

# Criterios preclínicos que sustentan el uso de la eritropoyetina recombinante humana

✉ Dania M Bacardí, Karelia Cosme, Delia N Porras, Elías N Rodríguez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba  
Fax: (53-7) 271 8070, 33 6008; E-mail: dania.bacardi@cigb.edu.cu

## RESUMEN

La eritropoyetina (EPO) es un factor de crecimiento y viabilidad esencial para los progenitores eritrocitarios de la médula ósea, que regula la producción de eritrocitos y la adapta a las necesidades fisiológicas de oxígeno. La obtención de EPO humana por la tecnología del ADN recombinante (EPOhr) ha permitido su amplio uso terapéutico. La experiencia clínica ha demostrado que esta molécula es capaz de corregir la anemia asociada a diferentes estados como: insuficiencia renal crónica terapia con zidovudina en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), artritis reumatoide, quimioterapia, prematuridad, transfusiones autólogas, enfermedades oncohematológicas y otras. La hipoxia hística es el principal estímulo para la síntesis de esta hormona en los riñones y en el hígado. La anemia renal puede ser corregida independientemente de la dosis utilizada, sin importantes efectos adversos, excepto el posible incremento de la presión arterial. Los pacientes que sufren anemia extrarrenal también se pueden beneficiar del uso de la EPOhr. En el presente trabajo se describen estudios preclínicos que demuestran la seguridad y tolerancia, así como se reseñan hallazgos poco divulgados de la experimentación con este factor de crecimiento hormonal, a modo de contribución a la ampliación del conocimiento sobre su elevado índice terapéutico.

**Palabras clave:** eritropoyetina, estudio preclínico, carcinogénesis, mutagénesis, toxicidad

*Biotecnología Aplicada 2005;22:173-177*

REVISIÓN

## ABSTRACT

**Pre-clinic criteria supporting safety in the use of recombinant human erythropoietin.** Erythropoietin is an essential growth and viability factor to erythroid progenitors of the bone marrow, regulating erythrocyte production and adapting it to the physiological needs for oxygen. Human EPO obtainment through recombinant DNA (EPO-hr) technology has enabled its wide therapeutical use. Clinical experience has shown that this molecule is capable of modifying anemia associated to chronic renal failure, zidovudine based therapy in patients with Acquired Immuno Deficiency Syndrome (AIDS), rheumatoid arthritis, chemotherapy, prematurity, autologous transfusions, oncohematological diseases and others. Tisular hypoxia is the main stimulus for the synthesis of this hormone in liver and kidneys. Renal anemia can be modified in dose a dependent manner without adverse effects, disregarding the possible increase of blood pressure. Patients suffering from extra renal anemia could also be benefited from the use of EPO-hr. The present paper reviews poorly divulged preclinical findings of experiments with this hormonal growth factor in an attempt to widen the knowledge of its high therapeutic index.

**Key words:** erythropoietin, preclinical study, carcinogenesis, mutagenesis, toxicity

## Introducción

La hormona glicoproteica eritropoyetina (EPO) es un factor de crecimiento esencial para la viabilidad de las células precursoras eritrocitarias de la médula ósea. Esta hormona se produce en los riñones y el hígado de los adultos [1, 2], y la hipoxia hística es el principal estímulo para su síntesis en estos órganos.

La EPO endógena y la recombinante humana (EPOhr) son similares con respecto a sus propiedades biológicas y químicas, excepto por algunas microheterogeneidades en sus cuatro cadenas de carbohidratos [3].

La anemia renal puede ser corregida por la EPOhr independientemente de la dosis, sin importantes efectos adversos, excepto el posible incremento de la tensión arterial [3]. Los pacientes que sufren anemia extrarrenal también se pueden beneficiar del uso de la EPOhr. Por otra parte, son pocos los casos en los que se ha reportado la formación de anticuerpos contra EPOhr en humanos [3].

