un mecanismo distinto de la intensificación de la hipoxia. Por lo tanto, las hormonas tiroideas parecen estimular la eritropoyesis mediante un incremento no calorigénico de la producción de eritropoyetina (Fandrey et al. 1994).

Existe evidencia de que las prostaglandinas (particularmente la PGE<sub>2</sub>) median la producción de eritropoyetina en el riñón (Fisher, 1980). Asimismo, estudiando los efectos de la administración de adenosina y de sus agonistas sobre la producción

de eritropoyetina en ratones mediante la medición de la incorporación de hierro en los glóbulos rojos, se encontró que la adenosina puede incrementar la producción de eritropoyetina al actuar sobre receptores A<sub>2</sub>, pero también puede inhibirla al estimular receptores A<sub>1</sub> (Ueno et al. 1988). Se ha postulado que la adenosina, cuya concentración extracelular puede aumentar como resultado de la hipoxia, es un regulador importante de la producción de eritropoyetina, actuando principalmente mediante quinasas A y C y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Fisher, 2003).

Los esteroides sexuales también han sido involucrados en la regulación de la producción de esta glucoproteína. Se ha reportado que la producción de eritropoyetina en animales de experimentación es inhibida por los estrógenos (Peschle et al. 1973) y aumentada por la testosterona (Fisher et al. 1967). Sin embargo, en ratones, ni la orquiectomía ni el tratamiento con finasterida (un fármaco antiandrogénico) generaron cambios significativos en la concentración plasmática de eritropoyetina (Barceló et al. 1999), por lo que quizás la producción constitutiva de la glucoproteína no es influenciada por la testosterona. Además, la concentración sérica de eritropoyetina ha mostrado ser independiente del sexo tanto en caballos árabes (Fontequé et al. 2012) como en humanos (Jelkmann y Wiedemann, 1989). Entonces, más que activar la producción de eritropoyetina, se ha sugerido la posibilidad de que ciertos tipos de esteroides estimulen directamente la eritropoyesis (Mizoguchi y Levere, 1971). Sin embargo, el tratamiento con andrógenos en animales anémicos está limitado por la relativamente baja capacidad que han mostrado en estos casos para estimular la producción de glóbulos rojos, así como por la gran cantidad de efectos colaterales que provocan. El estanozolol, por ejemplo, ha mostrado ser hepatotóxico en gatos (Harkin et al. 2000).



*Los progenitores eritroides podrían secretar factores que inhiben la producción renal de eritropoyetina.*

Frente al hecho de que la concentración sérica de eritropoyetina se encuentra desproporcionadamente aumentada para el grado de anemia en pacientes con hipoplasia eritrocítica, se ha pensado que los progenitores eritrocíticos proliferantes disminuyen la concentración sanguínea de la hormona mediante retroalimentación negativa, independientemente de la oferta de O<sub>2</sub> (Jelkmann y Wiedemann, 1990). En ratones, una baja tasa de eritropoyesis, inducida mediante la hiperoxia, fue asociada con una acentuada producción de eritropoyetina frente al estímulo hipóxico (Bozzini et al. 2003). Asimismo, los niveles plasmáticos de eritropoyetina durante la exposición continua a la hipoxia fueron mayores en ratones a los que experimentalmente se indujo aplasia de médula que en los ratones control (Barceló y Bozzini, 1982). En el caso opuesto, ratones en los que se provocó una mayor tasa eritropoyética mediante la administración de rhEPO mostraron una menor concentración plasmática de eritropoyetina después de la exposición a la hipoxia en comparación con ratones normales (Lezón et al. 1995). Aquí, tras la medición de la vida media de la hormona, se apoyó la idea de que los cambios en la concentración de eritropoyetina circulante durante periodos de eritropoyesis aumentada se deben a una menor tasa de producción de la misma, y no tanto a un aumento en la tasa de utilización por parte de sus células blanco (Lezón et al. 1995).

## VII. LA ERITROPOYETINA EN EL PLASMA

El progreso inicialmente lento de las investigaciones sobre la fisiología de la eritropoyetina probablemente se debió a que la hormona se encuentra presente en los fluidos y tejidos corporales en concentraciones muy bajas, lo que pudo haber dificultado su detección (Jelkmann, 2007b). Se ha reportado una concentración plasmática normal de eritropoyetina de únicamente 0-9 mU/mL en caballos (Jaussaud et al. 1994). Por su parte, Cook y Lothrop (1994), han señalado una concentración sérica normal de la hormona de 7-37 mU/mL (promedio 20 mU/mL) en perros y 9-38 mU/mL (promedio 18 mU/mL) en gatos.

Aunque una producción excesiva o deficiente de eritropoyetina puede, en teoría, ser la causa de trastornos hematológicos graves (eritrocitosis o anemia, respectivamente; ver sección X), la concentración de la hormona en animales con policitemia (Cook y Lothrop, 1994; Hasler y Giger, 1996) o anemia por insuficiencia renal (Cook y Lothrop, 1994; Pechereau et al. 1997) ha mostrado valores que, en realidad, no difieren mucho y, de hecho, se superponen con el rango normal. En cambio, los animales con anemias de origen no renal presentan niveles significativamente elevados de eritropoyetina circulante (Cook y Lothrop, 1994; Pechereau et al. 1997).

Es importante tener presente que la concentración de eritropoyetina en el plasma depende de dos factores: por un lado, de la tasa de producción de la hormona, que como ya se ha dicho aumenta durante las primeras horas en las que los animales son sometidos a anemia o hipoxia; por el otro, de su tasa de eliminación. Actualmente hace falta comprender más a fondo hasta qué punto la concentración plasmática de la eritropoyetina es afectada por un factor o el otro en diferentes circunstancias. Es poco lo que se sabe sobre los mecanismos mediante los cuales

la hormona es metabolizada en el organismo, por lo que se requiere de mayor investigación al respecto.

## **Dinámica de producción**

*La exposición a la hipoxia genera un aumento rápido pero transitorio en la producción de eritropoyetina.*

Es posible identificar un aumento de los niveles plasmáticos de eritropoyetina cuando apenas ha transcurrido poco más de una hora de exposición a la hipoxia (Schuster et al. 1987). La máxima concentración plasmática de la hormona ha sido registrada entre las 12 y 18 horas de exposición a la hipoxia en ratones, y entre 19 y 39 horas en el caso de humanos (Abbrecht y Littell, 1972). Sin embargo, en muy pocos días, y a pesar de la persistencia del estímulo hipóxico, los niveles de eritropoyetina regresan a su valor bajo (Abbrecht y Littell, 1972; Seferynska et al. 1989; McKeever et al. 210). Se ha reportado que el mayor incremento en el hematocrito se presenta sólo después de que la concentración sérica de eritropoyetina ha comenzado a declinar (Seferynska et al. 1989). Resulta interesante que este descenso de los niveles de la hormona no está asociado con una disminución de la eritropoyesis (Fried et al. 1970) ni del hematocrito o de la concentración de hemoglobina (Abbrecht y Littell, 1972), de modo que la baja concentración plasmática de eritropoyetina que tiene lugar durante la hipoxia prolongada es suficiente para mantener una tasa aumentada de eritropoyesis.

Se ha demostrado que el mencionado fenómeno de ascenso y caída de los niveles plasmáticos de la hormona refleja cambios similares en su producción renal (Jelkmann, 1982). Por lo tanto, es la disminución de la producción de eritropoyetina, y no el aumento de su tasa de degradación, lo que explica mejor la reducción de la concentración plasmática de la hormona que sobreviene después de 1-3 días de exposición continua a la hipoxia. Esta disminución no se debe a un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la eritropoyetina como tal,

puesto que la administración de la hormona en ratas no inhibió la formación endógena de eritropoyetina durante un período hipóxico (Fried et al. 1984; Eckardt et al. 1990b). En vez de ello, un descenso de la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (debido al aumento de la concentración de 2,3-DPG) (Miller et al. 1973), o el hecho de que los HIF inducen su propia degradación (Marxsen et al. 2004), podrían contribuir a explicar la producción atenuada de eritropoyetina durante la estancia prolongada de los animales a grandes altitudes.

Asimismo, como consecuencia del sangrado agudo, se observa primero un aumento de la producción de eritropoyetina y, después de varias horas, el nivel de la hormona regresa a su valor normal (Miller et al. 1976). Pero, desde luego, en la anemia o hipoxemia crónicas, los niveles alcanzados de eritropoyetina pueden ser sustancialmente mayores que en el estado normóxico.

## **Metabolismo**

*El hígado y los riñones han sido involucrados en el metabolismo y la eliminación de la eritropoyetina.*

Se ha identificado al hígado como uno de los principales participantes en el metabolismo de la eritropoyetina. Los residuos de ácido siálico de la molécula de la eritropoyetina son necesarios para la estabilidad de la hormona en la circulación, pues la eliminación de dichos residuos provoca que la hormona sea rápidamente removida del plasma. Esto ocurre mediante la participación de receptores para galactosa ubicados en los hepatocitos (Fukuda et al. 1989; Spivak y Hogans, 1989).

El riñón ha sido identificado como participante en la eliminación de la hormona, pero de manera inconstante. En un estudio realizado en ovinos se observó que la vida media de la eritropoyetina homóloga era de aproximadamente 9 horas. Esta duración, aparentemente independiente de la función renal, se reducía como

resultado de la administración repetitiva de eritropoyetina; el volumen de distribución de la hormona correspondía con el volumen plasmático de los animales (Mladenovic et al. 1985). No obstante, otras investigaciones han reportado que los animales y humanos urémicos o con inadecuada función renal eliminan más lentamente la eritropoyetina exógena que los individuos normales (Fu et al. 1988; Jensen et al. 1994).

*La eritropoyetina es internalizada y degradada por sus células blanco.*

La concentración plasmática de eritropoyetina se ha encontrado desproporcionadamente aumentada para el grado de anemia en pacientes con hipoplasia eritroide. Para algunos investigadores, quienes han pensado en la posibilidad de que los progenitores eritroides regulen la síntesis de la hormona mediante retroalimentación negativa, este fenómeno podría ser resultado de una mayor tasa de producción de la eritropoyetina (ver sección VI). Para otros, quienes han propuesto que la utilización de eritropoyetina por sus células blanco influye de manera importante en los niveles plasmáticos de la hormona, el fenómeno podría deberse a una menor tasa de degradación de la eritropoyetina. Entonces, además del metabolismo hepático y la eliminación renal, el catabolismo de la eritropoyetina por parte del tejido eritropoyético podría afectar considerablemente los niveles plasmáticos de la hormona.

Bajo la hipótesis de que uno de los mecanismos principales de degradación de la eritropoyetina consiste en la endocitosis y posterior degradación lisosomal de la hormona por parte de sus células blanco, Gross y Lodish (2006) llevaron a cabo experimentación *in vitro* y reportaron que, en efecto, la eritropoyetina era degradada sólo por células que expresaban el EpoR. Además, encontraron que la eritropoyetina que se unía a la superficie celular era internalizada, tras lo cual el 60% se secretaba de nuevo y el 40% era degradada. Por otro lado, El-Komy et al. (2011), en un modelo experimental *in vivo*, hicieron un análisis farmacocinético comparativo entre la eritropoyetina recombinante humana y el activador continuo

del receptor de la eritropoyetina (CERA, del inglés “continuous erythropoietin receptor activator”), señalando que la eliminación relativamente lenta del CERA se debía a que, en comparación con la eritropoyetina, este fármaco induce una menor regulación positiva del EpoR, se une más lentamente a tal receptor y presenta una menor tasa de internalización y/o degradación. Por lo tanto, la unión de la eritropoyetina con su receptor, con la posterior internalización y degradación de la molécula, parece ser un mecanismo importante de metabolismo de la hormona.

## VIII. EFECTO ERITROPOYÉTICO

Como se ha descrito, la hipoxia tisular, provocada por la disminución de la disponibilidad del gas en la sangre, induce la expresión del gen de la eritropoyetina. Una vez liberada hacia la circulación, la hormona puede estimular a sus células blanco (progenitores eritroides en la médula ósea), lo que resulta en un aumento de la concentración de glóbulos rojos. Este efecto conduce al incremento de la capacidad de transporte de O<sub>2</sub> de la sangre y al aumento del aporte del gas a los tejidos, con lo que la hipoxia tisular puede corregirse. El papel del efecto eritropoyético en la respuesta a la hipoxia tisular se representa en la figura 3.

### **Células blanco: progenitores eritroides**

*Los progenitores eritroides BFU-E y CFU-E son las principales células blanco de la eritropoyetina en la médula ósea.*

La eritropoyetina se une a receptores ubicados en la membrana de los progenitores eritroides en la médula ósea. Desde hace mucho tiempo se identificaron células progenitoras de este tipo en cultivos de médula ósea de ratón (Iscoe y Sieber, 1975). El progenitor eritroide más primitivo es el llamado BFU-E, (del inglés “burst-forming unit erythroid”), del cual se reconocen por lo menos dos subtipos en el ratón, conocidos como BFU-E de día 8 y BFU-E de día 3, que difieren entre sí, además de otras características físicas y biológicas, en el tamaño y la cinética de la maduración de las colonias a las que dan origen *in vitro* (Gregory y Eaves, 1978). Se ha reportado que la capacidad proliferativa disminuye y la sensibilidad a la eritropoyetina aumenta conforme los progenitores primitivos

pasan de un estadio cercano al de células madre pluripotenciales a otro ubicado justo antes del inicio de la síntesis detectable de hemoglobina (Gregory, 1976).

Los progenitores eritroides tardíos, llamados CFU-E (del inglés “colony-forming unit erythroid”), carecen de potencial de auto-replicación, de donde surgió la hipótesis de que la expansión del compartimiento de progenitores tardíos, durante la regeneración eritroide rápida, se debe a un aumento de la afluencia de BFU-Es, más que a la amplificación de los CFU-Es (Umemura et al. 1989).

Los BFU-Es primitivos poseen un número mucho menor de receptores para eritropoyetina que los CFU-Es (Sawada et al. 1990), y la densidad de receptores aumenta a medida que las células maduran. Se ha sugerido que la eritropoyetina no es necesaria para el compromiso del linaje eritroide ni para la proliferación o diferenciación de BFU-Es en CFU-Es (Wu et al. 1995). En cambio, los CFU-Es, que han sido considerados la principal célula blanco de la eritropoyetina, son altamente sensibles a la hormona, y de ésta depende su supervivencia, proliferación y diferenciación terminal, con el resultante desarrollo de glóbulos rojos maduros circulantes.

Adicionalmente, se ha observado que la eritropoyetina estimula la proliferación de proeritroblastos *in vitro* (Udupa et al. 1986). Además, los efectos de la hormona no están absolutamente restringidos a la vía eritropoyética. Por ejemplo, se ha encontrado que la administración de eritropoyetina recombinante tiene un efecto estimulador sobre la producción de plaquetas en roedores (McDonald et al. 1987; Berridge et al. 1988).

## **Mecanismo de acción y receptor**

*La eritropoyetina actúa inhibiendo la apoptosis de los progenitores eritroides.*

El mecanismo mediante el cual la eritropoyetina estimula la eritropoyesis fue propuesto por Koury y Bondurant (1990), quienes demostraron que la hormona



actúa previniendo la apoptosis de los progenitores eritroides. En estas células, la unión de la eritropoyetina con su receptor resulta en un aumento de la expresión de GATA-1 (Chiba et al. 1991). Este factor de transcripción parece cumplir funciones importantes durante la inhibición de la apoptosis, ya que 1) es expresado por los CFU-Es (Suzuki et al. 2003), 2) participa en varios eventos de la diferenciación de las células eritroides, incluyendo la transactivación del gen del receptor de la eritropoyetina y, más tarde en el proceso de maduración, de genes relacionados con la síntesis de hemoglobina (Chiba et al. 1991), 3) promueve la supervivencia de las células eritroides al inducir la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-xL (Gregory et al. 1999) y 4) es degradado mediante la acción de caspasas cuando se activan receptores de muerte celular en los progenitores eritroides, lo que podría representar un importante mecanismo de control negativo de la eritropoyesis (De Maria et al. 1999).

*El receptor de la eritropoyetina es un dímero cuya activación induce diferentes vías de señalización.*

El receptor de la eritropoyetina (EpoR) pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas (D'Andrea y Zon, 1990). Está presente en la superficie de los progenitores eritroides normales purificados en un número relativamente bajo, de aproximadamente 200, cantidad que en algunas líneas celulares puede ascender a aproximadamente 1 000 receptores por célula (D'Andrea y Zon, 1990).

Estructuralmente el EpoR conforma un dímero cuyos dominios intracelulares, en ausencia de ligando, se mantienen separados, situación que evita la activación de JAK2 (Livnah et al. 1999). Tras la unión con la eritropoyetina se genera un cambio conformacional en el receptor (Remy et al. 1999), lo que provoca que la quinasa JAK2, asociada con el mismo en la región citoplasmática, sea activada (Witthuhn et al. 1993). Esto induce la iniciación de la cascada de transducción de la señal (figura 4).

Varias vías de señalización relacionadas con la activación del receptor de la eritropoyetina han sido identificadas, incluyendo la participación de Jak2 (Yoshimura y Arai, 1996; Klingmüller, 1997; Klingmüller et al. 1997; Yoshimura y Misawa, 1998; Wojchowski et al. 1999; Mulcahy, 2001), STAT5 (Yoshimura y Arai, 1996; Klingmüller et al. 1997; Yoshimura y Misawa, 1998; Wojchowski et al. 1999; Mulcahy, 2001) y PI3 quinasa (Yoshimura y Arai, 1996; Klingmüller et al. 1997; Wojchowski et al. 1999). Como mecanismo que interrumpe la señalización, se ha mostrado que la HCP (del inglés “Hematopoietic cell phosphatase”) se une al receptor de la eritropoyetina e inactiva a JAK2 (Klingmüller et al. 1995). Posteriormente, el complejo hormona-receptor es internalizado. Finalmente, los proteasomas celulares, estructuras encargadas de degradar las proteínas, regulan la duración de la señalización al inhibir el remplazo de los receptores que fueron internalizados (Verdier et al. 2000).

*Los análogos hiperglicosilados de la eritropoyetina tienen una menor afinidad por el EpoR.*

Tras el hallazgo de que la afinidad de la eritropoyetina por su receptor está inversamente relacionada con el contenido de ácido siálico en la molécula de eritropoyetina, Darling et al. (2002) demostraron que la glicosilación de la hormona afecta la interacción con su receptor mediante interacciones electrostáticas. En efecto, observaciones *in vitro* han mostrado que la eritropoyetina se une a su receptor con mayor rapidez que un análogo hiperglicosilado. Tomando en cuenta que la afinidad del análogo hiperglicosilado por el EpoR es menor, y en reconocimiento de que la hormona es catabolizada después de unirse a su célula blanco y ser endocitada, sería posible explicar al nivel celular el hecho de que la eritropoyetina sea degradada más rápido que el análogo hiperglicosilado (Gross y Lodish, 2006).

