

Cambios morfológicos en la médula ósea del insuficiente renal crónico durante el tratamiento con eritropoyetina

J. A. Bravo *, M.ª D. del Pino *, M. Almagro **, A. Cabrera **, A. Montes *, M. Benítez * y C. Asensio *

* Servicio de Nefrología. ** Servicio de Hematología. HGE Virgen de las Nieves (Granada).

RESUMEN

Utilizando las tinciones de May Grünwald y Perls describimos los cambios ocurridos en las médulas óseas de 14 pacientes con IRCT tratados durante veinticuatro semanas con eritropoyetina humana recombinante vía i.v., a dosis adecuada para conseguir y mantener el hematócrito en 30 %.

Pretratamiento encontramos una débil respuesta medular a la severidad de la anemia aun teniendo buenos niveles de B₁₂, ácido fólico y depósitos de hierro. Pero, iniciada la terapéutica, se manifiesta un incremento de los nidos eritroblásticos y células rojas en sus formas más jóvenes, dispersas o rodeando a las células reticulares. No apreciamos cambios evidentes en la serie blanca y megacariocitos.

La dosis semanal de eritropoyetina muestra una correlación 0,48 ($p < 0,05$) con el porcentaje de células rojas, que se incrementa en un grupo de cinco pacientes.

Palabras clave: **Eritropoyetina. Médula ósea.**

MORPHOLOGIC CHANGES IN BONE MARROW DURING ERYTHROPOIETIN TREATMENT IN CHRONIC RENAL PATIENTS

SUMMARY

Using the May-Grünwald and Perls stains, we describe the changes observed in the bone marrow of fourteen patients treated with human recombinant erythropoietin intravenously for twenty-four weeks, in appropriate dose to obtain and maintain an hematocrit over 30 %.

Prior to the treatment, the marrow is found to respond weakly to the severity of the anemia despite of good folate and B₁₂ levels and iron deposits. However, when therapy is started, an increase is seen in the erythroblastic nests and younger red cell forms, which are either scattered or surrounding the reticular cells. No evident changes in the white and megakaryocytic series are noted.

The weekly dose of erythropoietin shows a correlation 0.48 ($p < 0.05$) with the percentage of red cells, which is increased in a group of five patients.

Key words: **Erythropoietin. Bone Marrow.**

Correspondencia: Dr. Juan Antonio Bravo Soto.
Servicio de Nefrología.
HGE Virgen de las Nieves.
Avda. Coronel Muñoz, 2.
18014 Granada.

Introducción

De las sustancias conocidas que favorecen la eritropoyesis —interleukina 1- α , interleukina 3, factores estimuladores de colonias, ácido retinoico-cis y eritropoyetina (EPO)—, la más conocida es la última por su aplicación y buenos resultados en el tratamiento del síndrome anémico de la insuficiencia renal crónica (IRC)^{1,2}. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones referentes a los efectos en médula ósea (MO) de esta glicoproteína se basan en estudios *in vitro*, habiéndose comprobado su actividad sobre las CFU-E^{3,7}, BFU-E maduras^{3,7} y proeritroblastos⁸. Otros estudios encuentran también un efecto sobre las células progenitoras multipotenciales CFU-GEMM^{9,10}, las unidades formadoras de colonias granulomonocíticas CFU-GM¹¹ y salida de reticulocitos a sangre periférica¹².

Pero las técnicas de cultivos celulares no nos permiten apreciar la morfología de la MO y sus cambios, ya que los precursores identificables con ellas no son reconocibles con las tinciones habituales del aspirado medular.

Por este motivo diseñamos un estudio prospectivo y longitudinal en un grupo de pacientes con IRC tratados con eritropoyetina humana recombinante (rHuEPO) y en el que correlacionamos los cambios morfológicos observados en MO con la dosis de hormona administrada, nivel de EPO y respuesta en sangre periférica.

Material y métodos

Pacientes

Sobre una población de 133 pacientes en IRC y programa de hemodiálisis (HD) establecimos unos criterios de selección que incluían tener hematócrito igual o inferior a 23 %, llevar más de seis meses en programa y recibir al menos una transfusión al mes. Al tiempo excluimos los que presentaban pérdidas sanguíneas, trombosis, hipertensión arterial moderada-grave, insuficiencia respiratoria, procesos infecciosos, hepatopatías, tumores, tratamiento con citostáticos y niveles de aluminio superiores a 175 mcg/litro. Estos criterios los cumplían 26 pacientes de los que, debidamente informados, aceptaron 23 y terminaron el estudio 14 (tasa de participación = 0,54).