Las dosis de comienzo en pacientes sin diálisis oscilan entre 50 y 100 UI/Kg tres veces por semana, por las vías intravenosa o subcutánea, y en pacientes con diálisis, por la vía intravenosa. La dosis debe ser

reducida cuando el hematócrito alcance un rango entre 30 y 33% o incrementos de más de 4 puntos en un período de dos semanas y debe ser incrementada si el hematócrito no aumenta en 5 a 6 puntos en un período de 8 semanas de tratamiento [4, 5]. Posteriormente, esta dosis se individualiza para el mantenimiento del hematócrito en el rango deseado, oscila entre 75 y 150 UI/Kg [5]. Los pacientes que no responden a esta dosis se les puede aumentar hasta 300 UI/Kg. Si esto fracasa, es muy poco probable que mejoren con dosis superiores, por lo que estas no se recomiendan. Los cambios de dosis deben ser de 25 UI/Kg cada vez [4]. Para los pacientes con afecciones oncohematológicas, anemia por quimioterapia y por tratamientos con AZT en SIDA, las dosis de comienzo oscilan entre 100 y 150 UI/Kg y las dosis de mantenimiento deben ser individualizadas [6].

## Uso terapéutico y evaluación de seguridad

Diversas proteínas recombinantes desempeñan una función importante en la terapia, especialmente en la

1. Da Silva JL, Swartman ML, Goodman A, Levere RD, Abraham NG. Localization of erythropoietin mRNA in rats kidney by polymerase chain reaction. *J Cell Biochem* 1994;54:239-46.

2. Lacombe C, Da Silva JL, Bruenel P, et al. Peritubular cell are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 1998;81:620-3.

3. Jelkmann W. Use of recombinant human erythropoietin as an antianemic and performance enhancing drug. *Curr Pharm Biotechnol* 2000;1(1):11-31.

4. Rizzo JD, Seidenfeld J, Piper M, Aronson N, Lichtin A, Littlewood TJ. Erythropoietin a paradigm for the development of practice guidelines [review]. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001;10-30.

5. Henke M, Laszig R, Rube C, et al. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362:1255-60.

estimulación de la hematopoyesis posterior a la quimioterapia. Debido a que son copia de proteínas endógenas, se asumía que debían ser bien toleradas. Esta suposición es válida para algunas proteínas, pero otras han mostrado ser menos aceptadas. Por tanto, la valoración de la seguridad preclínica de estas proteínas resulta necesaria, pues los estudios preclínicos de toxicidad pueden tener un valor predictivo para los seres humanos [9, 10].

Durante la evaluación no clínica de distintas variantes de EPOhr, suelen realizarse estudios para caracterizar farmacocinéticamente la molécula en comparación con una similar comercial, además de la valoración de su seguridad [11, 12]. Los estudios más frecuentes, y sobre los que existe mayor información son los que se detallan a continuación:

1. Farmacocinética intravenosa y subcutánea.
2. Toxicidad a dosis única [13].
3. Tolerancia local [14].
4. Toxicidad a dosis repetida durante 90 días [15].

Seguidamente se relacionan los estudios no clínicos que conforman la parte III del registro del fármaco, en la que se recogen los principales resultados de las experiencias en animales. Además, se ofrecen consideraciones que no aparecen con la frecuencia de las anteriores en los reportes de los estudios de esta molécula. Se discuten a continuación aspectos menos conocidos de los estudios preclínicos de esta hormona recombinante.

### Estudio de la función reproductora

La evaluación del efecto del tratamiento con EPOhr sobre la función testicular [16, 17] y sobre la fisiología del semen en un modelo de falla renal crónica en ratas, indicó que la EPOhr mejora la función de las células de Leydig, las células de Sertoli (estas últimas encargadas de producir  $\beta$  estradiol estimuladas por la hormona estimulante de folículos [FSH]), lo cual favorece la espermatogénesis, la maduración espermática y la capacidad fertilizadora espermática. Por estas razones, algunos autores refieren que los cambios hormonales inducidos por la EPOhr no solo están relacionados con el mejoramiento de la anemia, sino que producen normalización del mecanismo de retroalimentación pituitario-gonadal, lo que parece incidir en la mejoría de la actividad sexual de los pacientes [18].

También se ha demostrado que la EPOhr es capaz de influenciar la esteroidogénesis testicular, mediante la estimulación de la producción de testosterona en el hombre [18], sin efectos sobre la secreción de gonadotropinas, lo que confirma su acción directa sobre las células de Leydig y las células de Sertoli. En un estudio clínico a 8 pacientes masculinos sometidos a hemodiálisis [19], se probó su efecto sobre la erección del pene y los niveles de hormonas del eje hipotálamo-pituitario-gonadal. El 72% de los pacientes presentó mejoría de la función eréctil, sin cambios en los niveles de la FSH, de la hormona luteinizante (LH), del cinc (Zn) o de la paratohormona de alta sensibilidad (HS-PTH), lo que incluso podría sugerir determinada función de la EPOhr en el tratamiento de los trastornos sexuales [19].