*La estimulación de la eritropoyesis en respuesta a la hipoxia constituye un mecanismo evolutivamente conservado entre los vertebrados.*

En 1989 se clonó el receptor de eritropoyetina murino, identificándose como un polipéptido de 507 aminoácidos con un solo dominio que abarca la membrana celular (D'Andrea et al. 1989). Más tarde, en la clonación del receptor de la eritropoyetina del cerdo, se infirió una identidad del 84.6% con el receptor humano, del 80.7% con el receptor de ratón, y del 78.9% con el de la rata (Pearson et al. 2000). Contrastando con lo anterior, el receptor de eritropoyetina de anfibio ha mostrado sólo un 33% de identidad con el receptor de mamíferos (Yergeau et al. 2006).

A pesar de que se ha observado una baja homología entre la eritropoyetina de mamíferos y la de peces teleósteos (Chou et al. 2004; Chu et al. 2007), y de las marcadas diferencias en los sitios de expresión de ARNm de la hormona entre distintos tipos de vertebrados (Nogawa-Kosaka et al. 2010; Katakura et al. 2013), la evaluación de la expresión de la eritropoyetina y del receptor de eritropoyetina mediante RT-PCR e hibridación *in situ* ha revelado paralelismos notables entre los patrones de expresión de los genes del pez cebra y los mamíferos (Paffett-Lugassy et al. 2007). En este mismo estudio, la derogación del STAT5 bloqueó la expansión eritropoyética, en concordancia con el requerimiento de STAT5 en la señalización de la eritropoyetina. Asimismo, reportando la caracterización molecular y funcional de la eritropoyetina en el pez dorado, se ha sugerido que el mecanismo de desarrollo temprano de los eritrocitos se encuentra altamente conservado entre diferentes tipos de vertebrados (Katakura et al. 2013). La anemia y la hipoxia han mostrado estimular la eritropoyesis en aves (Rosse y Waldmann, 1966), así como la expresión de eritropoyetina en el pez cebra (Paffett-Lugassy et al. 2007). Por lo tanto, la función de la eritropoyetina en la producción de glóbulos rojos durante la homeostasis normóxica e hipóxica parece formar parte de un mecanismo evolutivamente conservado, similar en diferentes vertebrados.

## **IX. EFECTOS NO ERITROPOYÉTICOS**

Numerosas observaciones han dejado claro que la eritropoyetina dista mucho de ser una hormona con efectos exclusivamente hematopoyéticos. Particularmente interesante, no sólo desde una óptica fisiológica sino también desde el punto de vista clínico, ha sido el descubrimiento de sus acciones sobre el sistema nervioso central, el corazón y los vasos sanguíneos, que han establecido una participación importante de la hormona en la protección tisular contra diferentes tipos de daño, como el causado por la isquemia.

### **Efectos en el sistema nervioso**

La eritropoyetina ejerce efectos positivos sobre la función cerebral mediante dos mecanismos generales: 1) aumentar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre y, por lo tanto, favorecer el aporte de oxígeno al tejido nervioso y 2) actuar directamente en el cerebro como un agente neuroprotector y neurotrófico (Jelkmann, 2005).

*La eritropoyetina y su receptor son expresados ampliamente en el cerebro.*

El ARNm de eritropoyetina y el de su receptor han sido encontrados en el cerebro de primates (Marti et al. 1996) y ratones (Digicaylioglu et al. 1995; Marti et al. 1996). La producción de eritropoyetina en respuesta a la hipoxia se ha reconocido como una función de los astrocitos (Masuda et al. 1994; Marti et al. 1996; Bernaudin et al. 2000) y de las neuronas (Bernaudin et al. 2000). Por su parte, el Epo-R es expresado por neuronas de embrión de rata (Morishita et al. 1997), por

algunas células gliales (incluyendo astrocitos) (Bernaudin et al. 1999; Sugawa et al. 2002) y por células endoteliales de capilares cerebrales de roedores *in vitro* (Yamaji et al. 1996). Se han identificado diferentes sitios de unión para la eritropoyetina, particularmente en el hipocampo y la corteza cerebral (Digicaylioglu et al. 1995; Morishita et al. 1997). Además, la eritropoyetina y su receptor son expresados en el cerebelo, la glándula hipófisis y la médula espinal, como ha sido revisado por Jelkmann (2005). Acompañando a estos hallazgos, se desarrolló la idea de que la eritropoyetina actúa de manera paracrina en el cerebro, haciendo las veces de un agente neuroprotector; incluso se ha postulado la existencia de una acción autocrina, particularmente en el caso de los astrocitos (Sugawa et al. 2002).

*La eritropoyetina ejerce efectos neuroprotectores y neurotróficos.*

A partir de los últimos años del siglo pasado, el descubrimiento de algunos efectos de la eritropoyetina sobre el sistema nervioso ha captado la atención de numerosos investigadores. Por ejemplo, existe evidencia de que la eritropoyetina protege al cerebro contra el daño causado por la isquemia (Sakanaka et al. 1998; Bernaudin et al. 1999; Brines et al. 2000). En ratones, la administración intracerebroventricular de eritropoyetina recombinante, antes de la inducción de isquemia, logró reducir considerablemente la extensión del infarto provocado (Bernaudin et al. 1999). La eritropoyetina ha mostrado proteger a las neuronas contra la toxicidad del glutamato *in vitro* (Morishita et al. 1997) e inhibir la apoptosis inducida por hipoxia en neuronas de la retina en un modelo experimental de ratón (Chen et al. 2008). Además, la eliminación del receptor de la eritropoyetina en el cerebro conduce a una inadecuada migración neuronal durante el proceso de regeneración posterior a una lesión (Tsai et al. 2006). Considerando esta función neuroprotectora, resultó muy interesante el hallazgo de que en pacientes con diabetes tipo 1 se observara un aumento de la concentración plasmática de eritropoyetina durante un periodo de hipoglucemia, lo

que podría hacer pensar en un papel neuroprotector de la hormona durante este periodo (Kristensen et al. 2009).

Aunque no es tema de este trabajo, en humanos se ha discutido el uso de eritropoyetina en el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo (Ehrenreich et al. 2002; Ehrenreich et al. 2009) y la esquizofrenia (Ehrenreich et al. 2004). Además, al estudiar los efectos de la eritropoyetina sobre el comportamiento de ratas, se ha encontrado que ejerce una marcada acción antidepresiva, y que regula la expresión de varios genes implicados en la función neurotrófica, como es el caso del factor neurotrófico derivado del cerebro (Girgenti et al. 2009). En medicina humana, éste y otros hallazgos han alentado el optimismo relacionado con el potencial terapéutico de la eritropoyetina recombinante en el campo de la psiquiatría.

Los hallazgos señalados han derivado en el cuestionamiento sobre los mecanismos mediante los que la eritropoyetina ejerce su efecto neuroprotector. En este sentido, se sabe que la inhibición de la apoptosis es un mecanismo importante, al igual que en el efecto eritropoyético. Se ha encontrado que la eritropoyetina previene la apoptosis neuronal mediante las vías de Jak2 y NF-kappaB (Digicaylioglu y Lipton, 2001). Además, parece estar involucrada en la protección tisular a través de efectos antiinflamatorios. En un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune en ratas, tras la administración de eritropoyetina (500-5000 U/kg i.p.) se identificaron efectos antiinflamatorios (particularmente inhibición de los niveles de IL-6) sobre el sistema nervioso central (Agnello et al. 2002).

Desde el punto de vista clínico, es importante responder a la pregunta sobre la capacidad de la eritropoyetina para penetrar hacia el tejido cerebral después de ser administrada por vía intravenosa. Al respecto, cabe señalar que los efectos neuroprotectores de la eritropoyetina han sido reportados incluso después de la administración sistémica de la misma (Brines et al. 2000; Agnello et al. 2002), desafiando la hipótesis de que la hormona es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, recientemente se ha subrayado la importancia de

la producción cerebral (local) de eritropoyetina y de la estimulación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales en la función neuroprotectora, ya que parece ser muy reducida la cantidad de eritropoyetina que logra atravesar la barrera hematoencefálica después de ser administrada a dosis altas por vía intravenosa (Noguchi et al. 2007).

## **Efectos en el sistema cardiovascular**

*La eritropoyetina ejerce efectos cardioprotectores.*

Existen observaciones que plantean un atractivo potencial terapéutico de la eritropoyetina en el tratamiento de la isquemia e infarto del miocardio. *In vitro*, la eritropoyetina mostró prevenir la apoptosis de los miocitos cardiacos de rata adulta sometidos a 28 horas de hipoxia. *In vivo*, en un modelo experimental de isquemia-reperfusión en rata, se observó que la administración de rhEPO (5000 U/kg i.p., diariamente, durante una semana) redujo la pérdida de miocitos cardiacos en aproximadamente un 50%, un grado suficiente para normalizar la función hemodinámica una semana después de la perfusión (Calvillo et al. 2003). Otros estudios *in vivo* sugieren que el tratamiento con eritropoyetina, ya sea antes o durante la isquemia, mejora considerablemente la función y recuperación del corazón después de la isquemia-reperfusión, incluyendo efectos favorables sobre la contractilidad ventricular (Parsa et al. 2004). También se ha demostrado que la eritropoyetina activa vías de supervivencia celular en fibroblastos cardiacos de conejo adulto *in vitro* (Parsa et al. 2004). En ratas, la administración subcutánea de eritropoyetina después de la inducción de infarto del miocardio mejoró la función ventricular, atenuó el desarrollo de fibrosis intersticial y aminoró la remodelación en el miocardio no infartado, situaciones que se encontraron acompañadas de un incremento en la angiogénesis y una disminución en la apoptosis del miocardio (Nishiya et al. 2006).

*La eritropoyetina estimula a las células endoteliales y ejerce efectos angiogénicos.*

Los efectos benéficos de la eritropoyetina que se han observado en modelos experimentales de isquemia y otros tipos de daño tisular podrían deberse, al menos en parte, a las acciones de la hormona sobre el endotelio vascular. Se ha observado que la eritropoyetina tiene actividad mitogénica sobre células endoteliales y aumenta además su migración (Anagnostou et al. 1990). También incrementa la neovascularización inducida por la inflamación o la isquemia, al parecer estimulando la movilización de precursores de células endoteliales desde la médula ósea (Heeschen et al. 2003). Se ha sugerido que los niveles séricos de eritropoyetina podrían contribuir a identificar pacientes con una deficiente capacidad para reclutar precursores de células endoteliales (Heeschen et al. 2003). Además, la administración subcutánea experimental del análogo darbepoetin alfa aumentó la supervivencia de células endoteliales en ratas (Bahlmann et al. 2004). Las dosis bajas de rhEPO administradas por vía subcutánea han mostrado tener efectos vasoprotectores, incluyendo el mejoramiento de la disfunción endotelial y la inhibición de la inflamación vascular en ratas hipertensas con insuficiencia renal (Toba et al. 2011).

Hoy se reconoce que la eritropoyetina ejerce efectos angiogénicos. En un modelo animal de retinopatía, la administración de eritropoyetina exógena durante la fase inicial mostró efectos benéficos al estimular el reclutamiento de progenitores proangiogénicos y activar vías de supervivencia celular en neuronas y vasos sanguíneos de la retina. Sin embargo, durante la fase tardía, el tratamiento con eritropoyetina exacerbó la neovascularización patológica (Chen et al. 2008). Esto hace evidente la importancia de comprender el papel de la eritropoyetina en la angiogénesis, para determinar el momento adecuado de intervención en pacientes con trastornos caracterizados por una angiogénesis patológica. En la amplia revisión de Ribatti (2012) se expone la relación de la eritropoyetina con la angiogénesis en el corazón, el aparato reproductor femenino, el sistema nervioso y las células tumorales.



*El tratamiento prolongado con eritropoyetina puede provocar hipertensión arterial.*

A veces es posible observar un aumento de la presión arterial en animales y humanos con falla renal a los que se administra eritropoyetina (Raine, 1988; Vaziri et al. 1996; Cowgill et al. 1998). La posibilidad de que la hormona ejerciera directamente un efecto hipertensor agudo fue descartada porque la administración de rhEPO generalmente no provoca un aumento de la presión sanguínea de manera inmediata. Así, la hipertensión arterial inducida por la administración de eritropoyetina fue atribuida al aumento del hematocrito generado por la hormona, lo que resultaría en un incremento de la viscosidad de la sangre y conduciría a una mayor resistencia del flujo vascular. Sin embargo, se ha observado un aumento de la presión arterial en ratas que recibieron eritropoyetina, incluso cuando se habían mantenido anémicas mediante una dieta deficiente en hierro (Vaziri et al. 1996). Además, los animales que recibieron transfusiones de sangre para simular el aumento de la concentración de eritrocitos estimulado por la eritropoyetina no manifestaron el mismo incremento de la presión arterial (Vaziri et al. 1996). Por ello, se ha pensado que la administración crónica de eritropoyetina provoca aumento de la presión arterial como un efecto independiente de la elevación del hematocrito, y que este aumento podría estar asociado con cambios en las respuestas vasculares (Vaziri et al. 1996; Vaziri, 2001).

Existe evidencia experimental que apoya la idea de que la hipertensión asociada a la administración crónica de eritropoyetina podría estar relacionada con algunos efectos directos de la hormona sobre la musculatura lisa de los vasos sanguíneos. Se ha reportado que la eritropoyetina actúa sobre el músculo liso vascular inhibiendo la apoptosis (Akimoto et al. 2000), aumentando la concentración intracelular de calcio (Neusser et al. 1993; Akimoto et al. 2001), provocando contracción (Morakkabati et al. 1996) e intensificando la expresión de receptores de angiotensina II (Barrett et al. 1998). Asimismo, se ha sugerido que la eritropoyetina podría funcionar como un promotor de crecimiento para células musculares lisas, contribuyendo al desarrollo de hipertrofia vascular e hipertensión arterial (Gogusev et al. 1994). Otras posibles explicaciones a la hipertensión

asociada con la administración de eritropoyetina incluyen una mayor resistencia al efecto vasodilatador del óxido nítrico (Vaziri et al. 1996; Vaziri, 2001) y una producción aumentada de endotelina-1 (Lebel et al. 1998; Rodrigue et al. 2003).

En ratas, el uso de losartán (un bloqueador de receptores para angiotensina II) (Lebel et al. 2006) o de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) (Eggena et al. 1991; Lebel et al. 2006) ha logrado suprimir el aumento de la presión arterial inducido por la eritropoyetina. Por otra parte, Krapf y Hulter (2009) han ofrecido una revisión sobre la hipertensión arterial en humanos inducida por la eritropoyetina y los agentes estimuladores de la eritropoyesis, subrayando el potencial para el futuro desarrollo de agentes que pudieran actuar como estimuladores de la eritropoyesis, sin provocar efectos hemodinámicos secundarios.

## **Efectos en diversos tejidos**

*La eritropoyetina ha mostrado ejercer protección contra diversos tipos de daño en varios tejidos.*

Los efectos protectores que se le han conferido a la eritropoyetina frente a diversas amenazas para los tejidos conforman una larga lista que continúa en crecimiento. Entre ellos podemos señalar que, al igual que en el corazón y el cerebro, la hormona ha mostrado ejercer protección contra el daño por la isquemia-reperfusión del tejido renal (Yang et al. 2003; Patel et al. 2004; Sharples et al. 2004), del tejido hepático (Sepodes et al. 2006; Schmeding et al. 2009) y del tejido gonadal después de un cuadro de torsión testicular (Yazihan et al. 2007).

En el tejido renal, se ha reportado el efecto protector de la eritropoyetina, ejercido mediante acciones antiapoptóticas y antiinflamatorias, en un modelo animal de obstrucción unilateral de uréter (Chang et al. 2009). Además se ha señalado que

la eritropoyetina mejora la recuperación funcional del riñón después de la insuficiencia aguda inducida por cisplatino (Vaziri et al. 1994).

En cuanto al hígado, se ha encontrado que la administración de eritropoyetina aumenta la regeneración del órgano después de la hepatectomía parcial del 70% en ratas (Schmeding et al. 2008). El análogo darbepoetin alfa también ha mostrado sus propiedades hepatoprotectoras, esto al ejercer efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos tras la administración i.v. efectuada en un modelo experimental de insuficiencia hepática aguda en ratones (Le Minh et al. 2007).

Por otro lado, en un modelo experimental de quemaduras, se observó que los ratones que recibieron rhEPO por vía subcutánea (400 unidades/kg/día durante 14 días) presentaron una reepitelización mayor y la herida cerró en un tiempo menor. Estos efectos fueron atribuidos a la estimulación de la proliferación epitelial, la maduración de la matriz extracelular y la angiogénesis (Galeano et al. 2006).

Finalmente, aunque no corresponde al contenido de este estudio, es conveniente señalar que en la literatura médica humana están disponibles varias revisiones recientes sobre el uso terapéutico de eritropoyetina como un agente neuroprotector / neuroregenerador (Sargin et al. 2010; Velly et al. 2010; Xiong et al. 2011), sus efectos protectores contra el daño pulmonar agudo (Kakavas et al. 2011) y su utilidad en el tratamiento de enfermedades cardíacas (Ruifrok et al. 2008; Tilling y Clapp, 2012).

#### *La eritropoyetina podría regular la ventilación.*

Soliz et al. (2005) reportaron que los ratones transgénicos que sobreexpresan eritropoyetina humana de manera constitutiva en el cerebro, muestran una respuesta ventilatoria aumentada frente a la hipoxia aguda y una mejor aclimatación ventilatoria frente a la hipoxia crónica; asimismo, encontraron que el EpoR es expresado en los principales centros respiratorios del tallo cerebral y que la eritropoyetina regula la ventilación al modificar el metabolismo de catecolaminas

en esta estructura. Además, sugirieron que los quimiorreceptores de los cuerpos carotídeos son sensibles a los niveles plasmáticos de eritropoyetina, pues observaron una modulación del patrón de ventilación durante la hipoxia después de administrar rhEPO por vía i.v. en los ratones. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la eritropoyetina participa en el control de la ventilación al actuar tanto a nivel central como a nivel periférico. Así, esta hormona podría mediar no sólo la respuesta eritropoyética, sino también la respuesta ventilatoria cuando un animal es sometido a estrés hipóxico.

La modulación de la ventilación por parte de la eritropoyetina ante la falta de oxígeno ha mostrado ser dependiente del sexo. En mujeres y ratones hembra que recibieron rhEPO, la respuesta ventilatoria frente a la hipoxia se encontró significativamente aumentada en comparación con los machos correspondientes. Este hallazgo podría contribuir a explicar el hecho de que los hombres sean más susceptibles que las mujeres a los síndromes asociados con la hipoxia (Soliz et al. 2009).

