

# *Estudio del efecto de la eritropoyetina humana recombinante (EPOrHu) sobre el sistema de defensa frente a la oxidación de los hematíes de pacientes urémicos en hemodiálisis*

A. Miguel García, A. Miguel Sosa, M. Linaes, M. J. Martín \*, R. Moll \* y A. Pérez García \*

Servicios de Hematología y \* Nefrología. Hospital General Universitario de Valencia.

## RESUMEN

*En ocho pacientes con anemia debida a insuficiencia renal crónica, y sometidos a régimen de hemodiálisis, se estudiaron parámetros biológicos relacionados con la supervivencia eritrocitaria, peroxidación lipídica y los mecanismos de defensa contra la agresión oxidativa antes y después de establecer un tratamiento con EPOrHu. La vida media eritrocitaria mejoró tras el tratamiento. La actividad de superóxido dismutasa y el contenido de glutación reducido, así como de ácido malonildialdehído, valorados antes del tratamiento, fueron superiores a los de hematíes de sujetos normales; después del tratamiento estos valores iniciaron un descenso, sin alcanzar límites de significación estadística. La actividad de glutación peroxidasa fue normal antes y después del tratamiento.*

Palabras clave: **Eritropoyetina. Oxidación. Anemia. Uremia.**

## EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN ON THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN RED BLOOD CELLS OF CHRONIC RENAL FAILURE PATIENTS UNDERGOING HEMODIALYSIS

## SUMMARY

*Parameters related to erythrocyte (RBC) survival, lipid peroxidation and defense mechanisms against oxidative injury were studied in eight patients with anemia of chronic renal failure, undergoing hemodialysis, before and after therapy with r-HuEPO. Life span of RBC improved after treatment. Superoxide dismutase activity, reduced glutathione and malonyl-dialdehyde acid content were higher in these patients before treatment compared to normal RBC; after treatment, these values were lower although not in a significant way. Glutathione peroxidase activity was normal before and after treatment.*

Key words: **Erythropoietin. Oxidation. Anemia. Uremia.**

---

Correspondencia: Dr. A. Pérez García.  
Servicio de Nefrología.  
Hospital General Universitario.  
Avda. Tres Cruces, s/n.  
46008 Valencia.

## Introducción

La anemia en la insuficiencia renal crónica (IRC) se debe principalmente a una inadecuada secreción de eritropoyetina (EPO). Este hecho ha sido demostrado al obtenerse una clara recuperación de la anemia en pacientes urémicos tratados con eritropoyetina humana recombinante (EPOrHu)<sup>1, 2</sup>. Sin embargo, en la génesis de esta anemia, además de la hipofunción medular, atribuible al déficit, parece desempeñar un papel importante<sup>3, 4</sup>. Asimismo, la ferropenia provocada por las pérdidas sanguíneas frecuentes, el posible efecto tóxico inhibitor de la eritropoyesis de ciertos metabolitos y las situaciones de hiperesplenismo, hiperparatiroidismo, sobrecarga de aluminio y déficit de folatos, pueden ser factores sobreañadidos que empeoren la anemia de la IRC<sup>5</sup>.

Recientemente se ha demostrado un aumento de la peroxidación de los lípidos de membrana en los hematíes de los pacientes urémicos, tanto en régimen de hemodiálisis como en los sometidos a tratamiento conservador, cuyo origen permanece poco claro<sup>6, 7</sup>. Estos cambios bioquímicos de la membrana eritrocitaria se traducirían en una pérdida de elasticidad de la misma con alteración en la deformabilidad del hematíe y como resultado en una mayor tendencia a la hemólisis<sup>8</sup>.

El hematíe se defiende de la acción oxidativa de los radicales libres hidróxilo y peróxido mediante un potente sistema enzimático reductor, del que forman parte el ciclo de las pentosas fosfato y la enzima superóxido dismutasa como principales agentes. En los pacientes urémicos se ha comprobado la existencia de alteraciones en estos sistemas de defensa<sup>9</sup>.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar, en pacientes con IRC en hemodiálisis y con anemia, el efecto que ejerce el tratamiento con EPO sobre la peroxidación de los lípidos de membrana del hematíe y sobre sus mecanismos de defensa frente a la agresión oxidativa, comprobando, a su vez, la posible relación de estos hechos con el componente hemolítico de la anemia de estos pacientes.