En todos los casos descritos en la literatura se han percibido efectos beneficiosos, y esta no recoge infor-

mación que haga pensar en la existencia de un peligro potencial sobre el sistema reproductor masculino debido a la administración de esta hormona a los seres humanos. De igual modo, con respecto a los efectos sobre el sistema reproductor femenino, se tienen reportes acerca de la utilización de EPOhr en estados ginecológicos y en afecciones ováricas, pero no acerca de los efectos adversos del tratamiento.

### Toxicidad perinatal

Luego del éxito de los ensayos clínicos que emplearon EPOhr para tratar pacientes adultos con enfermedades renales en fase terminal y anemia, el primer ensayo clínico para evaluar el uso de EPOhr en niños pretérmino se publicó en 1990. Desde aquel reporte inicial, numerosos ensayos han informado niveles variables de éxito en el tratamiento de la anemia del embarazo. Más recientemente se ha empleado en las primeras semanas de vida para prevenir la anemia de la prematuridad [20, 21].

La fisiología de la eritropoyesis fetal y la materna en el embarazo demuestra que la hematopoyesis y su estimulación tienen lugar por separado en las dos circulaciones sanguíneas [22]. La eritropoyetina parece ser el principal regulador en ambos compartimientos. La placenta humana forma una barrera manifiesta a la EPO endógena y a la recombinante, de modo que se cumple la precondición cardinal para el uso de la EPOhr en el tratamiento de la anemia materna del embarazo. La prevalencia de anemia materna en la gestación y luego del parto es elevada y el uso de EPOhr para su tratamiento ha dado resultados prometedores, sin reacciones adversas de importancia.

Las mediciones de eritropoyetina en sangre fetal obtenida por cordocentesis, o en sangre del cordón umbilical y materna han demostrado falta de correlación, lo que indica una regulación independiente de las concentraciones de EPO en los compartimientos fetal y materno. De modo que la aplicación terapéutica de EPOhr a la madre para el tratamiento de anemias crónicas no tendría efectos sobre los tejidos fetales.

### Potencial mutagénico

Yajima junto a algunos colaboradores [23] estudiaron la genotoxicidad de la EPOhr en ratones desnudos (atímicos). Ellos observaron marcados incrementos en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados y de reticulocitos micronucleados en los ratones portadores de una línea tumoral transfectada con el gen de la EPOhr, aunque no encontraron aberraciones cromosómicas en las células del bazo o de la médula ósea. Las alteraciones encontradas parecen ser resultado de la aceleración de la maduración eritroblástica y de la proliferación inducida por la EPOhr. Posteriormente, examinaron la capacidad de la EPOhr de inducir la formación de eritrocitos micronucleados en sistemas *in vivo* e *in vitro*. Además, analizaron la frecuencia de reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratones a los que se administró entre 400 y 50 000 UI/Kg de EPOhr por vía intraperitoneal, y luego se tomaron muestras a las 48, 72 y 96 h. Por su parte, en pruebas de mutación reversa bacteriana, en cepas de *Salmonella typhimurium*, TA100, TA98, TA1535, TA1537, o *Escherichia*

6. Miles SA, Mitsuyasu RT, Moreno J, Baldwin G, Alton NK, Souza L, Glaspy JA. Combined therapy with recombinant granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin decreases hematologic toxicity from zidovudine Blood 1991; 15.77(10):2109-17.

7. Ferrario E, Ferrari L, Bidoli P, De Candis D, Del Vecchio M, De Dosso S, Buzzoni R, Bajetta E. Treatment of cancer-related anemia with epoetin alfa: a review. Cancer Treat Rev 2004;30(6):563-75.

8. Bristow A. Collaborative study for the establishment of a biological reference preparation for erythropoietin. Pharmeurope Special Issue 1997;BIO:97-102.

9. The Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM). Erythropoietin concentrates solution. In: European Pharmacopoeia (Fourth Edition). Strasburg: Council of Europe 2001;1123-8.

10. Food and drug administration. Good Laboratory Practice for non clinical laboratory studies. Title 21 Code of Federal Regulations, Subchapter A, Part 58. 1997.