#### *La eritropoyetina participa en el desarrollo embrionario.*

La eritropoyetina ejerce efectos importantes sobre el desarrollo embrionario, especialmente en el corazón y en el sistema nervioso. La falta genética de eritropoyetina o de su receptor (animales eritropoyetina [-/-] o receptor de eritropoyetina [-/-]) provoca letalidad embrionaria en ratones, que se ha atribuido no sólo a la anemia, sino también al desarrollo de malformaciones cardíacas (Wu et al. 1999). Aunque la supresión global del EpoR causa letalidad embrionaria, los ratones rescatados de esta situación, mediante la inducción de la expresión del receptor exclusivamente en el tejido hematopoyético, sobreviven y son fértiles, por lo que Suzuki et al. (2002) plantearon que la expresión del EpoR en tejidos no hematopoyéticos es prescindible para el desarrollo normal de los ratones. Sin embargo, se han reportado defectos severos e idénticos en la neurogénesis embrionaria de animales nulos, ya sea para el gen de la eritropoyetina o el de su

receptor (Tsai et al. 2006). Asimismo, se ha observado que la eritropoyetina estimula la proliferación de las células progenitoras neurales, las cuales incluso expresan más receptores de eritropoyetina que las neuronas maduras (Chen et al. 2007) y se ha sugerido además que la hormona promueve la maduración de oligodendrocitos y la proliferación de astrocitos, confiriéndole una participación en el desarrollo de las células gliales (Sugawa et al. 2002).

*La eritropoyetina podría ejercer efectos importantes en el crecimiento tumoral.*

En la actualidad, un interesante tema de discusión es la capacidad de la eritropoyetina para promover el crecimiento tumoral. Este problema ha tenido un particular impacto en medicina humana, en la que se ha utilizado eritropoyetina para el tratamiento de la anemia de pacientes con cáncer.

La identificación de la expresión del receptor de eritropoyetina en varias células cancerosas humanas (Westenfelder y Baranowski, 2000; Acs et al. 2001; Acs et al. 2003) ha planteado la alarmante posibilidad de que la hormona ejerza efectos asociados con la proliferación, el crecimiento y la inhibición de la apoptosis de las células tumorales. En medicina veterinaria, se reportó la expresión del receptor de eritropoyetina en un tumor de glándula mamaria canina (Sfacteria et al. 2005). En un modelo animal de cáncer de colon, después de la extirpación del órgano afectado, los ratones que previamente habían recibido rhEPO o eritropoyetina recombinante de ratón presentaron una masa tumoral recurrente de mayor tamaño que aquellos a los que sólo se administró el vehículo (Pascual et al. 2013). Se ha señalado además que la eritropoyetina podría ser un estimulador endógeno de la vascularización durante el desarrollo tumoral (Ribatti, 2012).

No obstante lo anterior, la relación entre la eritropoyetina y el cáncer dista mucho de ser clara, pues existen opiniones variadas y divergentes sobre el tema. La recopilación de los hallazgos experimentales pone de manifiesto una gran complejidad del efecto general de la señalización de la eritropoyetina sobre el desarrollo del cáncer (Hardee et al. 2006; Tóvári et al. 2008). Además, los

resultados de varias investigaciones sobre el tema han sido cuestionados. Por ejemplo, se señaló que los anticuerpos anti-EPOR que habían sido utilizados para identificar la expresión del receptor en células tumorales eran poco específicos y, por tanto, de utilidad experimental limitada (Elliott et al. 2006). También se ha argumentado que varios estudios preclínicos realizados para evaluar el efecto de los agentes estimuladores de la eritropoyesis sobre células tumorales utilizaron dosis muy por encima de los valores fisiológicos (Osterborg et al. 2007).

Puesto que la participación de la eritropoyetina en la biología del crecimiento tumoral es un tema controversial e importante, resulta inexcusable realizar más investigación al respecto. Mientras se cuenta con algunos avances en cuanto al papel de la eritropoyetina en los aspectos oncogénicos y terapéuticos del cáncer en humanos (Szenajch et al. 2010), la información es incipiente en el campo de la medicina veterinaria.

### **Aprovechamiento terapéutico de los efectos no eritropoyéticos**

Pensando en la eritropoyetina como un agente terapéutico, el optimismo que provoca el conocimiento de sus efectos neuroprotectores y cardioprotectores podría ser contrarrestado por el hecho de que también genera aumento del hematocrito. Por supuesto, sería prioritario intentar dissociar estos efectos, por ejemplo modificando la estructura química de la hormona. Al respecto, se reportó que la asialo-eritropoyetina, generada a partir de rhEPO, además de no mostrar efectos eritropoyéticos, se unió a neuronas en el hipocampo y en la corteza después de ser administrada por vía intravenosa, y exhibió una amplia gama de efectos neuroprotectores al utilizarse en modelos de isquemia cerebral, compresión de médula espinal y aplastamiento de nervio ciático (Erbayraktar et al. 2003). Otro ejemplo de la utilización de moléculas modificadas de la hormona lo constituye la eritropoyetina carbamilada (CEPO), que no muestra efectos hematopoyéticos, pero ha exhibido efectos neuroprotectores (Leist et al. 2004) y

cardioprotectores (Fiordaliso et al. 2005). Se han encontrado además propiedades de protección tisular de pequeños péptidos que corresponden a una porción de la molécula de eritropoyetina, y que carecen de actividad eritropoyética (Brines et al. 2008). Estos avances podrían ofrecer alternativas más seguras para el tratamiento de diversas enfermedades, sin los efectos indeseables de la eritropoyetina.

La hipótesis de que la eritropoyetina interviene en la protección tisular a través de un heterorreceptor, el cual es distinto del receptor que media el efecto hematopoyético, podría contribuir a explicar el hecho de que algunos derivados de la hormona ejerzan únicamente efectos no-eritropoyéticos (Brines et al. 2004; Brines, 2010).

En resumen, el descubrimiento de que la eritropoyetina ejerce acciones importantes sobre diversas células localizadas fuera de la médula ósea ha convertido a la hormona en objeto de atención para fisiólogos y clínicos durante los últimos años. Sobresale el efecto protector de la hormona sobre varios tejidos, el cual es ejercido principalmente a través de mecanismos antiapoptóticos, antiinflamatorios y angiogénicos. No obstante, es pertinente recalcar la necesidad de comprender mejor estos efectos, para no sobrestimar su potencial terapéutico ni pasar por alto posibles consecuencias adversas.

## **X. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS**

En una gran variedad de trastornos fisiopatológicos, el exceso en la producción de eritropoyetina puede provocar eritrocitosis, mientras que su deficiencia conduce a anemia.

### **Exceso**

En casi todos los vertebrados, el incremento de la capacidad de la sangre para transportar O<sub>2</sub>, que es resultado del aumento del hematocrito, es un mecanismo que beneficia la entrega del gas a los tejidos (Brauner y Wang, 1997), siempre que ello no implique un incremento excesivo de la viscosidad de la sangre, lo que representaría una mayor carga de trabajo para el corazón, dificultando el flujo en los vasos sanguíneos. Así, una respuesta eritropoyética exagerada supone riesgos para el funcionamiento normal del organismo. Por ejemplo, la policitemia que se desarrolla en las grandes altitudes contribuye al agravamiento de la hipertensión pulmonar (Barer et al. 1983), ya que se suma a los efectos de la vasoconstricción ocurrida en la circulación menor en respuesta a este estímulo hipóxico.

El aumento de la concentración de eritrocitos en la sangre puede ser de origen primario o secundario. La eritrocitosis primaria se ha considerado un trastorno mieloproliferativo y han sido reportados algunos casos en varias especies de animales domésticos: perro (Page et al. 1990), gato (Watson et al. 1994), caballo (McFarlane et al. 1998) y ternero (Takagi et al. 2006). En cambio, la eritrocitosis secundaria es consecuencia del exceso de producción de eritropoyetina y, por tal razón, es la que se trata con mayor atención en este trabajo. Debido a su origen



fisiopatológico, ambos tipos de policitemia difieren en los niveles séricos de eritropoyetina, encontrándose una concentración mayor de la hormona en aquellos casos en los que la policitemia es de tipo secundario. Sin embargo, la medición de los niveles séricos de eritropoyetina no necesariamente ofrece información con valor diagnóstico, pues en ambos tipos de policitemia se pueden encontrar valores que se superponen con el rango normal (Cook y Lothrop, 1994; Hasler y Giger, 1996).

En el cuadro 2 se resumen algunos reportes asociados con eritrocitosis o policitemia secundaria en animales domésticos.

*La eritrocitosis secundaria puede ser consecuencia de la hipoxemia crónica.*

Puesto que la hipoxia tisular es el principal estímulo para la producción de eritropoyetina, la eritrocitosis secundaria con frecuencia es resultado de la hipoxemia crónica. Este trastorno puede observarse en la exposición a grandes altitudes, así como en algunas enfermedades cardíacas o pulmonares. Los reportes de caso de animales con eritrocitosis o policitemia secundaria a hipoxemia incluyen: 1) una vaca Holstein-Friesian de 4.5 años de edad, diagnosticada con complejo Eisenmenger, que presentaba intolerancia severa al ejercicio y en la que la gasometría reveló una hipoxemia marcada (Gavaghan et al. 2001); 2) un gato de 18 meses, diagnosticado con tetralogía de Fallot, cuyos signos clínicos incluían debilidad, disnea, cianosis y mucosas congestionadas, así como hemorragias en nariz y encías (Kirby y Gillick, 1974); 3) cuatro perros adultos diagnosticados con ducto arterioso persistente que presentaban policitemia (Moore y Stepien, 2001) y 4) una perra pointer alemán de ocho años diagnosticada con enfermedad pulmonar intersticial difusa, que presentaba dificultad respiratoria, hipertensión pulmonar y cor pulmonale (Bertazzolo et al. 2002). Es necesario advertir que el aumento de la producción de eritropoyetina durante la insuficiencia respiratoria crónica no se presenta en todos los casos

pues, como se ha explicado, el proceso inflamatorio puede inhibir la expresión del gen de la eritropoyetina.

En el síndrome ascítico de los pollos de engorda se presenta hipoxemia y el hematocrito generalmente se encuentra elevado. En estos animales, el aumento de la concentración plasmática de corticosterona, inducido por el estrés, ha sido considerado como causa de una mayor producción de glóbulos rojos con un menor contenido de hemoglobina; esta última condición podría contribuir al agravamiento de la hipoxemia característica de esta enfermedad (Luger et al. 2003).

*La eritrocitosis secundaria puede ser consecuencia de la presencia de tumores.*

Diversos tumores, incluyendo carcinomas renales y hepáticos, pueden ser otra causa importante de eritrocitosis secundaria. En algunos casos, los tumores mismos producen eritropoyetina; en otros, es el tejido renal normal quien secreta la hormona de manera excesiva, quizás como resultado de la isquemia provocada por el tumor (Jelkmann, 1992). Los reportes de caso asociados con eritrocitosis o policitemia secundaria a tumores en animales domésticos incluyen perros con diagnóstico de fibrosarcoma renal (Gorse, 1988), fibrosarcoma intranasal (Couto et al. 1989), linfoma renal de células T (Durno et al. 2011), leiomiomas cecales (Sato et al. 2002) y schwannoma (Yamauchi et al. 2004). Además, gatos con adenocarcinoma renal (Klainbart et al. 2008; Noh et al. 2013), potras o yeguas jóvenes con hepatoblastoma (Lennox et al. 2000; Axon et al. 2008; Gold et al. 2008), una potra con carcinoma hepatocelular (Roby et al. 1990), una yegua con linfoma (Koch et al. 2006), una vaca con carcinoma hepatocelular (Braun et al. 1997), una oveja con carcinoma colangiocelular (Braun et al. 1997), y una llama con tumor de la granulosa y teca (Anderson et al. 2010). En la mayoría de estos casos se trataba de animales de edad relativamente avanzada. Sin embargo, se tiene el reporte de policitemia en una perra de 19 meses de edad con adenocarcinoma renal (una presentación anormalmente temprana para esta

neoplasia) (Crow et al. 1995) y en una vaquilla de 8 meses con carcinoma hepatocelular (Braun et al. 1997).

La remoción del tejido tumoral puede corregir los valores hematológicos de los pacientes, como lo sugieren los reportes de casos de varios perros (Gorse, 1988; Couto et al. 1989; Yamauchi et al. 2004). Lo mismo se ha observado en gatos con adenocarcinoma renal, en los que, tras realizar la nefrectomía del riñón afectado, los niveles séricos de la hormona disminuyeron gradualmente, resolviéndose la eritrocitosis/policitemia con el transcurso de algunos días (Klainbart et al. 2008; Noh et al. 2013). Se ha sugerido que, cuando sólo un riñón es afectado por el tumor y el otro funciona adecuadamente, la nefrectomía debe ser considerada como una opción de tratamiento en gatos con policitemia secundaria a adenocarcinoma renal (Klainbart et al. 2008).

Clínicamente, la policitemia secundaria puede estar acompañada de poliuria y polidipsia. Partiendo de la hipótesis de que la hiperviscosidad y el aumento del volumen sanguíneo pueden afectar la liberación de la hormona antidiurética (ADH), resultando en poliuria y polidipsia, van Vonderen et al. (1997) encontraron que, en efecto, los perros con policitemia secundaria a una neoplasia renal presentaban una liberación retardada de dicha hormona, siendo incapaces de concentrar la orina, ante la inducción de un aumento de la osmolalidad plasmática.

#### *Existen otras causas de eritrocitosis secundaria.*

Además de la hipoxemia crónica y la presencia de tumores, existen otros factores que pueden causar o agravar la eritrocitosis secundaria. En perros, por ejemplo, se ha encontrado policitemia asociada a la pielonefritis unilateral (Kessler, 2008); en este reporte, se señaló que los parámetros hematológicos y la concentración de eritropoyetina recuperaron su valor normal después de la nefrectomía total. El cobalto también estimula la producción de eritropoyetina (ver sección V) y se ha pensado que la exposición a este elemento podría contribuir a la marcada eritrocitosis que se presenta en comunidades mineras que habitan a grandes

altitudes (Jefferson et al. 2002). Por otro lado, la policitemia secundaria puede encontrarse relacionada con diferentes hemoglobinopatías (Prchal y Prchal, 1999). En este punto sería conveniente recordar el caso de la inhalación de CO, estímulo que provoca aumento de la concentración plasmática de eritropoyetina de manera verdaderamente sorprendente, al inducir una grave hipoxia tisular, producto de la combinación de una baja capacidad de transporte de O<sub>2</sub> y de una alta afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (Jelkmann y Seidl, 1987).

## **Deficiencia**

*La producción deficiente de eritropoyetina puede ocurrir durante la insuficiencia renal crónica, generando la “anemia renal”.*

En pacientes con insuficiencia renal crónica es común que se presente anemia normocítica normocrómica no regenerativa (King et al. 1992) (en ocasiones referida como “anemia renal”), la cual ocurre principalmente como consecuencia de la producción deficiente de eritropoyetina. Sin embargo, los animales con este tipo de anemia no necesariamente presentan niveles reducidos de la hormona (Cook y Lothrop, 1994; Pechereau et al. 1997).

La anemia renal es un problema frecuente en pequeñas especies. Se estima que entre el 15 y el 30% de los gatos geriátricos desarrollarán enfermedad renal crónica, y que entre el 30 y el 65% de estos animales presentarán anemia con el progreso de la enfermedad (Chalhoub et al. 2011). En perros, el grado de anemia ha mostrado una relación directa con el grado de la insuficiencia renal crónica (King et al. 1992).

Con base en el conocimiento de que los riñones son la principal fuente de eritropoyetina circulante en el mamífero adulto, no resulta difícil comprender el hecho de que la falla renal conduzca a una producción deficiente de la hormona y, en consecuencia, al desarrollo de anemia. Sin embargo, los mecanismos

fisiopatológicos subyacentes a este trastorno podrían distar de ser sencillos. La observación de que la concentración sérica de eritropoyetina puede aumentar significativamente en pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a estrés hipóxico ha hecho pensar que la capacidad de producir la hormona no necesariamente se encuentra abolida, y que el mecanismo fisiológico de detección de oxígeno opera a un punto de ajuste inferior (Chandra et al. 1988). Para complicar más las cosas, dentro de la gran diversidad etiológica de la insuficiencia renal, la producción de eritropoyetina, ya de por sí deficiente, podría ser inhibida aún más por algunas citocinas inflamatorias (Jelkmann, 1998; La Ferla et al. 2002).

Además de la falta de eritropoyetina, se han identificado otros factores que pueden contribuir a la anemia de la insuficiencia renal, entre ellos una vida reducida de los glóbulos rojos, desbalances nutricionales, y hemorragias, las cuales son frecuentes en pacientes urémicos (Harris y Krawiec, 1990).

*La producción deficiente de eritropoyetina puede ocurrir durante diversos trastornos crónicos, generando la “anemia por enfermedad crónica”.*

En algunos pacientes con procesos inflamatorios crónicos o tumores malignos se presenta anemia (Samson, 1983), la cual en ocasiones es llamada “anemia por enfermedad crónica”. Aunque el desarrollo de esta anemia en realidad es multifactorial, la inhibición de la expresión del gen de la eritropoyetina causada por algunas citocinas inflamatorias es uno de los importantes mecanismos subyacentes. Existe evidencia que apoya la idea de que la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) son responsables de inhibir la producción de eritropoyetina durante procesos inflamatorios renales o sistémicos (Jelkmann, 1998).

Asimismo, con base en los resultados de un estudio realizado *in vitro*, se ha pensado que la exposición al cadmio y la quimioterapia con cisplatino provocan anemia al interferir directamente con la síntesis de eritropoyetina en el riñón, lo

cual ocurre probablemente mediante la inhibición de la unión del HIF, y de la expresión del ARNm de eritropoyetina (Horiguchi et al. 2000).

## **XI. ALGUNOS USOS DE LA ERITROPOYETINA EN MEDICINA VETERINARIA**

En medicina humana, el principal uso de la rhEPO ha sido el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal crónica. Además, la eritropoyetina ha sido utilizada para el tratamiento de la anemia inducida por la quimioterapia en pacientes con cáncer, en pacientes con SIDA que desarrollan anemia como consecuencia de la terapia antiviral, en pacientes quirúrgicos (durante las fases preoperatoria y postoperatoria) y en pacientes con anemia mielodisplásica, aunque sólo una minoría de estos últimos responde al tratamiento (Bunn, 2013). En cambio, el uso de eritropoyetina en medicina veterinaria está limitado por la falta de disponibilidad a nivel comercial de eritropoyetina recombinante de las especies en cuestión, así como por la insuficiente información publicada en cuanto se refiere al potencial terapéutico de la hormona en diferentes patologías.