## Material y métodos

El estudio se ha realizado en ocho pacientes, dos varones y seis hembras, con edades comprendidas entre cincuenta y sesenta y ocho años (media de 60,35 años), afectados de insuficiencia renal terminal y en tratamiento con hemodiálisis desde cinco hasta cincuenta y cuatro meses (media de treinta ± dieciocho meses). En todos ellos la cifra de hemoglobina (Hb) era igual o inferior a 8 g/dl y su anemia no tenía otra etiología que no fuese su insuficiencia renal crónica. No eran fumadores ni tomaban andrógenos u otras drogas que pudieran influir en su anemia o en el tratamiento de la misma.

Todos los pacientes se trataron con EPOrHu, con una dosis inicial de 50 U/kg tres veces a la semana, seguida, según necesidades, de un incremento de 25 U/kg cada tres semanas hasta alcanzar una Hb entre 10 y 12 g/dl. La administración se efectuó por vía endovenosa al final de la hemodiálisis.

En todos los casos se estudiaron los siguientes parámetros: hemograma completo con recuento de reticulocitos, dosificación de ferritina sérica (método ELISA), estudio de la vida media eritrocitaria con Cr<sup>51</sup>, actividad de glutatión peroxidasa (GPX) y de superóxido dismutasa (SOD) y dosificación de glutatión reducido (GSH)<sup>10</sup>. Además se determinó la susceptibilidad a la peroxidación de los lípidos de membrana eritrocitaria mediante la dosificación, tras tratamiento de la muestra con peroxidación de los lípidos de membrana eritrocitaria mediante la dosificación, tras tratamiento de la muestra con peróxido de hidrógeno, del ácido malonildialdehído (MDA)<sup>11</sup>. Todos estos parámetros se determinaron basalmente y a las veinte semanas de tratamiento con EPOrHu. El hemograma, recuento de reticulocitos y ferritina se realizaron además de forma periódica mensual a fin de controlar más estrechamente los efectos inmediatos de la EPOrHu.

Como estudio estadístico se aplicó el test t de Student para muestras apareadas.

## Resultados

Los parámetros hematimétricos están reflejados en la tabla I. A lo largo del tratamiento todos los pacientes incrementaron sus cifras de hematíes, hematócrito y hemoglobina de forma progresiva. Este ascenso se inició en general ya en el primer mes de tratamiento, con un pico el tercero y cuarto mes y posterior estabilización de sus cifras. Respecto a las características morfológicas de la anemia, el volumen corpuscular medio (VCM) no se modificó a lo largo de todo el tiempo ( $92,38 \pm 8,6$  vs  $90,5 \pm 10$  fL); la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) se mantuvo igualmente constante ( $33,58 \pm 0,68$  vs  $32,00 \pm 0,57$  g/dl), mientras que la hemoglobina corpuscular media (HCM) sufrió un descenso a partir del cuarto mes del ensayo ( $31,01 \pm 2,8$  vs  $28,84 \pm 3,38$  pg). La cifra de reticulocitos, que estaba descendida para el grado de anemia ( $18,16 \pm 15,97 \times 10^9/L$ ) se elevó ya al primer mes de tratamiento ( $35,29 \pm 14,82 \times 10^9/L$ ), con un pico máximo a los dos meses ( $69,95 \pm 42,48 \times 10^9/L$ ) y un descenso paulatino a partir del cuarto mes.

La ferritina sérica que presentaba, excepto en un caso, valores normales o elevados (media:  $411,00 \pm 492,66$  ng/ml) descendió siempre (media:  $200,76 \pm 266,12$  ng/ml).

La vida media eritrocitaria, valorada al principio y

**Tabla I.** Evolución de los parámetros hematimétricos y de reticulocitos en los pacientes durante el tratamiento con EPOrHu