11. ICH/EMEA Preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Step 4. (CPMP/ICH/302/95) 1997. <http://www.EMA.EU.int.com>.

12. ICH/EMEA No-clinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals. ICH M3 (M) (Modification of CPMP/ICH/286/95). 2000. <http://www.EMA.EU.int.com>.

13. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals 425: Acute Oral Toxicity; Modified Up-and-Down Procedure. Section 4: Health Effects (Updated Guideline, adopted 20th December 2001).

14. ICH/EMEA Note for Guidance on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (CPMP/SWP/2145/00). 2000. <http://www.EMA.EU.int.com>.

15. CECMED. Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de uso humano. La Habana, Cuba, 2001.

16. Yamamoto Y, Sofikitis N, Miyagawa I. Effects of erythropoietin, bromocryptine and hydralazine on testicular function in rats with chronic renal failure. Andrologia 1997;29(3):141-4.

17. Kokot F, Wiecek A, Grzeszczak W, Klin M. Influence of erythropoietin treatment on follitropin and lutropin response to luteal and plasma testosterone levels in haemodialyzed patients. Nephron 1990;56(2):126-9.

18. Foresta C, Mioni R, Bordon P, Miotto D, Montini G, Varotto A. Erythropoietin stimulates testosterone production in man. J Clin Endocrinol Metab 1994;78(3):753-6.

19. Kuwahara M, Takagi N, Nishitani M, Matsushita K, Ohta K, Nakamura K, Fujisaki N. Evaluation of the efficacy of recombinant human erythropoietin (rHUEPO) administration on penile erection in males undergoing hemodialysis and effect on pituitary-gonadal function. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 1995; 86(4):912-8.

20. Ohls RK. Erythropoietin to prevent and treat the anemia of prematurity. Curr Opin Pediatr 1999;11(2):108-14.

*coli*, WP2 uvrA-, tratadas con 188 y 6 000 UI/placa de EPOhr, con mezcla S9 o no, se encontraron un pequeño, pero significativo incremento en la frecuencia de aparición de eritrocitos policromáticos micronucleados en la médula ósea de los ratones a dosis tan elevadas como 12 500 y 50 000 UI/Kg de EPOhr. De igual modo encontraron una clara relación dosis-respuesta y un incremento significativo de reticulocitos micronucleados en sangre periférica hasta 96 horas después de la administración.

Sin embargo, en los ensayos de mutaciones bacterianas no se observó incremento de cepas de *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* que hubieran adoptado fenotipos auxotróficos con el tratamiento de 188 y 6 000 UI/placa, incluso a dosis de 750 y 6000 UI/mL. La EPOhr no indujo aberraciones cromosómicas *in vitro* en células CHL o en linfocitos de sangre periférica, tampoco se detectaron aberraciones cromosómicas en células precursoras eritroides de la médula ósea de ratones CD-1 a dosis de 100 000 UI/Kg *in vivo* [24].

De manera que los errores en el proceso de enucleación o diferenciación de los eritrocitos, junto con la inducción de daños al ácido desoxirribonucleico (ADN) o los errores en el proceso reparativo, deben ser igualmente considerados como posibles mecanismos que expliquen el incremento de la frecuencia de células micronucleadas.

En este sentido, las evidencias favorecen la noción de un bajo potencial mutagénico de la eritropoyetina. Es presumible que la aceleración de los mecanismos de proliferación de células progenitoras ocurre con errores que dan lugar al aumento de precursores inmaduros en la sangre periférica, pero no se ha podido detectar daño en el genoma celular de órganos animales ni en sistemas bacterianos.

## Potencial carcinogénico

Los tumores pueden ser inducidos por numerosos agentes, entre ellos, radiaciones, agentes biológicos y sustancias químicas de diverso origen. Aparentemente, la transformación tumoral se origina a partir de alteraciones en el programa genético celular o por cambios en la información contenida en las células y su subsecuente fijación y replicación.

La EPOhr se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la anemia relacionada con el cáncer. Esta se ha probado en el tratamiento de pacientes portadores de tumores que han desarrollado anemia inducida por platino. Se reportan sus efectos positivos sobre la oxigenación de los tumores, la inhibición del crecimiento tumoral y como tratamiento de soporte en la quimioterapia y la radioterapia [3].