### **Tratamiento de la insuficiencia renal crónica en perros y gatos**

El principal uso terapéutico de la eritropoyetina es, sin duda, en el tratamiento de la anemia en humanos y animales con insuficiencia renal crónica. La producción deficiente de eritropoyetina puede ser contrarrestada mediante el uso de agentes estimuladores de los eritrocitos (“erythrocyte-stimulating agents” o ESAs, por sus siglas en inglés) como son el epoetin alfa, el epoetin beta y el darbepoetin alfa (Chalhoub et al. 2011). La administración de rhEPO en perros y gatos con insuficiencia renal crónica puede aumentar el número de glóbulos rojos y reticulocitos, la concentración de hemoglobina y el hematocrito, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes (Cowgill et al. 1998).

Una de las dificultades que implica el tratamiento con eritropoyetina es la necesidad de aplicarla varias veces por semana. Para resolver esta situación puede ser útil el uso de nuevas sustancias que favorezcan la liberación sostenida de la hormona (Nagasaki et al. 2009; Nagasaki, 2010), así como el desarrollo de derivados de su molécula que tengan una acción prolongada. Por ejemplo, el darbepoetin alfa tiene una mayor glicosilación y una vida media más larga que la eritropoyetina (Macdougall, 2002; Cases, 2003), lo que permite disminuir la frecuencia de administración. Su utilización en gatos ha sido considerada como un tratamiento efectivo y relativamente seguro de la anemia derivada de la enfermedad renal (Chalhoub et al. 2012).

Ante los riesgos que conlleva el tratamiento, se ha recomendado aplicar eritropoyetina solamente cuando el hematocrito haya alcanzado un valor menor al 20 o 22% (Polzin, 2011; Bartges, 2012), o cuando se presentan signos clínicos severos de anemia. Por su lado, el tratamiento con darbepoetin puede empezar a utilizarse en casos que presentan un menor grado de anemia (Bartges, 2012), ya que implica un menor riesgo de generar la producción de anticuerpos. Mientras la eritropoyetina se dosifica en unidades internacionales, el darbepoetin alfa lo hace en microgramos. 1  $\mu\text{g}$  de darbepoetin alfa equivale a 200 unidades de eritropoyetina. La dosis inicial de eritropoyetina que se ha recomendado es 100 U/kg, por vía subcutánea, tres veces a la semana (Langston et al. 2003), mientras que se sugiere administrar el darbepoetin en la fase de inducción a una dosis de 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , por vía subcutánea, sólo una vez a la semana (Polzin, 2011). En ambos esquemas de tratamiento, una vez que se alcanza el hematocrito objetivo, se recomienda reducir la dosis lentamente hasta encontrar la mínima cantidad necesaria para controlar la anemia (Bartges, 2012). Los pacientes que han sido tratados con EPO pueden cambiar a darbepoetin con una dosis equivalente, pero con un intervalo entre dosificaciones tres veces mayor (Polzin, 2011).

El suplemento con hierro es recomendable para todos los pacientes que reciben tratamiento con eritropoyetina (Langston et al. 2003; Polzin, 2011; Bartges, 2012). Las infecciones deben ser tratadas para minimizar el secuestro de hierro, lo que



podría resultar en una menor efectividad del tratamiento (Bartges, 2012). Por otra parte, las dietas bajas en proteínas pueden reducir la cantidad de fármacos hipotensores y de eritropoyetina requerida en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal (De Santo et al. 2011).

El monitoreo constante del hematocrito durante el tratamiento con EPO o con darbepoetin es muy importante para evitar la sobredosis. Durante la fase de inducción se recomienda hacer la medición cada semana, y después, en la fase de mantenimiento, cada mes (Polzin, 2011). En el manejo de la anemia, los estudios en humanos indican que el uso de rhEPO para elevar el nivel de hemoglobina más allá de un valor ideal, puede no representar mayores beneficios e incluso aumentar el riesgo de efectos adversos severos sobre el sistema cardiovascular (Singh et al. 2006). Aunque en los casos de insuficiencia renal crónica en perros y gatos no se ha establecido el hematocrito objetivo óptimo, un valor razonable puede ser el límite inferior del rango normal (Polzin, 2011). Una vez que el hematocrito se ha estabilizado dentro del rango buscado, deberá ser evaluado cada tres meses (Polzin, 2011). Si no se vigila correctamente el hematocrito, puede presentarse policitemia severa y muerte, particularmente durante la fase de inducción (Polzin, 2011). Otra medida que ha sido recomendada es evaluar la presión arterial antes del tratamiento y, después, mensual o bimestralmente (Langston et al. 2003).

*La administración de rhEPO a perros y gatos puede inducir la formación de anticuerpos anti-rhEPO y provocar hipoplasia eritroide.*

En perros y gatos, uno de los principales riesgos del uso de rhEPO es la reacción inmunológica que puede inducir (Cowgill et al. 1998). Con base en algunas observaciones de perros y gatos que presentaron anemia después del tratamiento con rhEPO, Langston et al. (2003) señalaron que entre el 20 y el 70% de los pacientes desarrollan una reacción inmunológica clínicamente significativa contra la rhEPO; sin embargo, dada la gran amplitud de este rango, hace falta realizar

más investigación que permita conocer con mayor precisión el porcentaje de animales en los que se presenta el problema.

Dado que los anticuerpos formados pueden reaccionar con la eritropoyetina exógena y la endógena, se puede presentar una anemia peor que la que había antes de iniciar el tratamiento. La grave hipoplasia eritroide que se ha encontrado algunas veces después de la administración de rhEPO ha sido atribuida a la respuesta inmunológica que se ejerce sobre la propia eritropoyetina endógena, anulando su participación en la respuesta a la anemia. El darbepoetin tiene menos probabilidades de mostrar este efecto adverso, por lo que este producto es actualmente más recomendado que la rhEPO para uso terapéutico en perros y gatos (Polzin, 2011). Aunque no es fácil la confirmación de la respuesta inmunológica contra la eritropoyetina exógena debido a la falta de técnicas de laboratorio para la detección de anticuerpos anti-rhEPO, se sospecha que ha habido formación de anticuerpos en pacientes que inicialmente responden al tratamiento pero que posteriormente muestran un descenso del hematocrito o una falta de respuesta a mayores dosis de eritropoyetina o darbepoetin (Polzin, 2011; Bartges, 2012). Otro hecho que sugiere que el problema se ha presentado es la demostración de un incremento en la proporción mieloide/eritroide de la médula ósea (Polzin, 2011). Los anticuerpos se forman por lo general en los primeros meses de tratamiento (Langston et al. 2003).

Cuando se sospecha de la formación de anticuerpos, el tratamiento con rhEPO debe suspenderse de inmediato y se recomienda efectuar transfusiones sanguíneas (Langston et al. 2003). La suspensión oportuna del medicamento puede restablecer el nivel de eritropoyesis previo al tratamiento (Polzin, 2011). Por ejemplo, en perros clínicamente sanos a los que se administró rhEPO y en los que se desarrolló hipoplasia eritroide, la suspensión del tratamiento consiguió la recuperación de la producción de glóbulos rojos en 5 – 11 semanas (Randolph et al. 1999). Sin embargo, los problemas de compatibilidad, el costo de las transfusiones y la persistencia de la anemia con frecuencia culminan con la muerte o eutanasia del paciente (Langston et al. 2003). Cabe mencionar que las

transfusiones sanguíneas también han sido consideradas como una opción terapéutica en aves de compañía o silvestres (Martinho, 2012), en quienes la administración de rhEPO podría carecer de utilidad.

En perros y gatos, otros efectos adversos posiblemente atribuibles al uso de eritropoyetina o darbepoetin, incluyen hipertensión (Cowgill et al. 1998; Chalhoub et al. 2011; Chalhoub et al. 2012), convulsiones (Cowgill et al. 1998; Chalhoub et al. 2011; Chalhoub et al. 2012), deficiencia de hierro (Cowgill et al. 1998; Chalhoub et al. 2011), fiebre (Chalhoub et al. 2011; Chalhoub et al. 2012), vómito (Chalhoub et al. 2012) y artralgia (Chalhoub et al. 2011). Como ya se mencionó, la policitemia resultante de un mal monitoreo del hematocrito y de una mala dosificación es una complicación frecuente.

## **Otros usos terapéuticos**

En medicina veterinaria, el uso de eritropoyetina con fines distintos al tratamiento de la anemia renal se encuentra mucho menos documentado. Los perros o gatos con anemias por causas distintas de la insuficiencia renal crónica mantienen la capacidad de producir la hormona y generalmente presentan concentraciones altas de la misma (Kociba et al. 1983; Wardrop et al. 1986; Cook y Lothrop, 1994; Pechereau et al. 1997). Por lo tanto, es cuestionable la recomendación del uso de eritropoyetina recombinante en estos animales, especialmente por el riesgo de inducir la formación de anticuerpos que reducirían los posibles efectos benéficos del tratamiento. Así, el uso de eritropoyetina en pacientes con anemia por causa distinta de la insuficiencia renal ha sido mínimo en medicina veterinaria. No obstante, se exponen a continuación algunos reportes sobre diversos usos de rhEPO en animales. La potencial utilización de esta información deberá ser analizada sobre la base del criterio y experiencia clínica de los médicos veterinarios.

En 2011 Geeta (2011) informó sobre un pastor alemán de 5 años que presentaba anemia hipoplásica, y cuyos valores hematológicos mostraron una respuesta favorable al tratamiento, consistente en la administración de eritropoyetina (100 UI/kg SC dos veces a la semana), de decanoato de nandrolona (2 mg/kg IM una vez a la semana), así como de antibióticos de amplio espectro, vitaminas del complejo B y suplemento de hierro por vía oral. Holland et al. (1996) reportaron el caso de un perro Dachshund macho castrado, de 11 años de edad, diagnosticado con pancitopenia asociada a toxicidad por captopril, cuyo tratamiento consistió en suspender el medicamento, así como en administrar rhEPO y factor estimulante de colonias de granulocitos. Sin embargo, dado que otros agentes terapéuticos fueron administrados simultáneamente, sería necesario definir con mayor profundidad la utilidad que el uso de la eritropoyetina tuvo en estos dos casos.

En 2003, en una revisión sobre la fisiología y el tratamiento de un grupo diverso de trastornos de la médula ósea, Weiss (2003) señala que los perros con ciertos tipos de síndromes mielodisplásicos (conocidos como MDS-RC y MDS-Er) parecen responder favorablemente al tratamiento con eritropoyetina y tienen una supervivencia más prolongada.

En 1998, evaluando el valor potencial del uso de la rhEPO como coadyuvante en los bancos de sangre para autotransfusión, Suzuki (1998) reportó que los perros a los que se había suministrado hierro y rhEPO mantuvieron un hematocrito prácticamente inalterado después de recibir una donación de sangre autóloga, a diferencia de los perros que días antes de la transfusión habían recibido solución salina o sólo hierro, en los que sí se observó un marcado descenso del hematocrito. Concluyó que la rhEPO es un valioso auxiliar en los bancos de sangre canina para la autotransfusión.

En 2001, Arai et al. (2001) informaron sobre el uso de rhEPO y del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante humano (rhGM-SCF) en gatos de laboratorio infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV). La administración subcutánea de rhEPO, a una dosis de 100 U/kg tres veces por semana durante dos semanas, mostró un aumento gradual del

hematocrito que alcanzó su valor máximo entre dos y cuatro semanas después del primer tratamiento con rhEPO. En gatos tratados con rhEPO también se presentó un aumento del conteo de glóbulos blancos a las cuatro semanas después del primer tratamiento, pero no hubo diferencia estadística con los animales controles. Ningún animal desarrolló anticuerpos, concluyéndose en este estudio que la rhEPO puede ser utilizada con seguridad en gatos infectados con el virus. Por otro lado, se detectaron anticuerpos anti- rhGM-SCF en más de la mitad de los gatos que recibieron inyecciones subcutáneas de rhGM-SCF, a una dosis de 5 µg/kg dos veces al día por dos semanas, sugiriendo que el uso de este factor en gatos infectados con el virus es inseguro.

En 2008, Sosa et al. (2008) reportaron el acceso rápido al encéfalo de rhEPO con bajo contenido de ácido siálico, después de ser administrada por vía intranasal en un “gerbo de Mongolia” y un primate no humano. Con base en sus resultados, propusieron la vía nasal como una alternativa segura y no invasiva para el aprovechamiento del efecto neuroprotector de la eritropoyetina en accidentes cerebrovasculares.

En 2013, Alvarez Blanquet (2013) presentó el caso de un perro chihuahueño hembra de 12 años con traumatismo craneoencefálico. En reconocimiento de los efectos neuroprotectores de la eritropoyetina, el paciente fue tratado con rhEPO vía intranasal a una dosis de 150 UI/kg a las dos horas posteriores al traumatismo. En la evaluación neurológica al día 0 el paciente presentó estupor, midriasis, incapacidad para incorporarse, así como ausencia de propiocepción y dolor superficial; al día 2 se presentó en estado de alerta y responsivo, con pupilas responsivas, ataxia, y presencia de propiocepción y dolor superficial.

Puede concluirse que la información publicada hasta ahora sobre el uso terapéutico de eritropoyetina en animales que padecen anemias de origen no renal es insuficiente para establecer una recomendación general. Sin embargo, el aprovechamiento de los efectos no hematopoyéticos de la eritropoyetina, especialmente su actividad neuroprotectora, podría en el futuro ser beneficioso para la medicina veterinaria. Después de todo, el optimismo que al respecto se ha

generado en medicina humana está sustentado en un vasto trabajo experimental llevado a cabo en diversos modelos animales.

## **Dopaje en animales de carrera**

La estimulación de la eritropoyesis ha sido un campo atractivo en el área de los equinos, y existe evidencia experimental de que la administración de eritropoyetina en estos animales puede tener efectos favorables. En un estudio con yeguas sometidas a pruebas de esfuerzo, y que habían participado previamente en protocolos experimentales, se observó que la administración de bajas dosis de rhEPO incrementó el hematocrito, la capacidad aeróbica y el rendimiento del ejercicio, sin alterar el volumen de la sangre ni la concentración plasmática de proteínas (McKeever et al. 2006). En otro estudio, tras la anemia experimental y el tratamiento con eritropoyetina, los caballos mostraron un aumento del volumen celular medio de reticulocitos (Cooper et al. 2005).

Por sus efectos favorables sobre la capacidad de transporte de O<sub>2</sub> y de mejoría en la entrega de este gas al tejido muscular, la eritropoyetina recombinante ha sido utilizada en humanos para mejorar el rendimiento atlético, principalmente en los deportes de alta resistencia (Bento et al. 2003). Como es de suponerse, esta práctica se ha extendido a los caballos de carrera. En estos animales, el dopaje con rhEPO, para aumentar su resistencia, es una práctica ilegal que se ha reportado en los últimos años. Este problema concierne también a los perros galgos (Bartlett et al. 2006).

Los riesgos asociados con el uso de rhEPO en caballos no deben ser ignorados. Esta práctica puede provocar trastornos derivados del aumento del hematocrito y la viscosidad de la sangre (McKeever, 2011), los cuales pueden comprometer seriamente el bienestar del animal. Además, se ha demostrado que los anticuerpos contra eritropoyetina humana pueden reaccionar con la propia eritropoyetina equina (Kearns et al. 2000). Asimismo, se ha reportado la formación

de anticuerpos anti-rhEPO, con desarrollo de hipoplasia eritroide y anemia, en caballos a los que se había administrado rhEPO, los cuales después de ser dados de alta con la indicación de discontinuar la administración de rhEPO y administrar dexametasona, se recuperaron en unos meses y regresaron al entrenamiento (Piercy et al. 1998).

Es importante contar con métodos eficientes para la detección del dopaje con rhEPO. En animales de carrera, las muestras de orina son utilizadas con frecuencia, dada su relativa facilidad de obtención. Sin embargo, un problema común es la conmutación de dichas muestras. Aunque el hallazgo de nicotina, cafeína y ácido úrico es sugestivo de que se trata de orina humana, la confirmación definitiva de que ha habido conmutación de muestras puede ser complicada (Bartlett et al. 2006). Como ocurre en el caso de perros (Bartlett et al. 2006), se ha evaluado la eficacia de diferentes métodos para detectar la administración de agentes estimuladores de eritropoyesis en caballos mediante muestras de plasma (Guan et al. 2008; Scarth et al. 2011; Lönnberg et al. 2012) y orina (Scarth et al. 2011; Lönnberg et al. 2012). El sistema MAIIA, un nuevo método micro-cromatográfico, ha mostrado ser una herramienta prometedora, con una gran sensibilidad y un tiempo muy corto de presentación de resultados, capaz de detectar la administración de agentes estimuladores de la eritropoyesis (como las variantes de rhEPO Eprex y Aranesp) mediante muestras de plasma u orina (Lönnberg et al. 2012).

### **Eritropoyetina recombinante canina (rcEPO), eritropoyetina recombinante felina (rfEPO) y organismos transgénicos.**

Mediante el uso de células CHO, ha sido posible producir eritropoyetina recombinante canina (rcEPO) (MacLeod et al. 1998) y eritropoyetina recombinante felina (rfEPO) (Baldwin et al. 2003; Randolph et al. 2004b). A diferencia de la rhEPO, actualmente estos productos no se encuentran disponibles

comercialmente, y su disponibilidad en el futuro es incierta. No obstante, se han desarrollado varios experimentos para valorar la eficacia y la seguridad de las proteínas recombinantes en perros y gatos.

En los experimentos llevados a cabo en perros, se observó que la rcEPO estimulaba la producción de glóbulos rojos en animales clínicamente sanos (Randolph et al. 1999), así como en animales con anemia secundaria a insuficiencia renal crónica (Randolph et al. 2004a), sin que se provocara la hipoplasia eritroide asociada al uso de rhEPO. Desafortunadamente, la rcEPO no fue tan efectiva para restaurar la producción de eritrocitos en perros que previamente habían desarrollado aplasia de glóbulos rojos inducida por la administración de rhEPO (Randolph et al. 2004a).

En cuanto a los gatos, la rfEPO logró restablecer la eritropoyesis en varios animales con enfermedad renal crónica, incluso en aquellos que supuestamente presentaban aplasia de glóbulos rojos inducida por administración de rhEPO (Randolph et al. 2004b). Sin embargo, sorpresivamente, se observó que algunos gatos con insuficiencia renal crónica tratados con rfEPO desarrollaron anemia que no fue posible revertir con el uso de mayores dosis de rfEPO y se concluyó que el riesgo de desarrollo de aplasia de glóbulos rojos no fue eliminado como un problema grave (Randolph et al. 2004b).

