



Respuesta reticulocitaria tras cese inmediato de administración de eritropoyetina recombinante humana en enfermos en hemodiálisis crónica. Implicaciones en la terapia de la anemia

C. Caramelo, C. Soto, F. Neira, M. D. López, S. Jiménez, M. Albalate, R. de Oña, P. Llamas y J. J. P. Deudero

Servicios de Hematología y Nefrología. Clínica de la Concepción. Universidad Autónoma de Madrid. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN). Madrid. España.

Parte de estos datos se presentó en forma de resumen en el XXXIII Congreso de la SEN de Palma de Mallorca (2003), habiendo recibido el Primer Premio de Posters.

RESUMEN

La retirada brusca del tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) en pacientes con insuficiencia renal crónica provoca la reaparición de anemia. Sin embargo, los mecanismos de este fenómeno no se conocen suficientemente. El presente estudio examina la respuesta a la retirada brusca de rHuEPO en pacientes en hemodiálisis crónica (HD).

El estudio se realizó en 10 pacientes en HD que recibían habitualmente rHuEPO. La administración de rHuEPO se interrumpió durante 7 días, tras los cuales se reinició. A los 0, 7 y 15 días, se midieron hemoglobina, hematocrito y el patrón de maduración de los reticulocitos. Con el fin de determinar el papel específico de la uremia en los fenómenos observados, se realizó un estudio complementario en 10 ratas Wistar tratadas con rHuEPO. Tras dos semanas con rHuEPO, se retiró el tratamiento a la mitad de los animales mientras que se mantuvo en el resto otra semana más. Se determinaron hemoglobina, hematocrito y patrón de maduración de reticulocitos.

Los cambios observados en los distintos subtipos reticulocíticos entre el día 0 y el día 7 fueron los siguientes: reticulocitos totales: $18,2 \pm 0,9$ vs $14,3 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$); alta fluorescencia (HFR): $2,6 \pm 0,4$ vs $0,75 \pm 0,2\%$ ($p < 0,001$); fluorescencia media (MFR): $13,0 \pm 1,1$ vs $6,6 \pm 0,9\%$ ($p < 0,02$); y baja fluorescencia (LFR): $84,2 \pm 1,4$ vs $92,7 \pm 1\%$ (p NS). El nivel basal (día 0) se recuperó a los 7 días de comenzar de nuevo la administración de rHuEPO (p NS). Los valores de hemoglobina y hematocrito disminuyeron al final del estudio (día 14) a pesar de reiniciarse la rHuEPO el día 7 ($p < 0,02$). Cambios similares se observaron en las ratas no urémicas.

Recibido: 12-I-2004.

En versión definitiva: 12-IV-2004.

Aceptado: 19-IV-2004.

Correspondencia: Dr. Carlos Caramelo

Servicio de Nefrología

Clínica de la Concepción

Universidad Autónoma de Madrid

Av. Reyes Católicos, 2

28040 Madrid

E-mail: ccaramelo@fjd.es

La rHuEPO induce cambios relevantes en el patrón reticulocítico, provocando una reducción de las formas inmaduras. Este cambio es independiente del estado urémico del individuo y sugiere la conveniencia de no efectuar una retirada brusca del tratamiento crónico con rHuEPO.

Palabras clave: **Suspensión de eritropoyetina. Reticulocitos inmaduros. Hemodiálisis. Ratas normales. Detección del uso de eritropoyetina.**

RETICULOCYTE RESPONSE AFTER IMMEDIATE WITHDRAWAL OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN IN CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

The sudden interruption of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in end-stage renal disease (ESRD) patients leads to rapid anemization. The mechanisms of this phenomenon are, however, insufficiently understood. The present study examined the response to immediate rHuEPO withdrawal in dialysis patients.

Methods: 10 chronic hemodialysis (HD) patients regularly receiving rHuEPO were studied. rHuEPO was stopped and reinitiated after 7 days. Reticulocyte profile, haemoglobin and haematocrit were measured at 0, 7 and 15 days.

As a complementary study, and with the purpose of analyzing whether uremia was a relevant factor, 10 non-uremic male Wistar rats were treated with rHuEPO. After two weeks, rHuEPO was withdrawn in 5 animals, and continued for 7 additional days in the remainder. The same variables than in the human study were determined.