La anemia en el cáncer está asociada con la producción excesiva de citocinas que inhiben la síntesis de EPO e interfieren el proceso eritropoyético normal, lo cual conduce a una reducción de las células rojas y de la capacidad de oxigenación de los tejidos [25].

Un hallazgo experimental sorprendente es que entre el 30 y el 60% de los ratones portadores de tumores, tratados diariamente con EPOhr por varias semanas, presentaron regresión tumoral completa. Al ser retados nuevamente con células tumorales, estos las rechazaron. Este efecto fue atribuido a un mecanismo mediado por linfocitos T, de modo que la eritropoyetina parece actuar como agente antitumoral [26].

Un elevado número de evidencias sugiere que el tratamiento con EPOhr a pacientes con neoplasias contribuye a la mejoría de la calidad de vida y a la supervivencia. Así, Glaser y algunos colaboradores [27] encontraron que el nivel de hemoglobina y el uso de EPOhr fueron factores pronosticadores de la respuesta de carcinomas escamosos orales y orofaríngeos a la quimiorradioterapia. La respuesta, el control local y las tasas de supervivencia en pacientes con cifras de hemoglobina menores de 14.5 g/dL antes del tratamiento, a los que se administró EPOhr, fueron significativamente superiores a los que presentaron valores bajos y no fueron tratados con EPOhr.

Además, se plantea que la EPOhr es una buena alternativa a las transfusiones de sangre en el tratamiento de la anemia en pacientes con alteraciones hematológicas malignas como linfomas y mielomas [28]. Igualmente se recomienda como una solución apropiada para el mantenimiento de las concentraciones de hemoglobina en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) [29], en los cuales se sabe que existe predisposición al desarrollo de tumores.

Sin embargo, a pesar del cúmulo de observaciones y hechos experimentales, existen evidencias que favorecen el potencial carcinogénico de la EPOhr. La derivación de células ováricas malignas de las señales de la EPO induce la muerte de estas y de células endoteliales *in vitro* [30], mientras que la inyección de anticuerpos anti-EPO o anti-EPO-R (receptor de eritropoyetina) soluble en tumores ováricos y uterinos de ratones desnudos produce reducción del tamaño tumoral. El examen inmunohistoquímico reveló la destrucción de las células malignas y endoteliales con capacidad de responder a la EPO.

Se ha reportado la expresión basal y estimulada por hipoxia de EPO y de EPO-R en células de cáncer mamario en seres humanos [31], en las que se demostró además estimulación mediada por EPO de la fosforilación de tirosinas y de la proliferación celular. De modo que la señalización amplificada de EPO puede contribuir a la promoción de tumores humanos por la hipoxia hipóctica.

Westenfelder y Baranowski [32] demostraron que la EPOhr estimulaba la proliferación de células de carcinoma renal humano, en dependencia de la dosis. Además, concluyeron que estas células expresaban ARNm para el EPO-R al igual que la proteína, y que la activación del receptor estimulaba su proliferación *in vitro*. De modo que la EPO endógena o su administración para el tratamiento de la anemia pudiera acelerar la proliferación de procesos malignos de células renales. Sin embargo, quedaría por demostrar que estos efectos mitogénicos operan también en pacientes con carcinoma renal.

Como contrapartida de las observaciones anteriores, en un estudio también *in vitro*, en células UT-7/Epo, de la línea eritroleucémica humana dependiente de factores de crecimiento, que requiere de la EPO para el crecimiento a largo plazo, la EPOhr estimuló la fosforilación de p42/44 durante horas. La expresión de genes de respuesta temprana como c-fos, egr1 y CIS, como respuesta a la EPOhr demostró que la expresión transitoria de p42/44 se correlacionó con la igualmente efímera respuesta de c-fos y egr1. Estos datos indican

21. De la Torre M, Gascon FJ, Zapatero M, et al. Prophylaxis of anemia of prematurity with erythropoietin. Case control study. *An Esp Pediatr* 2000;53(3):243-8.

22. Huch R, Huch A. Erythropoietin in obstetrics. *Hematol Oncol Clin North Am* 1994;8(5):1021-40.

23. Yajima N, Kurata Y, Imai E, Sawai T, Takeshita Y. Genotoxicity of genetic recombinant human erythropoietin in a novel test system. *Mutagenesis* 1993;8(3):231-6.