Además de la producción de proteínas recombinantes mediante el uso de células CHO, se han creado organismos transgénicos que expresan el gen de la eritropoyetina humana. En cerdos que expresan el gen se han reportado trastornos reproductivos; la baja fertilidad observada en estos animales podría estar relacionada con un agotamiento de las células germinales causado por una apoptosis incrementada en los testículos, vinculada con la expresión anormal de diversas proteínas que además de alterar la apoptosis afectan el desarrollo del citoesqueleto (Choi et al. 2012).



## REFERENCIAS

- ABBRECHT PH, LITTELL JK. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol* 1972; 32:54-58.
- ACS G, ACS P, BECKWITH SM, PITTS RL, CLEMENTS E, WONG K, VERMA A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3561-3565.
- ACS G, ZHANG PJ, MCGRATH CM, ACS P, MCBROOM J, MOHYELDIN A et al. Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression. *Am J Pathol* 2003; 162:1789-1806.
- AGNELLO D, BIGINI P, VILLA P, MENNINI T, CERAMI A, BRINES ML, GHEZZI P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002; 952:128-134.
- AKIMOTO T, KUSANO E, INABA T, IIMURA O, TAKAHASHI H, IKEDA H et al. Erythropoietin regulates vascular smooth muscle cell apoptosis by a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent pathway. *Kidney Int* 2000; 58:269-282.
- AKIMOTO T, KUSANO E, ITO C, YANAGIBA S, INOUE M, AMEMIYA M et al. Involvement of erythropoietin-induced cytosolic free calcium mobilization in activation of mitogen-activated protein kinase and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2001; 19:193-202.
- ALLEN JW, KHETANI SR, JOHNSON RS, BHATIA SN. In vitro liver tissue model established from transgenic mice: role of HIF-1alpha on hypoxic gene expression. *Tissue Eng* 2006; 12:3135-3147.
- ALVAREZ BLANQUET LG. Neuroprotección, eritropoyetina recombinante humana en traumatismo craneoencefálico (reporte de caso). XXXI

Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, AC; 2013 mayo 23-25; Querétaro (Querétaro) México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, AC.

- ANAGNOSTOU A, LEE ES, KESSIMIAN N, LEVINSON R, STEINER M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:5978-5982.
- ANDERSON DE, COUTO CG, OGLESBEE M. Granulosa theca cell tumor with erythrocytosis in a llama. *Can Vet J* 2010; 51:1157-1160.
- ANG SO, CHEN H, HIROTA K, GORDEUK VR, JELINEK J, GUAN Y et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nat Genet* 2002; 32:614-621.
- ARAI M, DARMAN J, LEWIS A, YAMAMOTO JK. The use of human hematopoietic growth factors (rhGM-CSF and rhEPO) as a supportive therapy for FIV-infected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 77:71-92. (erratum in *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 78:217)
- AXON JE, RUSSELL CM, BEGG AP, ADKINS AR. Erythrocytosis and pleural effusion associated with a hepatoblastoma in a Thoroughbred yearling. *Aust Vet J* 2008; 86:329-333.
- BACHMANN S, LE HIR M, ECKARDT KU. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 1993; 41:335-341.
- BAHLMANN FH, SONG R, BOEHM SM, MENGEL M, VON WASIELEWSKI R, LINDSCHAU C et al. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 2004; 110:1006-1012.
- BALDWIN SL, POWELL TD, WONDERLING RS, KEISER KC, MORALES T, HUNTER S et al. Transient and stable transfection of Chinese hamster ovary cells with the recombinant feline erythropoietin gene and expression,

purification, and biological activity of feline erythropoietin protein. *Am J Vet Res* 2003; 64:1465-1471.

- BARCELÓ AC, BOZZINI CE. Erythropoietin formation during hypoxia in mice with impaired responsiveness to erythropoietin induced by irradiation or 5-fluorouracil injection. *Experientia* 1982; 38:504-505.
- BARCELÓ AC, MI OLIVERA, C BOZZINI, RM ALIPPI, CE BOZZINI. Androgens and erythropoiesis. Induction of erythropoietin-hypersecretory state and effect of finasteride on erythropoietin secretion. *Comp Haematol Int* 1999; 9:1-6.
- BARER GR, BEE D, WACH RA. Contribution of polycythaemia to pulmonary hypertension in simulated high altitude in rats. *J Physiol* 1983; 336:27-38.
- BARRETT JD, ZHANG Z, ZHU JH, LEE DB, WARD HJ, JAMGOTCHIAN N et al. Erythropoietin upregulates angiotensin receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 1998; 16:1749-1757.
- BARTGES JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2012; 42:669-692.
- BARTLETT C, CLANCY GJ, COWAN DA, HEALY JF. Detection of the administration of human erythropoietin (HuEPO) to canines. *J Anal Toxicol* 2006. 30:663-669.
- BATMUNKH C, KRAJEWSKI J, JELKMANN W, HELLWIG-BÜRCEL T. Erythropoietin production: Molecular mechanisms of the antagonistic actions of cyclic adenosine monophosphate and interleukin-1. *FEBS Lett* 2006; 580:3153-3160.
- BENTO RMA, DAMASCENO LMP, AQUINO NETO FR. Recombinant human erythropoietin in sports: a review. *Rev Bras Med Esporte* 2003; 9:181-190.
- BERNAUDIN M, MARTI HH, ROUSSEL S, DIVOUX D, NOUVELOT A, MACKENZIE ET, PETIT E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19:643-651.

- BERNAUDIN M, BELLAIL A, MARTI HH, YVON A, VIVIEN D, DUCHATELLE I et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30:271-278.
- BERRIDGE MV, FRASER JK, CARTER JM, LIN FK. Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood* 1988; 72:970-977.
- BERTAZZOLO W, ZULIANI D, POGLIANI E, CANIATTI M, BUSSADORI C. Diffuse bronchiolo-alveolar carcinoma in a dog. *J Small Anim Pract* 2002; 43:265-268.
- BERU N, J MCDONALD, C LACOMBE, E GOLDWASSER. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2571–2575.
- BONDURANT MC, MJ KOURY. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 2731–2733.
- BONSDORFF E, JALAVISTO E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948; 16:150-170.
- BOUTIN AT, WEIDEMANN A, FU Z, MESROPIAN L, GRADIN K, JAMORA C, et al. Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 2008; 133:223-234.
- BOZZINI CE, BARCELÓ AC, CONTI MI, MARTÍNEZ MP, ALIPPI RM. Enhanced hypoxia-stimulated erythropoietin production in mice with depression of erythropoiesis induced by hyperoxia. *High Alt Med Biol* 2003; 4:73-79.
- BRAUN U, CAPLAZI P, LINGGI T, GRAF F. Polyglobulie infolge Leberkarzinom bei Rind und Schaf. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1997; 139:165-171.
- BRAUNER CJ, WANG T. The optimal oxygen equilibrium curve: a comparison between environmental hypoxia and anemia. *Amer Zool* 1997; 37:101-108.

- BRINES M. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif* 2010; 29:86-92.
- BRINES ML, GHEZZI P, KEENAN S, AGNELLO D, DE LANEROLLE NC, CERAMI C et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:10526-10531.
- BRINES M, GRASSO G, FIORDALISO F, SFACTERIA A, GHEZZI P, FRATELLI M et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:14907-14912.
- BRINES M, PATEL NS, VILLA P, BRINES C, MENNINI T, DE PAOLA M et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10925-10930.
- BROUDY VC, TAIT JF, POWELL JS. Recombinant human erythropoietin: purification and analysis of carbohydrate linkage. *Arch Biochem Biophys* 1988; 265:329-336.
- BUNN HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3:a011619.
- BUNN HF, GU J, HUANG LE, PARK JW, ZHU H. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol* 1998; 201:1197-1201.
- CALVILLO L, LATINI R, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P, GHEZZI P et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:4802-4806.
- CARO J, ERSLEV AJ. Biologic and immunologic erythropoietin in extracts from hypoxic whole rat kidneys and in their glomerular and tubular fractions. *J Lab Clin Med* 1984; 103:922-931.
- CASES A. Darbepoetin alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein. *Drugs Today (Barc)* 2003; 39:477-495.

- CHALHOUB S, LANGSTON C, EATROFF A. Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. *J Feline Med Surg* 2011; 13:629-640.
- CHALHOUB S, LANGSTON CE, FARRELLY J. The use of darbepoetin to stimulate erythropoiesis in anemia of chronic kidney disease in cats: 25 cases. *J Vet Intern Med* 2012; 26:363-369.
- CHANDRA M, CLEMONS GK, MCVICAR MI. Relation of serum erythropoietin levels to renal excretory function: evidence for lowered set point for erythropoietin production in chronic renal failure. *J Pediatr* 1988; 113:1015-1021.
- CHANG YK, CHOI DE, NA KR, LEE SJ, SUH KS, KIM SY et al. Erythropoietin attenuates renal injury in an experimental model of rat unilateral ureteral obstruction via anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *J Urol* 2009; 181:1434-1443.
- CHEETHAM JC, SMITH DM, AOKI KH, STEVENSON JL, HOFFEL TJ, SYED RS et al. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol* 1998; 5:861-866.
- CHEN ZY, ASAVARITIKRAI P, PRCHAL JT, NOGUCHI CT. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* 2007; 282:25875-25883.
- CHEN J, CONNOR KM, ADERMAN CM, SMITH LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:526-533.
- CHIBA T, IKAWA Y, TODOKORO K. GATA-1 transactivates erythropoietin receptor gene, and erythropoietin receptor-mediated signals enhance GATA-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:3843-3848.
- CHIKUMA M, MASUDA S, KOBAYASHI T, NAGAO M, SASAKI R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E1242-E1248.
- CHOI MS, SHIM MR, OH MY, KIM KW, LEE HC, YANG BC et al. Proteins associated with reproductive disorders in testes of human erythropoietin gene-harboring transgenic boars. *Theriogenology* 2012; 78:1020-1029.

- CHOU CF, TOHARI S, BRENNER S, VENKATESH B. Erythropoietin gene from a teleost fish, *Fugu rubripes*. *Blood* 2004; 104:1498-1503.
- CHU CY, CHENG CH, CHEN GD, CHEN YC, HUNG CC, HUANG KY, HUANG CJ. The zebrafish erythropoietin: functional identification and biochemical characterization. *FEBS Lett* 2007; 581:4265-4271.
- COCKMAN ME, MASSON N, MOLE DR, JAAKKOLA P, CHANG GW, CLIFFORD SC et al. Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000; 275:25733-25741.
- COOK SM, LOTHROP CD JR. Serum erythropoietin concentrations measured by radioimmunoassay in normal, polycythemic, and anemic dogs and cats. *J Vet Intern Med* 1994; 8:18-25.
- COOPER C, SEARS W, BIENZLE D. Reticulocyte changes after experimental anemia and erythropoietin treatment of horses. *J Appl Physiol* 2005; 99:915-921.
- COUTO CG, BOUDRIEAU RJ, ZANJANI ED. Tumor-associated erythrocytosis in a dog with nasal fibrosarcoma. *J Vet Intern Med* 1989; 3:183-185.
- COWGILL LD, JAMES KM, LEVY JK, BROWNE JK, MILLER A, LOBINGIER RT, EGRIE JC. Use of recombinant human erythropoietin for management of anemia in dogs and cats with renal failure. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212:521-528.
- CROW SE, ALLEN DP, MURPHY CJ, CULBERTSON R. Concurrent renal adenocarcinoma and polycythemia in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1995; 31:29-33.
- D'ANDREA AD, ZON LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990; 86:681-687.
- D'ANDREA AD, LODISH HF, WONG GG. Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell* 1989; 57:277-285.

- DAME C, FAHNENSTICH H, FREITAG P, HOFMANN D, ABDUL-NOUR T, BARTMANN P, FANDREY J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood* 1998; 92:3218-3225.
- DAME C, SOLA MC, LIM KC, LEACH KM, FANDREY J, MA Y et al. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* 2004; 279:2955-2961.
- DARLING RJ, KUCHIBHOTLA U, GLAESNER W, MICANOVIC R, WITCHER DR, BEALS JM. Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. *Biochemistry* 2002; 41:14524-14531.
- DAVID RB, BLOM AK, SJAASTAD OV, HARBITZ I. The porcine erythropoietin gene: cDNA sequence, genomic sequence and expression analyses in piglets. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 20:137-147.
- DAVID RB, LIM GB, MORITZ KM, KOUKOULAS I, WINTOUR EM. Quantitation of the mRNA levels of Epo and EpoR in various tissues in the ovine fetus. *Mol Cell Endocrinol* 2002a; 188:207-218.
- DAVID RB, SJAASTAD OV, BLOM AK, SKOGTVEDT S, OPSATA M, HARBITZ I. Ontogeny of erythropoietin mRNA expression in liver, kidneys and testes of the foetal and the neonatal pig. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002b; 131:527-533.
- DAVIS JM, ARAKAWA T, STRICKLAND TW, YPHANTIS DA. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 1987; 26:2633-2638.
- DE MARIA R, ZEUNER A, ERAMO A, DOMENICHELLI C, BONCI D, GRIGNANI F et al. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 1999; 401:489-493.
- DE SANTO NG, PERNA A, CIRILLO M. Low protein diets are mainstay for management of chronic kidney disease. *Front Biosci (Schol Ed)* 2011; 3:1432-1442.



- DIGICAYLIOGLU M, LIPTON SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 2001; 412:641-647.
- DIGICAYLIOGLU M, BICHET S, MARTI HH, WENGER RH, RIVAS LA, BAUER C, GASSMANN M. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:3717-3720.
- DORDAL MS, WANG FF, GOLDWASSER E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985; 116:2293-2299.
- DUBÉ S, FISHER JW, POWELL JS. Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J Biol Chem* 1988; 263:17516-17521.
- DURNO AS, WEBB JA, GAUTHIER MJ, BIENZLE D. Polycythemia and inappropriate erythropoietin concentrations in two dogs with renal T-cell lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2011; 47:122-128.
- ECKARDT KU, KURTZ A, BAUER C. Triggering of erythropoietin production by hypoxia is inhibited by respiratory and metabolic acidosis. *Am J Physiol* 1990a; 258:R678-R683.
- ECKARDT KU, DITTMER J, NEUMANN R, BAUER C, KURTZ A. Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition. *Am J Physiol* 1990b; 258:F1432-F1437.
- ECKARDT KU, LEHIR M, TAN CC, RATCLIFFE PJ, KAISLING B, KURTZ A. Renal innervation plays no role in oxygen-dependent control of erythropoietin mRNA levels. *Am J Physiol* 1992; 263:F925-F930.
- EGGENA P, WILLSEY P, JAMGOTCHIAN N, TRUCKENBROD L, HU MS, BARRETT JD et al. Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and tissue renin-angiotensin systems. *Am J Physiol* 1991; 261:E642-E646.
- EHRENREICH H, HASSELBLATT M, DEMBOWSKI C, CEPEK L, LEWCZUK P, STIEFEL M et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8:495-505.

- EHRENREICH H, DEGNER D, MELLER J, BRINES M, BÉHÉ M, HASSELBLATT M et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2004; 9:42-54.
- EHRENREICH H, WEISSENBORN K, PRANGE H, SCHNEIDER D, WEIMAR C, WARTENBERG K et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40:e647-e656.
- EL-KOMY MH, SCHMIDT RL, WIDNESS JA, VENG-PEDERSEN P. Differential pharmacokinetic analysis of in vivo erythropoietin receptor interaction with erythropoietin and continuous erythropoietin receptor activator in sheep. *Biopharm Drug Dispos* 2011; 32:276-288.
- ELLIOTT S, LORENZINI T, ASHER S, AOKI K, BRANKOW D, BUCK L et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol* 2003; 21:414-421.
- ELLIOTT S, BUSSE L, BASS MB, LU H, SAROSI I, SINCLAIR AM et al. Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* 2006; 107:1892-1895.
- ERBAYRAKTAR S, GRASSO G, SFACTERIA A, XIE QW, COLEMAN T, KREILGAARD M et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:6741-6746.
- ERSLEV A. Humoral regulation of red cell production. *Blood* 1953; 8:349-357.
- ERSLEV AJ. In vitro production of erythropoietin by kidneys perfused with a serum-free solution. *Blood* 1974; 44:77-85.
- ERSLEV AJ, CARO J, BESARAB A. Why the kidney? *Nephron* 1985; 41:213-216.
- FANDREY J, BUNN HF. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 1993; 81:617-623.

- FANDREY J, PAGEL H, FREDE S, WOLFF M, JELKMANN W. Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol* 1994; 22:272-277.
- FIORDALISO F, CHIMENTI S, STASZEWSKY L, BAI A, CARLO E, CUCCOVILLO I et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2046-2051.
- FISHER JW. Prostaglandins and kidney erythropoietin production. *Nephron* 1980; 25:53-56.
- FISHER JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228:1-14.
- FISHER JW. Landmark advances in the development of erythropoietin. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235:1398-1411.
- FISHER JW, BL ROH, S HALVORSEN. Inhibition of erythropoietic effects of hormones by erythropoietin antisera in mildly plethoric mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 1967; 126:97-100.
- FONTEQUE JH, KOHAYAGAWA A, SAITO ME, TEIXEIRA AB, WATANABE MJ, THOMASSIAN A. Efeito da idade e sexo sobre a concentração sérica de eritropoietina em equinos da raça Árabe. *Pesq Vet Bras* 2012; 32:21-24.
- FREDE S, FREITAG P, GEUTING L, KONIETZNY R, FANDREY J. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 2011; 117:4905-4914.
- FRIED W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. *Blood* 1972; 40:671-677.
- FRIED W, BARONE-VARELAS J. Regulation of the plasma erythropoietin level in hypoxic rats. *Exp Hematol* 1984; 12:706-711.
- FRIED W, C JOHNSON, P HELLER. Observations on regulation of erythropoiesis during prolonged periods of hypoxia. *Blood* 1970; 36:607-616.

- FRIED W, BARONE-VARELAS J, BERMAN M. Detection of high erythropoietin titers in renal extracts of hypoxic rats. *J Lab Clin Med* 1981; 97:82-86.
- FU JS, LERTORA JJ, BROOKINS J, RICE JC, FISHER JW. Pharmacokinetics of erythropoietin in intact and anephric dogs. *J Lab Clin Med* 1988; 111:669-676.
- FU P, EVANS B, LIM GB, MORITZ K, WINTOUR EM. The sheep erythropoietin gene: molecular cloning and effect of hemorrhage on plasma erythropoietin and renal/liver messenger RNA in adult sheep. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 93:107-116.
- FUKUDA MN, SASAKI H, LOPEZ L, FUKUDA M. Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood* 1989; 73:84-89.
- GALEANO M, ALTAVILLA D, BITTO A, MINUTOLI L, CALÒ M, LO CASCIO P et al. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med* 2006; 34:1139-1146.
- GALLAGHER NI, McCARTHY JM, HART KT, LANGE RD. Evaluation of plasma erythropoietic-stimulating factors in anemic uremic patients. *Blood* 1959; 14:662-667.
- GALSON DL, TSUCHIYA T, TENDLER DS, HUANG LE, REN Y, OGURA T, BUNN HF. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol Cell Biol* 1995; 15:2135-2144.
- GANZ T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102:783-788.
- GAVAGHAN BJ, KITTLESON MD, DECOCK H. Eisenmenger's complex in a Holstein-Friesian cow. *Aust Vet J* 2001; 79:37-40.