Results: Changes in reticulocyte subtypes from baseline to day 7 were: total 18.2 ± 0.9 vs $14.3 \pm 1.8\%$ ($p < 0.06$); high-fluorescence (HFR): 2.6 ± 0.4 vs 0.75 ± 0.2 ($p < 0.001$); medium-fluorescence (MFR): 13.0 ± 1.1 vs $6.6 \pm 0.9\%$ ($p < 0.02$); and low-fluorescence (LFR): 84.2 ± 1.4 vs $92.7 \pm 1\%$ (p NS). The baseline pattern was recovered upon 7 days of rHuEPO reinitiation (p NS). Mean hemoglobin and hematocrit decreased by day 14 ($p < 0.02$) in spite of rHuEPO reinitiation at day 7. In non-uremic rats, changes were similar to that in the ESRD patients.

Conclusion: rHuEPO induces changes in the reticulocyte pattern, consisting in a reduction of immature reticulocytes. These changes appear to be independent of the presence of uremia. Accordingly, complete rHuEPO withdrawal in HD patients will cause a rapidly-developing anaemia due to an alteration in the reticulocyte maturation series; therefore, sudden rHuEPO interruption should be avoided whenever is possible. As a collateral application, the specific changes described herein have potential use for detecting illegal administration of rHuEPO.

Key words: **Erythropoietin withdrawal. Immature reticulocytes. Hemodialysis. Normal rats. Detection of the illegal use of erythropoietin.**

INTRODUCCIÓN

La rHuEPO es el recurso terapéutico más importante aparecido en los últimos 15 años para el tratamiento de la anemia en la enfermedad renal^{1,2}. Durante la práctica diaria con pacientes de HD, hemos observado que la interrupción brusca de la

administración de rHuEPO, una vez conseguidos los valores hematológicos adecuados, lleva a una disminución en los valores de hemoglobina y hematocrito en un espacio de tiempo inesperadamente corto³. Con estos datos, una reducción progresiva de rHuEPO sería preferible frente a la retirada brusca, con el fin de atenuar la mencionada anemización.

Sorprendentemente, apenas hay datos previos sobre las bases patofisiológicas de este fenómeno; incluso en el ámbito experimental, la información disponible sobre el patrón eritropoyético tras la interrupción de la terapia con rHuEPO es muy escasa. Es este sentido, Piron y cols.⁴, en un estudio en ratas, determinó que el cese del tratamiento con rHuEPO llevaba asociado una posterior anemia secundaria⁴. El presente estudio se diseñó con el fin de examinar la respuesta a la retirada brusca de rHuEPO en pacientes con enfermedad renal en estadio final, mediante una herramienta sencilla, los índices reticulocíticos. El estudio complementario sobre ratas normales se realizó para comprobar la validez de los hallazgos obtenidos en pacientes urémicos en condiciones no urémicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo con pacientes

Estudiamos 10 pacientes con enfermedad renal en estadio terminal (hombre/mujer 5/5, edad media $65,7 \pm 3$ años) tratados en los últimos 6 meses, con HD hospitalaria según pautas habituales. Todos ellos presentaban valores de la cinética del hierro dentro del rango aceptado en pacientes en HD, incluyendo saturación de transferrina superior al 20% y ferritina sérica entre 100 y 300 ng/ml. Ninguno presentaba resistencia a la rHuEPO ni patología tumoral o inflamatoria. De manera habitual, todos ellos recibían rHuEPO alfa (iv, dosis media 8.555 ± 802 U/semana, $129,11 \pm$ U/kg/semana, 2 ó 3

veces/semana) para el tratamiento de la anemia, alcanzando niveles de hemoglobina o hematocrito (35% y 11,5 g/dl respectivamente) que permitían la retirada de la rHuEPO. Una vez obtenido el consentimiento escrito, se interrumpió la rHuEPO. Una vez obtenido el consentimiento escrito, se interrumpió la rHuEPO durante 7 días, tras los cuales se reinició su uso a la misma dosis empleada anteriormente (ver esquema en la fig. 1). El estudio se realizó a los días 0, 7 y 14, extrayéndose muestras de sangre al comienzo de la sesión de diálisis y analizándolas mediante el Automated Reticulocyte Analyzer Sysmex R-3500. Las muestras se incubaron con Auramine O y se procesaron en citómetro de flujo convencional, siguiendo las instrucciones del fabricante, previa validación en el Laboratorio de Hematología (Soto y cols., datos sin publicar). Este método permite distinguir tres patrones de fluorescencia: reticulocitos de alta fluorescencia (HFR), de media fluorescencia (MFR) y de baja fluorescencia (LFR). Estos patrones corresponden con el grado de maduración reticulocítica, desde inmaduros (HFR) a intermedios (MFR) y maduros (LFR)⁵.