24. Yajima N, Kurata Y, Sawai T, Takeshita Y. Induction of micronucleated erythrocytes by recombinant human erythropoietin. *Mutagenesis* 1993;8(3):221-9.

25. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res* 2001;61(4):1358-61.

26. Mittelman M, Neumann D, Peled A, Kanter P, Haran-Ghera N. Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2001;98(9):5181-6.

27. Glaser CM, Millesi W, Kornek GV, Lang S, Schull B, Watzinger F, Selzer E, Lavey RS. Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50(3):705-15.

28. Osterbor A. The role of recombinant human erythropoietin in the management of anaemic cancer patients: focus on haematological malignancies. *Med Oncol* 2000;17(1):S17-22.

29. Volberding P. Consensus statement: anemia in HIV infection-current trends, treatment options, and practice strategies. Anemia in HIV Working Group. *Clin Ther* 2000;22(9):1004-20.

30. 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(9):3561-5.

31. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int Aug* 2000;58(2):647-57.

32. Erickson-Miller CL, Pelus LM, Lord KA. Signaling induced by erythropoietin and stem cell factor in UT-7/Epo cells: transient versus sustained proliferation. *Stem Cells* 2000;18(5):366-73.

que EPO-R, JAK2, y STAT5 no son necesarios para la iniciación de la proliferación de esas líneas eritroides y que se requeriría la expresión sostenida de *c-fos* y *egr1* para la proliferación a largo plazo [33]. Esto podría indicar la incapacidad de la EPOhr como promotor de la transformación tumoral.

La EPOhr, como factor de crecimiento, puede de activar mecanismos celulares de control de la proliferación. Ello parece indicar entonces que la EPOhr, aunque puede estimular la progresión tumoral (según las evidencias planteadas), no participa en la iniciación. Quizá cabe suponer que las acciones paracrina y autocrina son de actividad promotora, no así la endocrina. Lo cierto es que las evidencias obtenidas *in vitro* demuestran lo contrario, no así en sistemas biológicos íntegros en los que no hemos detectado ningún reporte al respecto. Quizá exista en el organismo humano una interacción de señales que logran el control del crecimiento tumoral.

Sin embargo, al parecer, es cuestionable si la concentración plasmática que se alcanza durante el tratamiento de la anemia representa un impacto promotor para los tumores. En el caso de la promoción tumoral, la producción autocrina o paracrina de la EPO (y otros factores de crecimiento) es de mayor importancia.

En tal caso, la aplicación exógena podría tener impacto solo sobre la producción autocrina en la medida en que se reduzca la hipoxia tumoral (que parece ser un estímulo para la producción endógena de la EPO). Sin embargo, la EPOhr exógena no debe representar un impacto significativo para la formación de EPO en los tumores.

## Toxicidad en otros sistemas

Mediante estudios de inmunotoxicidad, neurotoxicidad y toxicidad sobre el sistema endocrino se pueden explorar los efectos tóxicos sobre los sistemas específicos.

Aunque se ha planteado que la EPOhr puede regular la actividad de la IL-2 [34], sus efectos sobre el sistema inmune no son de esperar, puesto que no se encuentran receptores para EPO en líneas celulares mieloides, linfoides o monolíticas [35].

En cuanto a los efectos sobre el sistema nervioso, se conoce que además de la acción hematopoyética de la EPOhr, esta posee propiedades neurotróficas y efectos neuroprotectores en modelos de daño hipóxico-ischémico [35].

En el sistema nervioso central, las neuronas expresan EPO-R, mientras los astrocitos producen el ligando. Mediante RT-PCR e inmunotinción, se ha demostrado que el EPO-R se expresa en cultivos de neuronas de hipocampo y corteza cerebral [36]. La EPOhr protege los cultivos primarios de neuronas de la toxicidad del glutamato mediada por receptores de la N-metil-D-aspartato (NMDA) [37]. Se ha planteado que su efecto neuroprotector puede ser ejercido por la reducción de la formación de radicales libres, mediada por óxido nítrico (NO) o por antagonismo de los efectos de este.

Algunos hallazgos preclínicos sugieren que la EPOhr constituye un potencial terapéutico para el infarto cerebral, los traumatismos craneales y la epilepsia; aunque se precisa de estudios adicionales para confirmar y extender estas alentadoras observaciones en modelos animales. Un importante hallazgo reforzó las esperanzas, al aportar la posibilidad de tratar afecciones del

sistema nervioso central (SNC), mediante la administración sistémica de este factor de crecimiento.