	Hb (g/dl)	Htíes ( $\times 10^{12}/L$ )	Hto. (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	Retic ( $\times 10^9/L$ )
Basal.....	7,20 ( $\pm 0,98$ )	2,37 ( $\pm 0,38$ )	21,46 ( $\pm 3,08$ )	92,38 ( $\pm 8,60$ )	31,01 ( $\pm 2,80$ )	33,58 ( $\pm 0,68$ )	18,16 ( $\pm 15,97$ )
Mes 1.....	8,54 * ( $\pm 0,83$ )	2,72 * ( $\pm 0,25$ )	25,54 * ( $\pm 2,56$ )	94,13 ( $\pm 8,42$ )	31,52 ( $\pm 3,38$ )	33,45 ( $\pm 0,62$ )	35,29 * ( $\pm 14,82$ )
Mes 2.....	10,09 * ( $\pm 1,21$ )	3,26 * ( $\pm 0,33$ )	30,59 * ( $\pm 3,60$ )	94,13 ( $\pm 9,32$ )	31,04 ( $\pm 3,62$ )	32,96 ( $\pm 0,89$ )	69,95 * ( $\pm 42,48$ )
Mes 3.....	10,69 * ( $\pm 1,30$ )	3,56 * ( $\pm 0,30$ )	32,73 * ( $\pm 3,67$ )	92,00 ( $\pm 10,0$ )	30,29 ( $\pm 3,68$ )	32,60 ( $\pm 0,47$ )	39,40 * ( $\pm 11,00$ )
Mes 4.....	10,85 * ( $\pm 1,01$ )	3,79 * ( $\pm 0,45$ )	33,66 * ( $\pm 3,11$ )	89,25 ( $\pm 8,35$ )	28,84 * ( $\pm 3,38$ )	32,24 ( $\pm 1,08$ )	45,51 * ( $\pm 24,60$ )
Mes 5.....	11,10 * ( $\pm 0,70$ )	3,89 * ( $\pm 0,54$ )	34,69 * ( $\pm 2,14$ )	90,50 ( $\pm 10,0$ )	28,83 * ( $\pm 3,50$ )	32,00 ( $\pm 0,57$ )	31,38 ( $\pm 13,97$ )

(\*) Diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) respecto del valor basal.

Hb: Hemoglobina; Htíes: Hematíes; Hto: Hematócrito; VCM: Volumen corpuscular medio; HCM: Hemoglobina corpuscular media; CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media; Retic: Reticulocitos.

al final del estudio, se prolongó significativamente ( $17,38 \pm 1,51$  vs  $24,75 \pm 5,95$  días), llegando a alcanzar en tres casos valores dentro del rango de normalidad (fig. 1).

El grado de susceptibilidad a la peroxidación de los lípidos de membrana eritrocitaria, que está elevado en los pacientes urémicos, y que fue medido en concentración de MDA en los hematíes sometidos *in vitro* a una agresión oxidativa, no se modificó sensiblemente tras el tratamiento con EPO ( $557,75 \pm 78,09$  vs  $479,75 \pm 111$  nmol/g Hb). La

concentración de GSH intraeritrocitario que se encontraba elevado en el estudio basal ( $97,25 \pm 16,88$  mg/100 ml) no se modificó tras el tratamiento ( $89,63 \pm 19,28$  ng/100 ml). Lo mismo ocurrió con la actividad de GPX ( $36,63 \pm 12,51$  vs  $32,86 \pm 10,22$  U/g Hb) y la actividad de SOD ( $3.074,25 \pm 435,75$  vs  $2.513,63 \pm 459,13$  U/g Hb). Sin embargo, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa en todos los casos un acercamiento hacia los valores de normalidad (tabla II).

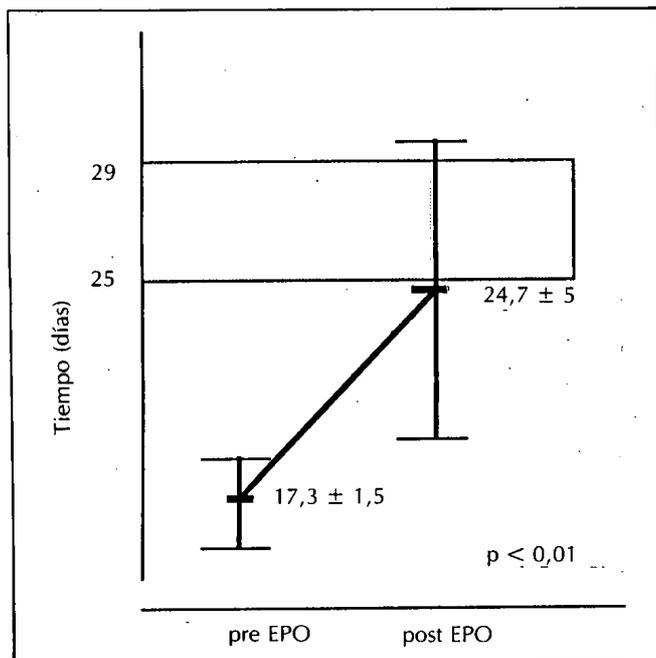


Fig. 1.—Vida media eritrocitaria cuantificada con  $^{51}\text{Cr}$  en ocho pacientes anémicos con IRC y sometidos a hemodiálisis: antes de iniciar tratamiento con EPOrHu y después, cuando las cifras de hemoglobina alcanzaron valores entre 10 y 12 g/dl.