Protocolo con animales

Para evaluar el posible papel de la uremia en los resultados obtenidos en pacientes, estudiamos 10 ratas Wistar macho tratadas con 200 U/kg de rHuEPO alfa sc dos veces a la semana durante dos semanas; tras este período, a 5 animales se les retiró la rHuEPO mientras que se continuó en los restan-

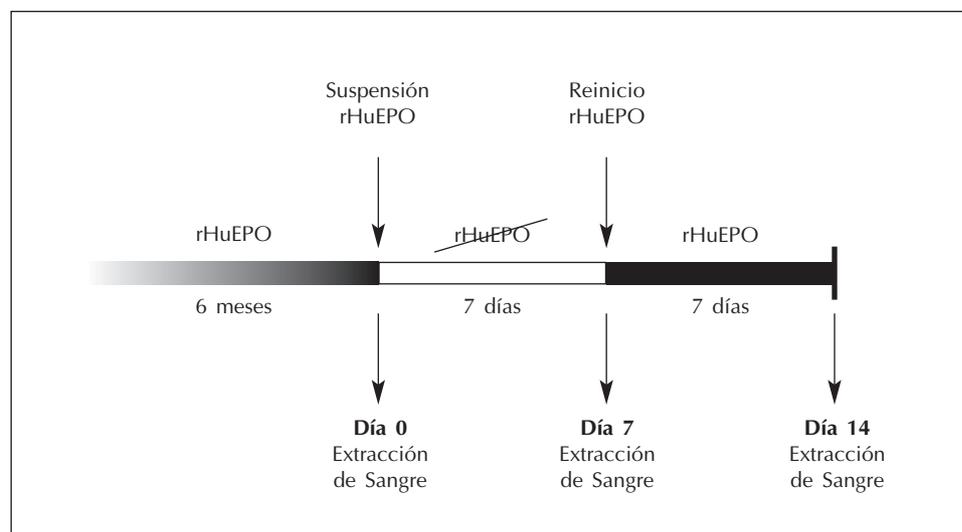


Fig. 1.—Esquema del protocolo seguido en el estudio de los pacientes.

tes durante otra semana más. Las mismas variables determinadas en los pacientes se midieron en las ratas a las 0 y 3 semanas, con excepción de los niveles de eritropoyetina. La dosis de rHuEPO se estableció mediante experimentos previos (100 a 250 U/kg p.c. de rHuEPO). Igualmente, la elección de tres semanas de seguimiento se basó en datos previos del Laboratorio, que indicaron que para inducir cambios significativos en los valores hematológicos, dos semanas de tratamiento con rHuEPO son mejores que una. El uso de animales frente a humanos como control sano se decidió tanto por razones éticas como prácticas.

Medición de eritropoyetina

Los niveles de eritropoyetina se midieron mediante un ELISA comercial (Quantikine IVD Erithropoietin, R & D Systems).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 10.0 (versión Windows). Una vez examinada la normalidad de la distribución de las variables, se realizaron ANOVA de una entrada, con pruebas de Fisher y Scheffé, o prueba «t» de Student emparejada. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Estudio con pacientes

A los siete días de retirar el tratamiento con rHuEPO, los valores medios de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hct) no se diferenciaban de los valores

basales (día 0) ($12 \pm 0,9$ vs $11,7 \pm 1,0$ g/dl y $37,3 \pm 1,2$ vs $35,8 \pm 0,4\%$, respectivamente, p NS). Sin embargo, tras 7 días del reinicio del tratamiento con rHuEPO, ambas variables habían disminuido respecto a los valores basales ($11,1 \pm 0,8$ y $34,0 \pm 1,6$, ambos $p < 0,02$).

Al mismo tiempo, los mayores cambios se encontraron en la distribución de los distintos subtipos de reticulocitos, como se muestra en la tabla I, donde están ordenados por su grado de maduración (alto, intermedio y bajo respectivamente). A los 7 días de retirar la rHuEPO, se observa una marcada disminución de las formas más inmaduras de reticulocitos ($p < 0,001$), el patrón reticulocítico volvió a valores similares a los basales (p NS) a los 7 días de reiniciar la rHuEPO (tabla I). En la tabla I también se muestran los cambios en el total de reticulocitos; como puede verse, se observa una disminución significativa tras los 7 días de retirada de la rHuEPO. Por el contrario, el total de reticulocitos aumentó sobre el valor basal a los 7 días de restaurar las dosis previas de rHuEPO.