Una investigación conjunta identificó la expresión de receptores para EPO en capilares del cerebro humano, así como un mecanismo específico, mediado por receptores, para el transporte de la EPOhr a través de la barrera hematoencefálica, después de la administración intraperitoneal de una inyección única a roedores, con la subsecuente protección contra varios tipos de daño neuronal. Por ejemplo, la administración de EPOhr 24 antes o hasta 6 h después de una isquemia focal redujo significativamente la magnitud del infarto. La EPOhr también atenuó el daño cerebral por concusión, la actividad convulsiva inducida por kainato, y las convulsiones a consecuencia de una encefalomiéltis autoinmune [38].

De forma general, las potencialidades neuroprotectoras esperadas de la EPOhr que se investigan, se basan en que:

1. La EPO endógena se expresa en el sistema nervioso central.
2. La EPO endógena es inducida por hipoxia.
3. La EPOhr ha mostrado un marcado potencial neuroprotector en cultivos celulares y en modelos animales.
4. Posee múltiples efectos protectores (antiapoptótico, neurotrófico, antioxidante, angiogénico).
5. Es extremadamente bien tolerada [39].

También se han señalado acciones que la EPOhr ejerce sobre el sistema neuroendocrino. Las funciones hipotálamo-hipofisaria, tiroidea y gonadal son de los pacientes en hemodiálisis crónica anormales, incluyendo las respuestas retardadas a la hormona estimulante del tiroides (TSH) y a la hormona liberadora de tirotrina (TRH), hiperprolactinemia, niveles elevados de LH con respuesta exagerada a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y depresión de la respuesta secretora de FSH a la GnRH. Después de la corrección de la anemia por tratamiento con eritropoyetina exógena se observó la normalización de la respuesta TSH a TRH, de los niveles basales de hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) y de la respuesta FSH a GnRH, lo que pudiera atribuirse a una mejoría en la oxigenación o a efectos tróficos de la EPOhr [39]. Ello posiblemente sugiere la necesidad de una oxigenación adecuada para la síntesis *de novo* de proteínas hormonales y/o la participación de la EPOhr en las vías de regulación de la función hormonal.

De modo que en ninguno de los tres sistemas (inmune, nervioso y endocrino) se han reportado más efectos que aquellos que contribuyen al mantenimiento, protección y normalización de las funciones.

La información recopilada sobre los efectos de la administración de EPOhr sobre sistemas de órganos y tejidos específicos de los animales de experimentación y sistemas *in vitro*, en conjunto con los resultados de estudios de la toxicología regulatoria clásica, completan el panorama que ilustra la buena tolerancia de esta molécula y confirma, a su vez, los beneficios que de su uso se pueden esperar.

## Conclusiones

Los estudios toxicológicos de la EPOhr confirman la buena tolerancia y la no toxicidad de la hormona en

33. Lissoni P, Rovelli F, Baiocco N, Tangini G, Fumagalli L. A phase II study of subcutaneous low-dose interleukin-2 plus erythropoietin in metastatic renal cell carcinoma progressing on interleukin-2 alone. *Anticancer Res* 2001;21(1B):777-9.

34. Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett* 2000;290(3):213-5.

35. 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(1):105-16.

36. 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 (USA)* 1998;95(8):4635-40.

37. Cerami A. Beyond erythropoiesis: novel applications for recombinant human erythropoietin. *Semin Hematol* 2001;38(3 Suppl 7):33-9.

38. Siren AL, Ehrenreich H. Erythropoietin: a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 251(4):179-84.

39. Ramirez G, Bittle PA, Sanders H, Bercu BB. Hypothalamo-hypophyseal thyroid and gonadal function before and after erythropoietin therapy in dialysis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74(3):517-24.

los sistemas experimentales evaluados. Todos los hallazgos expuestos, se corroboran por la información de los reportes de estudios dirigidos a la exploración de sistemas específicos como el re-

productor, el endocrino, el nervioso central y otros, en los que la mayoría de los investigadores coincide en afirmar la seguridad de su administración en los seres humanos.

---

*Recibido en septiembre de 2004. Aprobado en julio de 2005.*