## Discusión

La recuperación de la anemia en los pacientes estudiados sigue una evolución similar a la observada en trabajos previos<sup>1, 2</sup>. En esta recuperación juega un papel importante el aumento de los reticulocitos, que refleja una mejoría en la actividad de la médula ósea.

En el período de tiempo estudiado no se modifica el tamaño de los hematíes. Sin embargo, sí que se inicia un descenso de la HCM, que es un buen indicador de la disminución de la síntesis de hemoglobina por falta de hierro. El hierro de depósito, valorado mediante la dosificación de ferritina sérica, disminuye rápidamente cuando existe mayor actividad eritropoyética. La consecuencia de este hecho es la vigilancia periódica a que deben ser sometidos estos pacientes por si fuera necesario, en algún caso, la suplementación con hierro para evitar la generación de una anemia ferropénica secundaria al tratamiento con EPO.

La causa que justifique la existencia de un componente hemolítico en la anemia por insuficiencia renal crónica no se conoce bien todavía. Estudios realizados hasta ahora<sup>12, 13</sup> sugieren la posibilidad de que

**Tabla II.** Efecto de la EPOrHu en los parámetros relacionados con los sistemas de defensa del hematíe contra la oxidación

	Ferritina * (ng/ml)	VM * (días)	MDA (nMol/gHb)	GSH (mg/100 ml)	GPX (U/gHb)	SOD (U/gHb)
Pre .....	411,00 (± 492,66)	17,38 (± 1,51)	557,75 (± 78,09)	97,25 (± 16,88)	36,63 (± 12,51)	3.074,25 (± 435,75)
Post .....	200,76 (± 266,12)	24,75 (± 5,95)	479,75 (± 111,05)	89,63 (± 19,28)	32,86 (± 10,22)	2.513,63 (± 459,13)
Normales .....	20-300 (+)	> 27 (+)	472,33 (± 68,02) (++)	65,08 (± 15,01) (++)	37,67 (± 10,22) (++)	2.667,10 (± 309,48) (++)

(\*) Diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre pre y postratamiento.

(+) Valores de referencia del laboratorio.

(++) Valores de un grupo control de 12 sujetos adultos sanos.

VM: Vida media eritrocitaria; MDA: Acido malonildialdehído; GSH: Glutación reducido; GPX: Glutación peroxidasa; SOD: Superóxido dismutasa.

algunas moléculas de mediano tamaño, presentes en el plasma de estos pacientes, puedan causar deterioro en los hematíes, con la consiguiente predisposición a la hemólisis. Uno de los mecanismos propuestos por el que estas sustancias podrían favorecer la hemólisis sería la acción oxidante que ejercerían sobre los hematíes<sup>13</sup>. En nuestros resultados se confirma la existencia de un acortamiento de la vida media eritrocitaria de estos pacientes antes de ser sometidos a tratamiento. Tras la administración periódica de EPOrHu se produce una notable mejoría en la supervivencia eritrocitaria, lo que también ha sido recientemente comprobado por Esbach<sup>14</sup> al estudiar una serie de ocho pacientes tratados con EPOrHu. Dado que la agresión exógena a la que están sometidos los hematíes en los pacientes urémicos no debe modificarse por el tratamiento con EPO, el alargamiento de la vida media observado debe ser consecuencia de una modificación en el metabolismo intrínseco del hematíe, la cual podría ser inducida por un mejor proceso madurativo de los precursores eritroides en la médula ósea.