Los niveles de eritropoyetina en el suero fueron $26,0 \pm 2,7$ mU/ml en el momento de cesar la rHuEPO, $10,1 \pm 2$ mU/ml tras los 7 días sin rHuEPO y $24,8 \pm 3,2$ mU/ml a los 7 días de reiniciar el uso de rHuEPO ($p < 0,01$ y NS respecto a los valores iniciales, respectivamente) (el valor de eritropoyetina en suero en una población sana del mismo origen es 5-25 mU/ml).

Estudio con animales

Las diferencias entre el grupo animal y los pacientes respecto a los valores basales fueron evidentes; las ratas mostraban niveles normales de hemoglobina y el porcentaje relativo de formas reticulocíticas presentaba una distribución diferente

Tabla I. Perfil reticulocítico de pacientes en diálisis tras retirada y reinicio de rHuEPO

Forma reticulocítica → Tiempo muestral ↓	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)	Total ret (o/oo)
Basal	$84,2 \pm 1,4$	$13,0 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,4$	$18,2 \pm 0,9$
7 días tras retirada de rHuEPO	$92,7 \pm 1$	$6,6 \pm 0,9^*$	$0,75 \pm 0,2^{**}$	$14,3 \pm 1,2\#$
7 días tras reinicio de rHuEPO	$84,7 \pm 2,2$	$12,3 \pm 1,4$	$3,0 \pm 1,8$	$23,7 \pm 4,3^*$

$p < 0,05$ respecto a los otros 2 tiempos.

* $p < 0,02$ respecto a los otros 2 tiempos.

** $p < 0,01$ respecto a los otros 2 tiempos.

LFR, MFR, HFR: Reticulocitos de baja, media y alta fluorescencia.

Ret = Reticulocitos.

Los porcentajes de LFR, MFR y HFR son respecto al total de reticulocitos.

a la observada en los pacientes. Por tanto, no se puede excluir el error sistemático debido a las variaciones interespecíficas, aunque esta circunstancia no debe afectar a la validez de los resultados, ya que se trata de comparaciones seriadas de muestras procedentes de individuos de un grupo genéticamente homogéneo de ratas.

En las ratas, los cambios observados ocurrieron siguiendo un patrón similar al descrito en los pacientes. En la tabla II se muestran los datos basales frente a los obtenidos tras 3 semanas del inicio del tratamiento, tanto en aquellos en los que se retiró la rHuEPO durante la tercera semana como los que mantuvieron este tratamiento a lo largo de todo el experimento (*p < 0,05 o **p < 0,01 respecto a las otras condiciones experimentales).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados añaden nuevos datos que pueden resultar útiles para el esclarecimiento de la patogénesis de la anemia producida por la interrupción brusca de rHuEPO en pacientes en HD. Estos pacientes no son capaces de producir la cantidad suficiente de eritropoyetina endógena y muestran resistencia periférica a la rHuEPO. En un estudio animal previo, Piron y cols., mostraban que la actividad eritropoyética, al cesar durante 3 semanas el tratamiento con rHuEPO, se reduce considerablemente⁴. Este grupo sugiere que esto podría representar un agotamiento medular intrínseco de actividad eritropoyética, sobre todo a nivel de células progenitoras⁴. Los resultados aquí reflejados son los primeros de este tipo obtenidos en humanos e identifican un rápido indicador de la depresión eritropoyética, la reducción significativa de las formas más inmaduras de reticulocitos. Además, nuestros resultados ponen de ma-

nifiesto la precocidad —tan solo una semana— de la aparición de alteraciones en la serie eritropoyética.

Aunque en los primeros días tras la interrupción de la rHuEPO no se observaron variaciones en el número de células rojas, nuestros datos reflejan un claro cambio de la regeneración eritropoyética en la médula ósea. Clínicamente, este hallazgo puede considerarse como un presagio de una próxima anemia si el tratamiento con rHuEPO no se reinicia. El hecho de que no se encuentre esta anemia en casos de tratamiento con rHuEPO una vez a la semana⁶ puede estar relacionados con que este proceso anémico podría ser un efecto transitorio no detectable y que acaba controlándose por las sucesivas inyecciones de rHuEPO.

Los resultados obtenidos en el estudio con animales demuestran que los hallazgos sobre el patrón reticulocítico en pacientes son aplicables tanto en condiciones urémicas como no urémicas.