- GEETA. Use of human recombinant erythropoietin and nandrolone decanoate in a combination for treatment of hypoplastic anaemia in a German shepherd dog. *Veterinary Practitioner* 2011; 12:65.
- GIRGENTI MJ, HUNSBERGER J, DUMAN CH, SATHYANESAN M, TERWILLIGER R, NEWTON SS. Erythropoietin induction by electroconvulsive seizure, gene regulation, and antidepressant-like behavioral effects. *Biol Psychiatry* 2009; 66:267-274.
- GOGUSEV J, ZHU DL, HÉREMBERT T, AMMARGUELLAT F, MARCHE P, DRUEKE T. Effect of erythropoietin on DNA synthesis, proto-oncogene expression and phospholipase C activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:977-983.
- GOLD JR, WARREN AL, FRENCH TW, STOKOL T. What is your diagnosis? Biopsy impression smear of a hepatic mass in a yearling Thoroughbred filly. *Vet Clin Pathol* 2008; 37:339-343.
- GORDON AS, COOPER GW, ZANJANI ED. The kidney and erythropoiesis. *Semin Hematol* 1967; 4:337-358.
- GORSE MJ. Polycythemia associated with renal fibrosarcoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 192:793-794.
- GREGORY CJ. Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system: Studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J Cell Physiol* 1976; 89:289-301.
- GREGORY CJ, EAVES AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 1978; 51:527-537.
- GREGORY T, YU C, MA A, ORKIN SH, BLOBEL GA, WEISS MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood* 1999; 94:87-96.
- GROSS AW, LODISH HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J Biol Chem* 2006; 281:2024-2032.

- GRUBER M, HU CJ, JOHNSON RS, BROWN EJ, KEITH B, SIMON MC. Acute postnatal ablation of Hif-2alpha results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:2301-2306.
- GU YZ, MORAN SM, HOGENESCH JB, WARTMAN L, BRADFIELD CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998; 7:205-213.
- GUAN F, UBOH CE, SOMA LR, BIRKS E, CHEN J, YOU Y et al. Differentiation and identification of recombinant human erythropoietin and darbepoetin Alfa in equine plasma by LC-MS/MS for doping control. *Anal Chem* 2008; 80:3811-3817.
- HAASE VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:F1-F13.
- HARDEE ME, ARCASOY MO, BLACKWELL KL, KIRKPATRICK JP, DEWHIRST MW. Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:332-339.
- HARKIN KR, COWAN LA, ANDREWS GA, BASARABA RJ, FISCHER JR, DEBOWES LJ et al. Hepatotoxicity of stanozolol in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217:681-684.
- HARRIS CL, KRAWIEC DR. The pathophysiology of uremic bleeding. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1990; 12:1294-1296,1298.
- HASLER AH, GIGER U. Serum erythropoietin values in polycythemic cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32:294-301.
- HEESCHEN C, AICHER A, LEHMANN R, FICHTLSCHERER S, VASA M, URBICH C et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102:1340-1346.
- HOLLAND M, STOBIE D, SHAPIRO W. Pancytopenia associated with administration of captopril to a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208:1683-1686.

- Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, Willmore WG, Hradecky P, Bunn HF. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood* 2000; 96:3743-3747.
- Hsieh MM, Linde NS, Wynter A, Metzger M, Wong C, Langsetmo I et al. HIF prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood* 2007; 110:2140-2147.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996; 271:32253-32259.
- Imagawa S, Yamamoto M, Miura Y. Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors. *Blood* 1997; 89:1430-1439.
- Imai N, Kawamura A, Higuchi M, Oh-eda M, Orita T, Kawaguchi T, Ochi N. Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin. *J Biochem* 1990; 107:352-359.
- Iscove NN, Sieber F. Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol* 1975; 3:32-43.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001; 292:464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292:468-472.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985; 313:806-810.
- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 179:633-634.

- JAUSSAUD P, AUDRAN M, GAREAU RL, SOUILLARD A, CHAVANET I. Kinetics and haematological effects of erythropoietin in horses. *Vet Res* 1994; 25:568-573.
- JEFFERSON JA, ESCUDERO E, HURTADO ME, PANDO J, TAPIA R, SWENSON ER et al. Excessive erythrocytosis, chronic mountain sickness, and serum cobalt levels. *Lancet* 2002; 359:407-408.
- JELKMANN W. Temporal pattern of erythropoietin titers in kidney tissue during hypoxic hypoxia. *Pflugers Arch* 1982; 393:88-91.
- JELKMANN W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72:449-489.
- JELKMANN W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 555-559.
- JELKMANN W. Effects of erythropoietin on brain function. *Curr Pharm Biotechnol.* 2005; 6:65-79.
- JELKMANN W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. *Methods Enzymol* 2007a; 435:179-197.
- JELKMANN W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007b; 78:183-205.
- JELKMANN W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 2011; 589:1251-1258.
- JELKMANN W, BAUER C. Demonstration of high levels of erythropoietin in rat kidneys following hypoxic hypoxia. *Pflugers Arch* 1981; 392:34-39.
- JELKMANN W, SEIDL J. Dependence of erythropoietin production on blood oxygen affinity and hemoglobin concentration in rats. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46:S304-S308.
- JELKMANN W, WIEDEMANN G. Lack of sex dependence of the serum level of immunoreactive erythropoietin in chronic anemia. *Klin Wochenschr* 1989; 67:1218.
- JELKMANN W, WIEDEMANN G. Serum erythropoietin level: Relationships to blood hemoglobin concentration and erythrocytic activity of the bone marrow. *Klin Wochenschr* 1990; 68:403-407.



- JENSEN JD, MADSEN JK, JENSEN LW, PEDERSEN EB. Reduced production, absorption, and elimination of erythropoietin in uremia compared with healthy volunteers. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5:177-185.
- KAKAVAS S, DEMESTIHA T, VASILEIOU P, XANTHOS T. Erythropoetin as a novel agent with pleiotropic effects against acute lung injury. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; 67:1-9.
- KAMBE T, TADA-KAMBE J, KUGE Y, YAMAGUCHI-IWAI Y, NAGAO M, SASAKI R. Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 2000; 96:3265-3271.
- KAMPER AL, NIELSEN OJ. Effect of enalapril on haemoglobin and serum erythropoietin in patients with chronic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50:611-618.
- KAPITSINOUPP, LIU Q, UNGER TL, RHA J, DAVIDOFF O, KEITH B et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 2010; 116:3039-3048.
- KATAKURA F, KATZENBACK BA, BELOSEVIC M. Molecular and functional characterization of erythropoietin of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *Dev Comp Immunol* 2013; 40:148-157.
- KATSUOKA Y, BECKMAN B, GEORGE WJ, FISHER JW. Increased levels of erythropoietin in kidney extracts of rats treated with cobalt and hypoxia. *Am J Physiol* 1983; 244:F129-F133.
- KEARNS CF, LENHART JA, MCKEEVER KH. Cross reactivity between human erythropoietin antibody and horse erythropoietin. *Electrophoresis* 2000; 21:1454-1457.
- KESSLER M. Secondary polycythaemia associated with high plasma erythropoietin concentrations in a dog with a necrotising pyelonephritis. *J Small Anim Pract* 2008; 49:363-366
- KING LG, GIGER U, DISERENS D, NAGODE LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med* 1992; 6:264-270.

- KIRBY D, GILLICK A. Polycythemia and tetralogy of Fallot in a cat. *Can Vet J* 1974; 15: 114–119.
- KLAINBART S, SEGEV G, LOEB E, MELAMED D, AROCH I. Resolution of renal adenocarcinoma-induced secondary inappropriate polycythaemia after nephrectomy in two cats. *J Feline Med Surg* 2008; 10:264-268.
- KLING PJ, DRAGSTEN PR, ROBERTS RA, DOS SANTOS B, BROOKS DJ, HEDLUND BE, TAETLE R. Iron deprivation increases erythropoietin production in vitro, in normal subjects and patients with malignancy. *Br J Haematol* 1996; 95:241-248.
- KLINGMÜLLER U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem* 1997; 249:637-647.
- KLINGMÜLLER U, LORENZ U, CANTLEY LC, NEEL BG, LODISH HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 1995; 80:729-738.
- KLINGMÜLLER U, WU H, HSIAO JG, TOKER A, DUCKWORTH BC, CANTLEY LC, LODISH HF. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3016-3021.
- KOCH TG, WEN X, BIENZLE D. Lymphoma, erythrocytosis, and tumor erythropoietin gene expression in a horse. *J Vet Intern Med* 2006; 20:1251-1255.
- KOCIBA GJ, LANGE RD, DUNN CD, HOOVER EA. Serum erythropoietin changes in cats with feline leukemia virus-induced erythroid aplasia. *Vet Pathol* 1983; 20:548-552.
- KÖRBEL S, BITTORF T, SIEGL E, KÖLLNER B. Recombinant human erythropoietin induces proliferation and Ca<sup>2+</sup>-influx in specific leukocyte subpopulations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blood and head kidney cells. *J Comp Physiol B* 2004; 174:121-128.

- KOURY MJ, BONDURANT MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 1990; 248:378-381.
- KOURY ST, BONDURANT MC, KOURY MJ, SEMENZA GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991; 77:2497-2503.
- KRAJEWSKI J, BATMUNKH C, JELKMANN W, HELLWIG-BÜRCEL T. Interleukin-1beta inhibits the hypoxic inducibility of the erythropoietin enhancer by suppressing hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:989-998.
- KRAPF R, HULTER HN. Arterial hypertension induced by erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents (ESA). *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4:470-480.
- KRISTENSEN PL, HØI-HANSEN T, OLSEN NV, PEDERSEN-BJERGAARD U, THORSTEINSSON B. Erythropoietin during hypoglycaemia in type 1 diabetes: relation to basal renin-angiotensin system activity and cognitive function. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 85:75-84.
- KURATOWSKA Z, LEWARTOWSKI B, MICHALAK E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 1961; 18:527-534.
- LA FERLA K, REIMANN C, JELKMANN W, HELLWIG-BÜRCEL T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF-kappaB. *FASEB J* 2002; 16:1811-1813.
- LAI PH, EVERETT R, WANG FF, ARAKAWA T, GOLDWASSER E. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1986; 261:3116-3121.
- LANGSTON CE, REINE NJ, KITTRELL D. The use of erythropoietin. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:1245-1260.
- LE MINH K, KLEMM K, ABSHAGEN K, EIPEL C, MENGER MD, VOLLMAR B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of

darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007; 170:1954-1963.

- LEBEL M, LACASSE-M S, LARIVIÈRE R, KINGMA I, GROSE JH. Plasma and blood vessel endothelin-1 concentrations in hypertensive uremic rats treated with erythropoietin. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20:939-951.
- LEBEL M, RODRIGUE ME, AGHARAZII M, LARIVIÈRE R. Antihypertensive and renal protective effects of renin-angiotensin system blockade in uremic rats treated with erythropoietin. *Am J Hypertens* 2006; 19:1286-1292.
- LECHERMANN B, JELKMANN W. Erythropoietin production in normoxic and hypoxic rats with increased blood O<sub>2</sub> affinity. *Respir Physiol* 1985; 60:1-8.
- LEIST M, GHEZZI P, GRASSO G, BIANCHI R, VILLA P, FRATELLI M et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305:239-242.
- LENNOX TJ, WILSON JH, HAYDEN DW, BOULJIHAD M, SAGE AM, WALSER MM, MANIVEL JC. Hepatoblastoma with erythrocytosis in a young female horse. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216:718-721, 685.
- LEZÓN C, ALIPPI RM, BARCELÓ AC, MARTÍNEZ MP, CONTI MI, BOZZINI CE. Depression of stimulated erythropoietin production in mice with enhanced erythropoiesis. *Haematologica* 1995; 80:491-494.
- LIM GB, JEYASEELAN K, WINTOUR EM. Ontogeny of erythropoietin gene expression in the sheep fetus: effect of dexamethasone at 60 days of gestation. *Blood* 1994; 84:460-466.
- LIN FK, SUGGS S, LIN CH, BROWNE JK, SMALLING R, EGRIE JC et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:7580-7584.
- LIN FK, LIN CH, LAI PH, BROWNE JK, EGRIE JC, SMALLING R et al. Monkey erythropoietin gene: cloning, expression and comparison with the human erythropoietin gene. *Gene* 1986; 44:201-209.

- LIVNAH O, STURA EA, MIDDLETON SA, JOHNSON DL, JOLLIFFE LK, WILSON IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 1999; 283:987-990.
- LOK CN, PONKA P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274:24147-24152.
- LÖNNBERG M, BONDESSON U, CORMANT F, GARCIA P, BONNAIRE Y, CARLSSON J et al. Detection of recombinant human EPO administered to horses using MAIIA lateral flow isoform test. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403:1619-1628.
- LUGER D, SHINDER D, WOLFENSON D, YAHAV S. Erythropoiesis regulation during the development of ascites syndrome in broiler chickens: a possible role of corticosterone. *J Anim Sci* 2003; 81:784-790.
- LUNDBY C, THOMSEN JJ, BOUSHEL R, KOSKOLOU M, WARBERG J, CALBET JA, ROBACH P. Erythropoietin treatment elevates haemoglobin concentration by increasing red cell volume and depressing plasma volume. *J Physiol* 2007; 578:309-314.
- MACDOUGALL IC. Darbepoetin alfa: A new therapeutic agent for renal anemia. *Kidney Int* 2002; 61: S55–S61.
- MACLEOD JN, TETREAUULT JW, LORSCHY KA, GU DN. Expression and bioactivity of recombinant canine erythropoietin. *Am J Vet Res* 1998; 59:1144-1148.
- MAKITA T, HERNANDEZ-HOYOS G, CHEN TH, WU H, ROTHENBERG EV, SUCOV HM. A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev* 2001. 15:889-901.
- MAKITA T, DUNCAN SA, SUCOV HM. Retinoic acid, hypoxia, and GATA factors cooperatively control the onset of fetal liver erythropoietin expression and erythropoietic differentiation. *Dev Biol* 2005; 280:59-72.
- MARTI HH, WENGER RH, RIVAS LA, STRAUMANN U, DIGICAYLIOGLU M, HENN V et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996; 8:666-676.

- MARTI HH, GASSMANN M, WENGER RH, KVIETIKOVA I, MORGANTI-KOSSMANN MC, KOSSMANN T et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 1997; 51:416-418.
- MARTINHO F. Blood transfusion in birds. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* 2012; 5: 1-30.
- MARXSEN JH, STENGEL P, DOEGE K, HEIKKINEN P, JOKILEHTO T, WAGNER T et al. Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 2004; 381:761-767.
- MASUDA S, OKANO M, YAMAGISHI K, NAGAO M, UEDA M, SASAKI R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:19488-19493.
- MAXWELL PH, FERGUSON DJ, OSMOND MK, PUGH CW, HERYET A, DOE BG et al. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* 1994; 84:1823-1830.
- MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, CLIFFORD SC, VAUX EC, COCKMAN ME et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399:271-275.
- MCDONALD TP, COTTRELL MB, CLIFT RE, CULLEN WC, LIN FK. High doses of recombinant erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Exp Hematol* 1987; 15:719-721.
- MCFARLANE D, SELLON DC, PARKER B. Primary erythrocytosis in a 2-year-old Arabian gelding. *J Vet Intern Med* 1998; 12:384-388.
- MCKEEVER KH. Endocrine alterations in the equine athlete: an update. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27:197-218.
- MCKEEVER KH, AGANS JM, GEISER S, LORIMER PJ, MAYLIN GA. Low dose exogenous erythropoietin elicits an ergogenic effect in standardbred horses. *Equine Vet J Suppl* 2006; 233-238.

- MCKEEVER KH, WICKLER SJ, SMITH TR, POOLE DC. Effects of high altitude and exercise on plasma erythropoietin in equids. *Comp Exerc Phys* 2010; 7:193-199.
- MILLER ME, HOWARD D. Modulation of erythropoietin concentrations by manipulation of hypercarbia. *Blood Cells* 1979; 5:389-403.
- MILLER ME, RORTH M, PARVING HH, HOWARD D, REDDINGTON I, VALERI CR, STOHLMAN F JR. pH effect on erythropoietin response to hypoxia. *N Engl J Med* 1973; 288:706-710.
- MILLER ME, RÖRTH M, STOHLMAN F JR, VALERI CR, LOWRIE G, HOWARD D, MCGILVRAY N. The effects of acute bleeding on acid-base balance, erythropoietin (Ep) production and in vivo P50 in the rat. *Br J Haematol* 1976; 33:379-385.
- MINAMISHIMA YA, MOSLEHI J, BARDEESY N, CULLEN D, BRONSON RT, KAELIN WG JR. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 2008; 111:3236-3244.
- MISAGO M, CHIBA S, KIKUCHI M, TSUKADA J, SUZUKI H. Effect of absolute and relative changes of hematocrit on erythropoiesis in mice. *Int J Cell Cloning* 1986; 4:320-330.
- MIYAKE T, KUNG CK, GOLDWASSER E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252:5558-5564.
- MIZOGUCHI H, LEVERE RD. Enhancement of heme and globin synthesis in cultured human marrow by certain 5 -H steroid metabolites. *J Exp Med* 1971; 134:1501-1512.
- MLADENOVIC J, ESCHBACH JW, KOUP JR, GARCIA JF, ADAMSON JW. Erythropoietin kinetics in normal and uremic sheep. *J Lab Clin Med* 1985; 105:659-663.
- MOORE KW, STEPIEN RL. Hydroxyurea for treatment of polycythemia secondary to right-to-left shunting patent ductus arteriosus in 4 dogs. *J Vet Intern Med* 2001; 15:418-421.