Si la prolongación de la vida media eritrocitaria está relacionada con cambios en los mecanismos de defensa que el hematíe posee frente a la agresión oxidativa es difícil todavía de determinar. El MDA eritrocitario de estos pacientes está elevado en condiciones basales, y persiste todavía alterado tras el tratamiento con EPO. El hallazgo de un MDA elevado en los pacientes urémicos, que ya fue descrito en un trabajo previo<sup>6, 7</sup>, indica que el hematíe está sometido a una mayor agresión oxidativa o que sus sistemas de defensa frente a esa agresión están alterados o bien a la conjunción de ambos hechos a la vez. En nuestros resultados del estudio basal se observa una alteración de estos sistemas de defensa con un aumento de GSH y de la actividad de SOD, contribuyendo este hecho a mantener la discrepancia de valores observada hasta ahora por otros autores<sup>12, 15</sup>. El incre-

mento de la actividad enzimática puede traducir la existencia de una población eritroide joven con mayor carga enzimática global como consecuencia del acortamiento de la vida media eritrocitaria en estos pacientes, al igual que ocurre con otras enzimas en patologías con predominio de hematíes jóvenes<sup>8</sup>. Podría ocurrir además que esta carga enzimática aumentara como resultado de una maduración eritroide en un ambiente urémico con más elementos oxidantes en el medio. Tras el tratamiento con EPO, la actividad enzimática tiende a normalizarse, aunque las diferencias encontradas en este ensayo no sean estadísticamente significativas, y además, como hemos visto, se produce un alargamiento en la vida media de los hematíes. La concordancia de estos dos hechos daría mayor fuerza a la teoría de que las modificaciones enzimáticas encontradas fueran la consecuencia de las variaciones en la edad de la población eritroide.

Se desconoce la relación que pueda existir entre los cambios que se producen en la peroxidación de los lípidos de membrana y la mejoría de la vida media, así como de los mecanismos de defensa antioxidante de los eritrocitos tras el tratamiento con EPO. Será necesario en un futuro realizar estudios en grupos más amplios de pacientes para poder llegar a determinar cuál es el efecto que la EPO ejerce sobre el mecanismo de hemólisis y su posible relación con el metabolismo oxidativo del hematíe. No obstante, todo ello podría ser debido al efecto que la EPO posee sobre la proliferación y maduración de los precursores eritroides en la médula ósea.

#### Agradecimientos

Agradecemos a la ATS, del Servicio de Hematología, Consuelo Monleón, y a todo el personal técnico del Servicio de Nefrología (Unidad de diálisis), la colaboración técnica en la realización de este trabajo.

## Bibliografía

1. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR y Costes PM: Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 2:1175-1178, 1986.
2. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Vrowne JK y Adamson JW: Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316:73-78, 1987.
3. Joske RA, McAlister JM y Pranker TAJ: Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. *Clin Sci* 15:511-522, 1956.
4. Eschbach JW, Funk D, Adamson JW, Kuhn I, Scribner BH y Finch CA: Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis. *N Engl J Med* 276:653-658, 1976.
5. Fisher JW: Mechanism of the anemia of chronic renal failure. *Nephron* 25:106-111, 1980.
6. Giardini O, Tacconee-Galluci M, Lubrano R, Ricciardi-Tenore G, Bandino D, Silvi I, Ruberto U y Casciani CU: Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. *Nephron* 36:235-237, 1984.
7. Miguel A, Linares M, Pérez A, Moll A, Sanchís J, Escobedo JM y Miguel Borja JM: Evidence of an increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. *Nephron* 50:64-65, 1988.
8. Dacie J: The haemolytic anaemias. Vol. 1. Ed. Churchill Livingstone. Edinburgh, 1985.
9. Tawata Y, Howe R y Jacob H: Abnormal red cell metabolism causing hemolysis in uremia. A defect potentiated by tap water hemodialysis. *Ann Intern Med* 79:362-367, 1973.
10. Beutler E: Red cell metabolism. 3 ed. Grune and Stratton. London, 1984.
11. Stocks J y Dormandy TL: The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Brit J Haematol* 20:95-111, 1971.
12. Leber HW, Spiegelhalter R, Ulm A, Goubeaud G y Rawer P: Influence of middle molecules on the anemia of uremic patients. *Artif Organs* 2:378-381, 1978.
13. Summerfield GP, Gyde OH, Forbes AMH, Goldsmith HJ y Bellingham AJ: Haemoglobin concentration and serum erythropoietin in renal dialysis and transplant patients. *Scand J Haematol* 30:389-400, 1983.
14. Eschbach JW: The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int* 35:134-148, 1989.
15. Vanella A, Geremia E, Pinturo R, Tiriolo C, Custorella A, Condorelli G y Giglio A: Superoxide dismutase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis. *Acta Haematol* 70:312-315, 1983.