Todos estos resultados, al considerarlos conjuntamente, indican que el ciclo de maduración eritropoyética, estimulado por la rHuEPO exógena, puede verse rápidamente frenado por la incapacidad de producir precursores eritropoyéticos en número suficiente para mantener la población reticulocítica. Este hecho puede requerir la administración continuada de rHuEPO para evitar un descenso en la eritrogénesis.

Una posible segunda aplicación de estos hallazgos sería su uso potencial como marcador indirecto de la interrupción reciente de rHuEPO usada de manera ilegal. Sobre este aspecto, aunque el uso de rHuEPO ha sido prohibido por el Comité Olímpico Internacional y las autoridades deportivas de todo el mundo, no hay disponible actualmente un método que, de manera inequívoca, detecte el abuso de rHuEPO. Se han propuesto distintas y complejas combinaciones de pruebas de laborato-

Tabla II. Perfil reticulocítico de pacientes en diálisis tras retirada y reinicio de rHuEPO

Variable → Tiempo muestral ↓	Hemoglobina (g/100 ml)	Hct (%)	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)	Total ret (o/oo)
Control	14,1 ± 0,4	42,3 ± 1,5	58,8 ± 0,1	28,7 ± 0,1	12,6 ± 0,1	27,3 ± 1,1
rHuEPO, 2 semanas, no rHuEPO, 1 semana	14,9 ± 0,3	43,6 ± 1,1	66,5 ± 3,3*	23,7 ± 2,1*	9,8 ± 1,5**	15,2 ± 1,4**
rHuEPO, 3 semanas	15,4 ± 0,2*	46,5 ± 1,5	57,5 ± 0,9	30,4 ± 0,4	13 ± 0,4	41,6 ± 2,5*

#p < 0,02 respecto a los otros 2 tiempos.

*p < 0,01 respecto a los otros 2 tiempos.

Hct = hematocrito.

LFR, MFR, HFR: Reticulocitos de baja, media y alta fluorescencia.

ret = reticulocitos.

Los porcentajes de LFR, MFR y HFR son respecto al total de reticulocitos.

rio, incluso algunas que emplean parámetros reticulocíticos; sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, ninguna de estas pruebas ha analizado los subtipos reticulocíticos⁷⁻⁸. Nuestras observaciones indican que en individuos sanos que han recibido rHuEPO, el patrón reticulocítico tras el cese de su uso podría apoyar, de manera convincente, la existencia de una administración y posterior retirada de la rHuEPO.

En conclusión, la rHuEPO induce un cambio significativo en la patrón de maduración eritropoyética, lo que implica una reducción evidente de las formas más inmaduras de reticulocitos tras el cese de la administración de rHuEPO. La posible consecuencia clínica de estos cambios sería el rápido desarrollo de una anemia grave si no se reinicia el tratamiento con rHuEPO.

Nuestros resultados advierten sobre la retirada brusca de la administración de la rHuEPO en pacientes en diálisis y aconsejan una retirada de un modo más progresivo. En este aspecto y en el referente a la detección del uso ilegal de rHuEPO, nuestros datos son susceptibles de aplicaciones prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. European Best Practice Guidelines for the Management of Anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 14 (Supl. 5): S1-S50, 1999.
2. National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for anaemia of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 37 (Supl. 1): S182-238, 2000.
3. Caramelo C, Jiménez S, Soto C, López MD, De Oña R, Deudero JJP, Llamas P, Neria F: Respuesta reticulocitaria a cese no paulatino de administración de eritropoyetina (EPO). Implicaciones en el tratamiento de la anemia en individuos urémicos. *Nefrología* 23 (Supl. 6): 70, Abstract 269, 2003.
4. Piron M, Loo M, Gothot A, Tassin F, Fillet G, Beguin Y: Cessation of intensive treatment with recombinant human erythropoietin is followed by secondary anaemia. *Blood* 97: 442-448, 2001.
5. Brugnara C: Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anaemias and monitoring of erythropoietic function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37: 93-130, 2000.
6. Cheung W, Minton N, Gunawardena K: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 411-418, 2001.
7. Magnani M, Corsi D, Bianchi M, Paiardini M, Galluzzi L, Gargiullo E, Parisi A, Pigozzi F: Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis* 27: 559-571, 2001.
8. Audran M, Gareau R, Matecki S, Durand F, Chenard C, Sicart MT, Marion B, Bressolle F: Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 31: 639-645, 1999.