- MORAKKABATI N, GOLLNICK F, MEYER R, FANDREY J, JELKMANN W. Erythropoietin induces Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* 1996; 24:392-397.
- MORISHITA E, MASUDA S, NAGAO M, YASUDA Y, SASAKI R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76:105-116.
- MORITZ KM, LIM GB, WINTOUR EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997; 273:R1829-R1844.
- MULCAHY L. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol* 2001; 28:19-23.
- NAGASAKI K. Development of drug delivery system for erythropoietin as having sustained efficacy with a hydroxyapatite carrier. *Jpn J Vet Res* 2010; 57:213-214.
- NAGASAKI K, IKOMA T, KATSUDA S, TONEGAWA T, TANAKA J, NAKAMURA T et al. Sustained efficacy of erythropoietin with a hydroxyapatite carrier administered in mice. *J Vet Med Sci* 2009; 71:729-736.
- NAPIER JA. Effect of age and 2,3-DPG content of transfused blood on serum erythropoietin. *Vox Sang* 1980; 39:318-321.
- NEUSSER M, TEPEL M, ZIDEK W. Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1233-1236.
- NICOLAS G, CHAUVET C, VIATTE L, DANAN JL, BIGARD X, DEVAUX I et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002; 110:1037-1044.
- NISHIYA D, OMURA T, SHIMADA K, MATSUMOTO R, KUSUYAMA T, ENOMOTO S et al. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 2006; 101:31-39.
- NOGAWA-KOSAKA N, HIROSE T, KOSAKA N, AIZAWA Y, NAGASAWA K, UEHARA N et al. Structural and biological properties of erythropoietin in *Xenopus laevis*. *Exp Hematol* 2010; 38:363-372.



- NOGUCHI CT, ASAVARITIKRAI P, TENG R, JIA Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64:159-171.
- NOH S, JH KANG, G KIM, D CHANG, B AHN, KJ NA, MP YANG. Renal-adenocarcinoma-associated erythrocytosis in a cat. *Pak Vet J* 2013; 33:125-127.
- OBARA N, SUZUKI N, KIM K, NAGASAWA T, IMAGAWA S, YAMAMOTO M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood* 2008; 111:5223-5232.
- OKANO M, MASUDA S, NARITA H, MASUSHIGE S, KATO S, IMAGAWA S, SASAKI R. Retinoic acid up-regulates erythropoietin production in hepatoma cells and in vitamin A-depleted rats. *FEBS Lett* 1994; 349:229-233.
- OSTERBORG A, AAPRO M, CORNES P, HASELBECK A, HAYWARD CR, JELKMANN W. Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumour cells: impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anaemia. *Eur J Cancer* 2007; 43:510-519.
- PAFFETT-LUGASSY N, HSIA N, FRAENKEL PG, PAW B, LESHINSKY I, BARUT B et al. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish. *Blood* 2007; 110:2718-2726.
- PAGE RL, STIFF ME, MCENTEE MC, WALTER LG. Transient glomerulonephropathy associated with primary erythrocytosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196:620-622.
- PAGEL H, JELKMANN W, WEISS C. O<sub>2</sub>-supply to the kidneys and the production of erythropoietin. *Respir Physiol* 1989; 77:111-117.
- PALIEGE A, ROSENBERGER C, BONDKE A, SCIESIELSKI L, SHINA A, HEYMAN SN et al. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* 2010; 77:312-318.
- PARSA CJ, KIM J, RIEL RU, PASCAL LS, THOMPSON RB, PETROFSKI JA et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic

heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279:20655-20662.

- PASCUAL M, BOHLE B, ALONSO S, MAYOL X, SALVANS S, GRANDE L, PERA M. Preoperative administration of erythropoietin stimulates tumor recurrence after surgical excision of colon cancer in mice by a vascular endothelial growth factor-independent mechanism. *J Surg Res* 2013; 183:270-277.
- PATEL NS, SHARPLES EJ, CUZZOCREA S, CHATTERJEE PK, BRITTI D, YAQOOB MM, THIEMERMANN C. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004; 66:983-989.
- PAULO LG, FINK GD, ROH BL, FISHER JW. Enhancement of the erythropoietic response of cats to hypoxia following removal of the carotid body. *Exp Biol Med (Maywood)* 1972; 141:806-808.
- PAUS R, BODÓ E, KROMMINGA A, JELKMANN W. Erythropoietin and the skin: a role for epidermal oxygen sensing? *Bioessays* 2009; 31:344-348.
- PEARSON PL, SMITH TP, SONSTEGARD TS, KLEMCKE HG, CHRISTENSON RK, VALLET JL. Porcine erythropoietin receptor: molecular cloning and expression in embryonic and fetal liver. *Domest Anim Endocrinol* 2000; 19:25-38.
- PECHEREAU D, MARTEL P, BRAUN JP. Plasma erythropoietin concentrations in dogs and cats: reference values and changes with anaemia and/or chronic renal failure. *Res Vet Sci* 1997; 62:185-188.
- PERCY MJ, ZHAO Q, FLORES A, HARRISON C, LAPPIN TR, MAXWELL PH et al. A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:654-659.
- PESCHLE C, RAPPAPORT IA, SASSO GF, CONDORELLI M, GORDON AS. The role of estrogen in the regulation of erythropoietin production. *Endocrinology* 1973; 92:358-362.

- PEYSSONNAUX C, ZINKERNAGEL AS, SCHUEPBACH RA, RANKIN E, VAULONT S, HAASE VH et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007; 117:1926-1932.
- PIERCY RJ, SWARDSON CJ, HINCHCLIFF KW. Erythroid hypoplasia and anemia following administration of recombinant human erythropoietin to two horses. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212:244–247.
- POLZIN DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2011; 41:15–30.
- POWELL JS, BERKNER KL, LEBO RV, ADAMSON JW. Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:6465-6469.
- PRCHAL JF, PRCHAL JT. Molecular basis for polycythemia. *Curr Opin Hematol* 1999; 6:100-109.
- RAINE AE. Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of erythropoietin therapy. *Lancet* 1988; 1:97-100.
- RANDOLPH JF, STOKOL T, SCARLETT JM, MACLEOD JN. Comparison of biological activity and safety of recombinant canine erythropoietin with that of recombinant human erythropoietin in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 1999; 60:636-642.
- RANDOLPH JE, SCARLETT J, STOKOL T, MACLEOD JN. Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *J Vet Intern Med* 2004a; 18:81-91.
- RANDOLPH JE, SCARLETT JM, STOKOL T, SAUNDERS KM, MACLEOD JN. Expression, bioactivity, and clinical assessment of recombinant feline erythropoietin. *Am J Vet Res* 2004b; 65:1355-1366.
- RANKIN EB, BIJU MP, LIU Q, UNGER TL, RHA J, JOHNSON RS et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 2007; 117:1068-1077.

- RECN Y MA, SCOBLE HA, KIM Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem* 1987; 262:17156-17163.
- REISSMANN KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 1950; 5:372-380.
- REMY I, WILSON IA, MICHNICK SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* 1999; 283:990-993.
- RIBATTI D. Angiogenic effects of erythropoietin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 299:199-234.
- ROBY KA, BEECH J, BLOOM JC, BLACK M. Hepatocellular carcinoma associated with erythrocytosis and hypoglycemia in a yearling filly. *J Am Vet Med Assoc* 1990; 196:465-467.
- RODRIGUE ME, MOREAU C, LARIVIÈRE R, LEBEL M. Relationship between eicosanoids and endothelin-1 in the pathogenesis of erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41:388-395.
- ROLFS A, KVIETIKOVA I, GASSMANN M, WENGER RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; 272:20055-20062.
- ROSSE WF, WALDMANN TA. Factors controlling erythropoiesis in birds. *Blood* 1966; 27:654-661.
- ROSSE WF, WALDMANN T, HULL E. Factors stimulating erythropoiesis in frogs. *Blood* 1963; 22:66-72.
- RUIFROK WP, DE BOER RA, WESTENBRINK BD, VAN VELDHUISEN DJ, VAN GILST WH. Erythropoietin in cardiac disease: new features of an old drug. *Eur J Pharmacol* 2008; 585:270-277.
- SAGONE AL, LAWRENCE T, BALCERZAK SP. Effect of smoking on tissue oxygen supply. *Blood* 1973; 41:845-851.
- SAKANAKA M, WEN TC, MATSUDA S, MASUDA S, MORISHITA E, NAGAO M, SASAKI R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4635-4640.

- SALCEDA S, CARO J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997; 272:22642-22647.
- SAMSON D. The anaemia of chronic disorders. *Postgrad Med J* 1983; 59: 543–550.
- SARGIN D, FRIEDRICHS H, EL-KORDI A, EHRENREICH H. Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2010; 24:573-594.
- SASAKI H, BOTHNER B, DELL A, FUKUDA M. Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol Chem* 1987; 262:12059-12076.
- SATO K, HIKASA Y, MORITA T, SHIMADA A, OZAKI K, KAGOTA K. Secondary erythrocytosis associated with high plasma erythropoietin concentrations in a dog with cecal leiomyosarcoma. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220:486-490, 464.
- SAWADA K, KRANTZ SB, DAI CH, KOURY ST, HORN ST, GLICK AD, CIVIN CI. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 1990; 142:219-230.
- SCARTH JP, SEIBERT C, BROWN PR, TEALE P, BEAMON GJ, PEARCE CM, SAMS RA. UPLC-MS/MS Method for the Identification of Recombinant Human Erythropoietin Analogues in Horse Plasma and Urine. *Chromatographia* 2011. 74:593-608.
- SCHMEDING M, BOAS-KNOOP S, LIPPERT S, RUEHL M, SOMASUNDARAM R, DAGDELEN T et al. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23:1125-1131.
- SCHMEDING M, HUNOLD G, ARIYAKHAGORN V, RADEMACHER S, BOAS-KNOOP S, LIPPERT S et al. Erythropoietin reduces ischemia-

reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int* 2009; 22:738-746.

- SCHMID R, GILBERSTSEN AS. Fundamental observations on the production of compensatory polycythemia in a case of patent ductus arteriosus with reversed blood flow. *Blood* 1955; 10:247-251.
- SCHUSTER SJ, WILSON JH, ERSLEV AJ, CARO J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987; 70:316-318.
- SCHUSTER SJ, KOURY ST, BOHRER M, SALCEDA S, CARO J. Cellular sites of extrarenal and renal erythropoietin production in anaemic rats. *Br J Haematol* 1992; 81:153-159.
- SCORTEGAGNA M, DING K, ZHANG Q, OKTAY Y, BENNETT MJ, BENNETT M et al. HIF-2alpha regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 2005; 105:3133-3140.
- SEFERYNSKA I, BROOKINS J, RICE JC, FISHER JW. Erythropoietin production in exhypoxic polycythemic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 1989; 256:C925-C929.
- SEMENZA GL, WANG GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5447-5454.
- SEMENZA GL, KOURY ST, NEJFELT MK, GEARHART JD, ANTONARAKIS SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991a; 88:8725-8729.
- SEMENZA GL, NEJFELT MK, CHI SM, ANTONARAKIS SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991b; 88:5680-5684.
- SEPODES B, MAIO R, PINTO R, SHARPLES E, OLIVEIRA P, MCDONALD M et al. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 2006; 19:919-926.

- SFACTERIA A, MAZZULLO G, BERTANI C, CALABRÒ P, DE VICO G, MACRÌ B. Erythropoietin receptor expression in canine mammary tumor: an immunohistochemical study. *Vet Pathol* 2005; 42:837-840.
- SHAH YM, MATSUBARA T, ITO S, YIM SH, GONZALEZ FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab* 2009; 9:152-164.
- SHARPLES EJ, PATEL N, BROWN P, STEWART K, MOTA-PHILIPPE H, SHEAFF M et al. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2115-2124.
- SHIMIZU S, SAKATA S, ENOKI Y, OHGA Y, OKI I, KOHZUKI H. Temporal changes of plasma erythropoietin level in hypobaric hypoxic mice and the influence of an altered blood oxygen affinity. *Jpn J Physiol* 1989; 39:833-846.
- SHOEMAKER CB, MITSOCK LD. Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology. *Mol Cell Biol* 1986; 6:849-858.
- SINGH AK, SZCZECHE L, TANG KL, BARNHART H, SAPP S, WOLFSON M et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355:2085-2098.
- SOLIZ J, JOSEPH V, SOULAGE C, BECSKEI C, VOGEL J, PEQUIGNOT JM et al. Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *J Physiol* 2005; 568:559-571.
- SOLIZ J, THOMSEN JJ, SOULAGE C, LUNDBY C, GASSMANN M. Sex-dependent regulation of hypoxic ventilation in mice and humans is mediated by erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296:R1837-R1846.
- SOSA I, CRUZ J, SANTANA J, MENGANA Y, GARCÍA-SALMAN JD, MUÑOZ A et al. Paso de la molécula de eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico al sistema nervioso central por la vía intranasal en los modelos del Meriones unguiculatus y el primate no humano *Macaca fascicularis*. *Rev Salud Anim* 2008; 30:39-44.

- SPIVAK JL, HOGANS BB. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* 1989; 73:90-99.
- STIEHL DP, WIRTHNER R, KÖDITZ J, SPIELMANN P, CAMENISCH G, WENGER RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 2006; 281:23482-23491.
- STOHLMAN F Jr, RATH CE, ROSE JC. Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis; studies on a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia. *Blood* 1954; 9:721-733.
- STOPKA T, ZIVNY JH, STOPKOVA P, PRCHAL JF, PRCHAL JT. Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. *Blood* 1998; 91:3766-3772.
- SUGAWA M, SAKURAI Y, ISHIKAWA-IEDA Y, SUZUKI H, ASOU H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res* 2002; 44:391-403.
- SULIMAN HB, MAJIWA PA, FELDMAN BF, MERTENS B, LOGAN-HENFREY L. Cloning of a cDNA encoding bovine erythropoietin and analysis of its transcription in selected tissues. *Gene* 1996; 171:275-280.
- SUZUKI K. Use of recombinant human erythropoietin as adjuvant therapy for blood banking for autotransfusion in dogs. *Vet J* 1998; 155:239-244.
- SUZUKI N, OHNEDA O, TAKAHASHI S, HIGUCHI M, MUKAI HY, NAKAHATA T et al. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood* 2002; 100:2279-2288.
- SUZUKI N, SUWABE N, OHNEDA O, OBARA N, IMAGAWA S, PAN X et al. Identification and characterization of 2 types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. *Blood* 2003; 102:3575-3583.
- SZENAJCH J, WCISLO G, JEONG JY, SZCZYLIK C, FELDMAN L. The role of erythropoietin and its receptor in growth, survival and therapeutic response of human tumor cells From clinic to bench - a critical review. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806:82-95.



- TAKAGI M, TAKAGAKI K, KAMIMURA S, ZIZHOHARA K, MIYOSHI A, YASUDA Y et al. Primary erythrocytosis in a Japanese black calf: a case report. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2006; 53:296-299.
- TAKEDA K, AGUILA HL, PARIKH NS, LI X, LAMOTHE K, DUAN LJ et al. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood* 2008; 111:3229-3235.
- TAN CC, ECKARDT KU, RATCLIFFE PJ. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int* 1991; 40:69-76.
- TAN CC, ECKARDT KU, FIRTH JD, RATCLIFFE PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 1992; 263:F474-F481.
- TIAN H, MCKNIGHT SL, RUSSELL DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11:72-82.
- TILLING L, CLAPP B. Erythropoietin: a future therapy for failing hearts? *Heart Fail Rev* 2012; 17:475-483.
- TOBA H, MORISHITA M, TOJO C, NAKANO A, OSHIMA Y, KOJIMA Y et al. Recombinant human erythropoietin ameliorated endothelial dysfunction and macrophage infiltration by increasing nitric oxide in hypertensive 5/6 nephrectomized rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2011; 656:81-87.
- TÓVÁRI J, PIRKER R, TÍMÁR J, OSTOROS G, KOVÁCS G, DÖME B. Erythropoietin in cancer: an update. *Curr Mol Med* 2008; 8:481-491.
- TSAI PT, OHAB JJ, KERTESZ N, GROSZER M, MATTER C, GAO J et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006; 26:1269-1274.
- UDUPA KB, CRABTREE HM, LIPSCHITZ DA. In vitro culture of proerythroblasts: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. *Br J Haematol* 1986; 62:705-714.
- UENO M, BROOKINS J, BECKMAN B, FISHER JW. A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production. *Life Sci* 1988; 43:229-237.

- UMEMURA T, PAPAYANNOPOULOU T, STAMATOYANNOPOULOS G. The mechanism of expansion of late erythroid progenitors during erythroid regeneration: target cells and effects of erythropoietin and interleukin-3. *Blood* 1989; 73:1993-1998.
- VAN VONDEREN IK, MEYER HP, KRAUS JS, KOOISTRA HS. Polyuria and polydipsia and disturbed vasopressin release in 2 dogs with secondary polycythemia. *J Vet Intern Med* 1997; 11:300-303.
- VAZIRI ND. Cardiovascular effects of erythropoietin and anemia correction. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:633-637.
- VAZIRI ND, ZHOU XJ, LIAO SY. Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol* 1994; 266:F360-F366.
- VAZIRI ND, ZHOU XJ, NAQVI F, SMITH J, OVEISI F, WANG ZQ, PURDY RE. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 1996; 271:E113-E122.
- VELLY L, PELLEGRINI L, GUILLET B, BRUDER N, PISANO P. Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? *Pharmacol Ther* 2010; 128:445-459.
- VERDIER F, WALRAFEN P, HUBERT N, CHRETIEN S, GISSELBRECHT S, LACOMBE C, MAYEUX P. Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. *J Biol Chem* 2000; 275:18375-18381.
- VLAHAKOS DV, MARATHIAS KP, MADIAS NE. The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. *Am J Kidney Dis* 2010; 56:558-565.
- VON WUSSOW U, KLAUS J, PAGEL H. Is the renal production of erythropoietin controlled by the brain stem? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E82-E86.
- WANG GL, SEMENZA GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:4304-4308.

- WANG GL, SEMENZA GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270:1230-1237.
- WANG GL, B H JIANG, E A RUE, G L SEMENZA. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5510–5514.
- WANG F, ZHANG R, WU X, HANKINSON O. Roles of coactivators in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *PLoS One* 2010a; 5:e10002.
- WANG YJ, HAO SJ, LIU YD, HU T, ZHANG GF, ZHANG X et al. PEGylation markedly enhances the in vivo potency of recombinant human non-glycosylated erythropoietin: a comparison with glycosylated erythropoietin. *J Control Release* 2010b; 145:306-313.
- WARDROP KJ, KRAMER JW, ABKOWITZ JL, CLEMONS G, ADAMSON JW. Quantitative studies of erythropoiesis in the clinically normal, phlebotomized, and feline leukemia virus-infected cat. *Am J Vet Res* 1986; 47:2274-2277.
- WARNECKE C, ZABOROWSKA Z, KURRECK J, ERDMANN VA, FREI U, WIESENER M, ECKARDT KU. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 $\alpha$  target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004; 18:1462-1464.
- WATSON ADJ, MOORE AS, HELFAND SC. Primary erythrocytosis in the cat: Treatment with hydroxyurea. *J Small Anim Pract* 1994; 35:320-325.
- WEIDEMANN A, KERDILES YM, KNAUP KX, RAFIE CA, BOUTIN AT, STOCKMANN C et al. The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119:3373-3383.
- WEISS DJ. New insights into the physiology and treatment of acquired myelodysplastic syndromes and aplastic pancytopenia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33:1317-1334.
- WEN D, BOISSEL JP, TRACY TE, GRUNINGER RH, MULCAHY LS, CZELUSNIAK J et al. Erythropoietin structure-function relationships: high

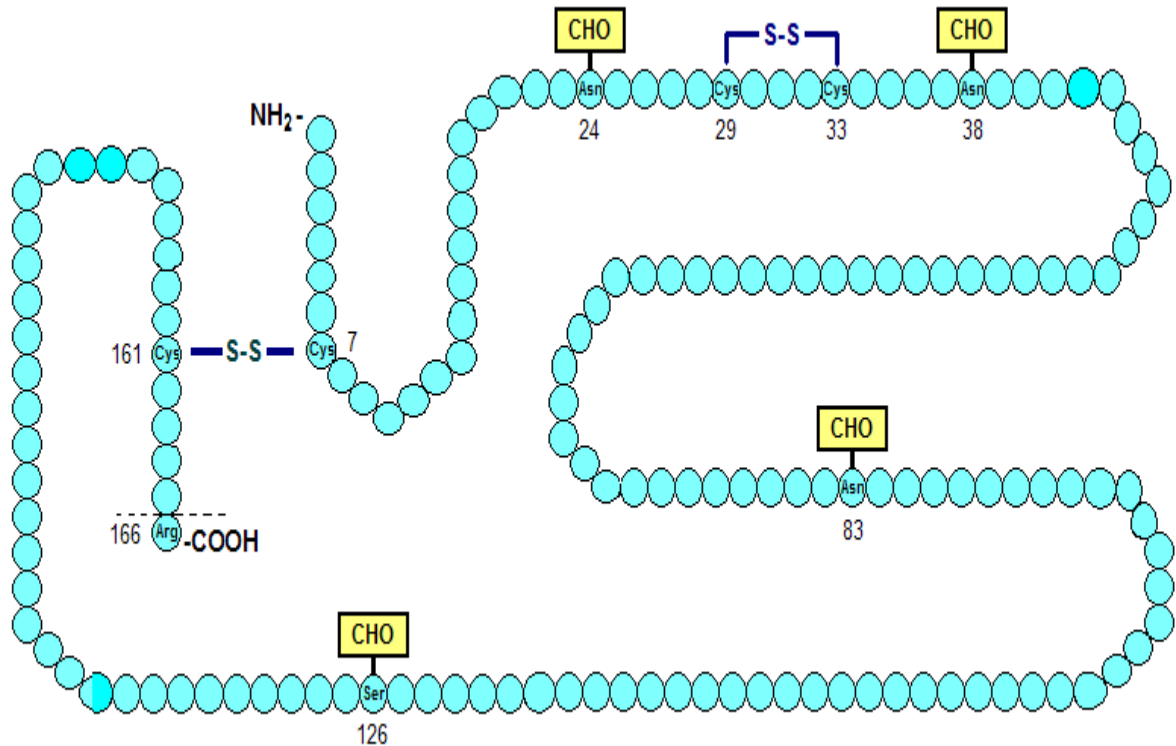
degree of sequence homology among mammals. *Blood* 1993; 82:1507-1516.

- WEN D, BOISSEL JP, SHOWERS M, RUCH BC, BUNN HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 1994; 269:22839-22846.
- WENGER RH, STIEHL DP, CAMENISCH G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005; 2005:re12.
- WESTENFELDER C, BARANOWSKI RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000; 58:647-657.
- WHITE JR, HARRIS RA, LEE SR, CRAIGON MH, BINLEY K, PRICE T et al. Genetic amplification of the transcriptional response to hypoxia as a novel means of identifying regulators of angiogenesis. *Genomics* 2004; 83:1-8.
- WICKRAMASINGHE SN. Erythropoietin and the human kidney: evidence for an evolutionary link from studies of *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1993; 104:63-65.
- WIESENER MS, JÜRGENSEN JS, ROSENBERGER C, SCHOLZE CK, HÖRSTRUP JH, WARNECKE C et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003; 17:271-273.
- WITTHUHN BA, QUELLE FW, SILVENNOINEN O, YI T, TANG B, MIURA O, IHLE JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993; 74:227-236.
- WOJCHOWSKI DM, GREGORY RC, MILLER CP, PANDIT AK, PIRCHER TJ. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 1999; 253:143-156.
- WU H, LIU X, JAENISCH R, LODISH HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995; 83:59-67.

- WU H, LEE SH, GAO J, LIU X, IRUELA-ARISPE ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999; 126:3597-3605.
- XIONG T, QU Y, MU D, FERRIERO D. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29:583-591.
- YAMAJI R, OKADA T, MORIYA M, NAITO M, TSURUO T, MIYATAKE K, NAKANO Y. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem* 1996; 239:494-500.
- YAMAUCHI A, OHTA T, OKADA T, MOCHIZUKI M, NISHIMURA R, MATSUNAGA S et al. Secondary erythrocytosis associated with schwannoma in a dog. *J Vet Med Sci* 2004; 66:1605-1608.
- YANG CW, LI C, JUNG JY, SHIN SJ, CHOI BS, LIM SW et al. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 2003; 17:1754-1755.
- YASUDA Y, MASUDA S, CHIKUMA M, INOUE K, NAGAO M, SASAKI R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273:25381-25387.
- YAZIHAN N, ATAOGU H, KOKU N, ERDEMLI E, SARGIN AK. Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats. *World J Urol* 2007; 25:531-536.
- YERGEAU DA, SCHMERER M, KULIYEV E, EVANS T, MEAD PE. Cloning and expression pattern of the *Xenopus* erythropoietin receptor. *Gene Expr Patterns* 2006; 6:420-425.
- YOSHIMURA A, ARAI K. Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist* 1996; 1:337-339.
- YOSHIMURA A, MISAWA H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol* 1998; 5:171-176.
- ZANJANI ED, POSTER J, BURLINGTON H, MANN LI, WASSERMAN LR. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med* 1977; 89:640-644.

- ZUCALI JR, LEE M, MIRAND EA. Carbon dioxide effects on erythropoietin and erythropoiesis. J Lab Clin Med 1978; 92:648-655.

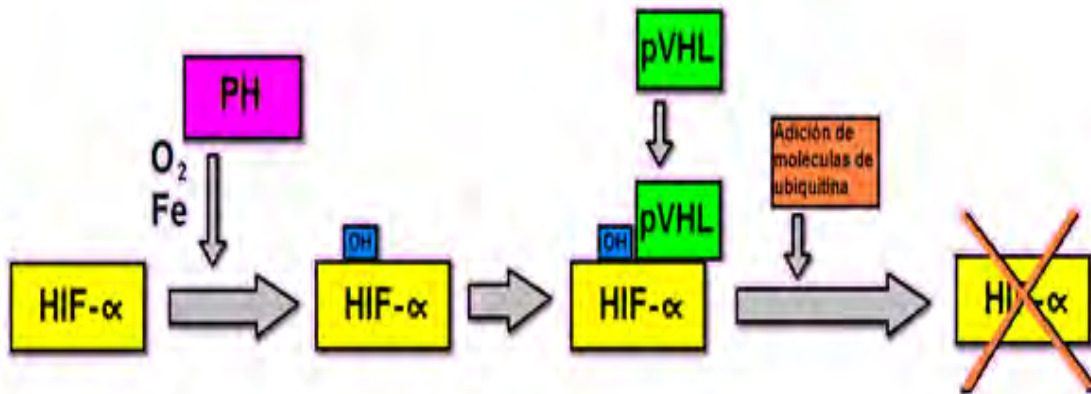
## FIGURAS



**Figura 1. Estructura primaria de la eritropoyetina humana.**

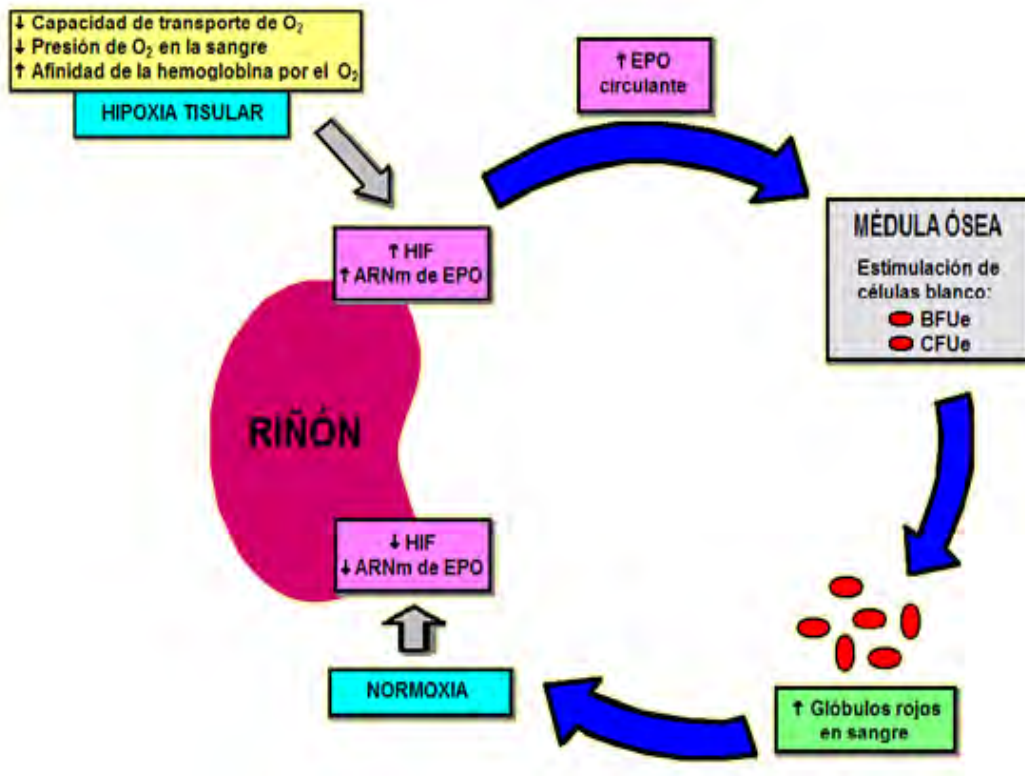
Los números indican la posición de los residuos de aminoácidos y los cuadros amarillos [CHO] representan cadenas de oligosacáridos. La eritropoyetina circulante es una glucoproteína de 165 residuos de aminoácidos que presenta dos puentes disulfuro: uno entre Cys 7 y Cys 161, y otro entre Cys 29 y Cys 33. La porción de carbohidratos consiste en tres N-glicosilaciones (Asn 24, 38 y 83) y una O-glicosilación (Ser 126).





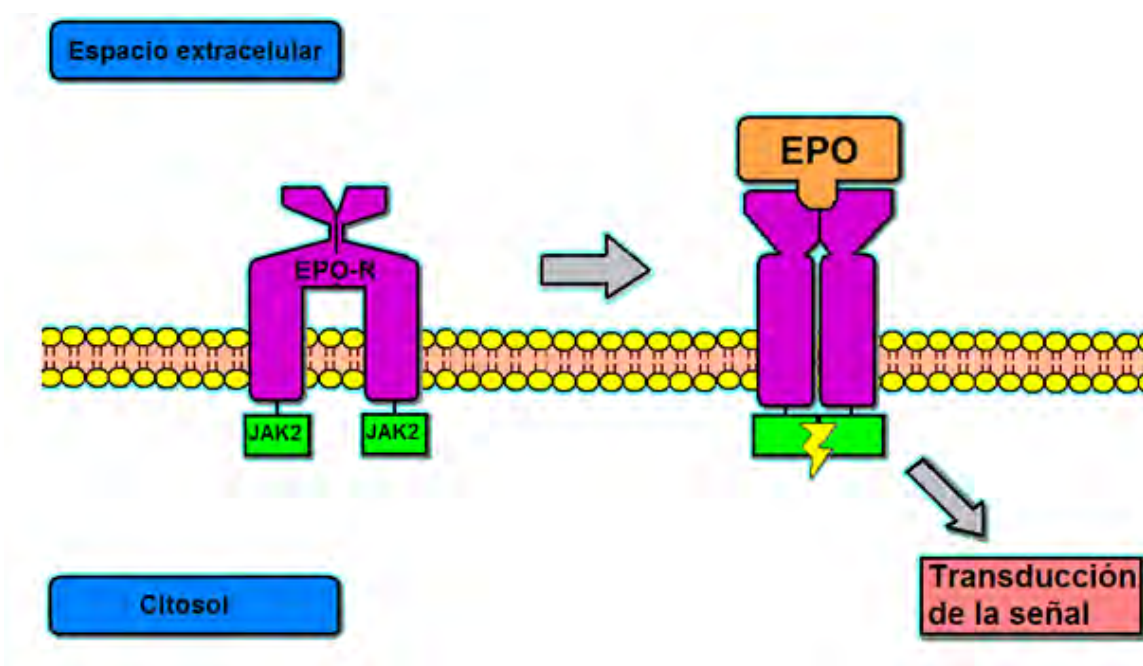
**Figura 2. Degradación de la subunidad alfa del factor inducido por hipoxia (HIF- $\alpha$ ) en presencia de oxígeno.**

El HIF- $\alpha$  es hidroxilado por acción de una enzima prolil-hidroxilasa (PH) mediante una reacción dependiente de O<sub>2</sub>. Esta reacción permite la interacción con la proteína supresora de tumores del síndrome de von Hippel-Lindau (pVHL), lo que genera que la subunidad HIF- $\alpha$  sea poliubiquitinada. El resultado final es la degradación del HIF- $\alpha$ .



**Figura 3. La participación de la eritropoyetina en la respuesta a la hipoxia tisular.**

La producción de eritropoyetina en los riñones es estimulada por la hipoxia tisular. Esta hormona actúa en la médula ósea inhibiendo la apoptosis de los progenitores eritroides (llamados BFU-E y CFU-E). Como resultado, la concentración de glóbulos rojos en la sangre aumenta, lo que favorece la corrección de la hipoxia tisular.



**Figura 4. Activación del receptor de la eritropoyetina.**

El receptor de la eritropoyetina (EPO-R) es un homodímero. En ausencia de ligando, sus dominios intracelulares se encuentran demasiado separados para permitir la activación de JAK2. La unión con la eritropoyetina induce un cambio conformacional en el EPO-R que aproxima a ambos monómeros y permite la fosforilación de JAK2. En consecuencia, se desencadena la cascada de transducción de la señal.

**CUADROS**

Cuadro 1

## CONDICIONES ASOCIADAS CON AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA (EPO)

Condición	Especie	Variable que se encontró incrementada	Ref.
Hemorragia	Ovinos	EPO circulante ARNm de EPO en riñones e hígado	Fu et al. 1993
	Ratones	ARNm de EPO en riñones e hígado	Bondurant y Koury, 1986
	Ratas	ARNm de EPO en riñones EPO circulante	Beru et al. 1986
En relación con una baja capacidad de transporte de oxígeno	Ratones	Número de progenitores eritroides en la médula ósea Número de reticulocitos periféricos	Misago et al. 1986
	Ratas	EPO circulante	Jelkmann y Seidl, 1987
	Perros y gatos	EPO circulante	Pechereau et al. 1997
	Ratas	EPO circulante	Jelkmann y Seidl, 1987
	Humanos (fumadores)	Masa de glóbulos rojos Hemoglobina Hematocrito Recuento de glóbulos rojos	Sagone et al. 1973
En relación con una baja presión arterial de oxígeno	Humanos	EPO circulante	Abbrecht y Littell, 1972
	Ratones	EPO circulante	Abbrecht y Littell, 1972
	Caballos	EPO circulante	McKeever et al. 2010
	Ratones	EPO circulante	Seferynska et al. 1989
	Ratas	EPO en riñones ARNm de EPO en riñones EPO circulante	Jelkmann y Bauer, 1981, Schuster et al. 1987 Schuster et al. 1987
Eliminación de los cuerpos carotídeos + exposición a la hipoxia	Gatos	EPO circulante	Paulo et al. 1972
En relación con una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno	Humanos	EPO circulante EPO en la orina	Miller et al. 1973
	Ratas	Producción de EPO	Miller et al. 1976
	-----	EPO circulante	Napier, 1980
	Ratas	EPO circulante	Jelkmann y Seidl, 1987
	Humanos (fumadores)	Masa de glóbulos rojos Hemoglobina Hematocrito Recuento de glóbulos rojos	Sagone et al. 1973
En relación con otros factores	Ratas	ARNm de EPO en riñones e hígado EPO circulante	Beru et al. 1986
	Humanos	EPO circulante	Kling et al. 1996

**Cuadro 2**  
**REPORTES DE CASOS RELACIONADOS CON ERITROCITOSIS SECUNDARIA EN ANIMALES**

Tipo de trastorno	Diagnóstico	Paciente(s)	Ref.	
Asociados a hipoxemia crónica	Complejo Eisenmenger	Vaca Holstein-Friesian de 4.5 años.	Gavaghan et al. 2001	
	Trastornos del desarrollo cardiovascular	Tetralogía de Fallot	Gato cruzado de Siamés, macho, 18 meses	Kirby y Gillick, 1974
		Persistencia del ducto arterioso	Perros adultos	Moore y Stepien, 2001
	Enfermedad pulmonar difusa	Carcinoma bronquiolo-alveolar	Pointer alemán hembra de 8 años.	Bertazzolo et al. 2002
Asociados a tumores	Carcinomas	Gato 9 años Gato 12 años	Klainbart et al. 2008	
		Adenocarcinoma renal	Gata esterilizada de 9 años	Noh et al. 2013
			Perra 19 meses	Crow et al. 1995
			Potranca árabe de un año	Roby et al. 1990
		Carcinoma hepatocelular	Vaca 10 años	Braun et al. 1997
			Vaquilla 8 meses	Braun et al. 1997
		Carcinoma colangiocelular	Oveja 3 años	Braun et al. 1997
	Otras neoplasias	Fibrosarcoma renal	Perro tipo beagle 10 años	Gorse, 1988
		Fibrosarcoma intranasal	Perra castrada, raza mixta, 8 años	Couto et al. 1989
		Linfoma renal de células T	Perros	Durno et al. 2011
Leiomiomasarcoma cecal		Perro raza mixta, 14 años	Sato et al. 2002	
Schwannoma		Perra esterilizada, raza mixta, 11 años	Yamauchi et al. 2004	
Asociados a otras causas	Pielonefritis necrotizante unilateral	Perro raza mixta, 11 años	Kessler, 2008	