Diez eran hembras y cuatro varones, con edad media de 51,41 años (σ : 17,52) y aclaramiento de creatinina residual 0,73 cc/mn (σ : 1,09).

La etiología de la IRC fue: pielonefritis crónica, cuatro casos; glomerulonefritis crónica en cinco, una vasculitis, un síndrome de Alport y en tres la etiología era desconocida.

Todos recibieron rHuEPO (Cilag o Boehringer Mannheim) por vía i.v. a una dosis inicial de 50 UI/kg/postsesión HD, que se iba modificando hasta conseguir y mantener una hematócrito igual a 30 %. También recibieron aporte de hierro oral para mantener la ferritina sérica entre 30 y 300 ng/ml, y ácido fólico posthemodiálisis.

Determinaciones analíticas

Realizadas en las semanas cero, tercera, novena, dieciséis y veinticuatro.

Dos observadores «ciegos» sobre 500 células de MO, obtenidas por punción esternal y teñidas con May Grunwald y Perls, cuantificaron el porcentaje de células rojas, células blancas y variedades, y calcularon la relación mieoeritroide. También, sobre 100 células rojas, determinaron la proporción de proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos y eritroblastos ortocromáticos.

Hicieron una valoración cualitativa (bajo-normal-alto) de la celularidad global, nidos eritroblásticos, hierro reticular, hierro sideroblástico y megacariocitos.

Paralelamente en sangre periférica determinamos al inicio de la semana correspondiente y prediálisis: hematócrito, hemoglobina, reticulocitos absolutos, índice de producción reticulocitaria (IPR), ferritina (RIA), eritropoyetina (RIA-INCSTAR), vitamina B₁₂ y ácido fólico.

Estudio estadístico

Una vez comprobado con la prueba de Kolmogorov-Smirnov que las variables cuantitativas seguían una distribución normal, aplicamos el test de Student (muestras apareadas), coeficiente de correlación, regresión lineal y ajuste de curvas. En el caso de las cualitativas utilizamos el test de comparación de dos proporciones. Todos los cálculos se hicieron con el programa R-Sigma.

Para ver la concordancia entre los observadores determinamos el coeficiente Kappa, que osciló entre 0,5 y 0,7 según el parámetro cualitativo analizado, mejorando cuando fusionamos las categorías normal y alta.

Resultados

Pretratamiento (tablas I y II)

A pesar de la anemia tan importante de nuestros pacientes (Hto: 20,1 %; σ : 1,6) es evidente una escasa regeneración medular, lo que se refleja en una relación mieo-eritroide algo elevada (M/E: 3,6; σ : 0,9), nidos eritroblásticos disminuidos en el 90 % de los pacientes e IPR por debajo de la normalidad (0,27; σ : 0,2). A su vez, los reticulocitos absolutos (25.409 mm³; σ : 15.500) y EPO sérica (14,57 mU/ml; σ : 7,5) muestran unos valores desproporcionadamente bajos en relación a la anemia. Todo ello a pesar de tener las células reticulares con hierro normal o alto en el 75 % de los casos y ferritina, ácido fólico y vitamina B₁₂ normales o elevados.

Posttratamiento (tablas I y II)

Con este modelo y método no hemos observado efectos sobre las células blancas y megacariocitos. Tan sólo se

Tabla I. Evolución de los parámetros en MO y sangre periférica durante el tratamiento con r-HuEPO i.v.

Semana	0	3.*	9.*	16.*	24.*
r-HuEPO i.v. (UI/kg/sem.)	0	129 ± 14	197 ± 64	183 ± 126	180 ± 166
% células rojas (MO)	17,6 ± 4,2	28 ± 9*	30 ± 9*	20 ± 7,2	23 ± 11
Relación M/E	3,6 ± 0,9	2,3 ± 0,8*	2,2 ± 1,1*	3,5 ± 1,7	2,9 ± 1,8
% proeritroblastos	2 ± 2,1	3 ± 2,6	4,3 ± 2*	3,6 ± 2,1	3,1 ± 1,8
% eritrob. basóf.	13,5 ± 5,3	14,2 ± 6,8	18,7 ± 6,1	17,4 ± 6,3	14,2 ± 5,4
% eritrob. policr.	36,4 ± 7,9	35,7 ± 8,8	38,7 ± 5,4	43,3 ± 7,5*	41,9 ± 8,6
% eritrob. ortocr.	48 ± 12,8	46,7 ± 15,5	38,1 ± 8,2	35,5 ± 11,3	40,9 ± 10
Hematócrito	20,1 ± 1,6	22 ± 1,8	27,5 ± 3,5*	30,9 ± 4,5*	29,5 ± 3*
Reticulocitos	25.409	40.854*	49.616*	49.949*	56.452*
IPR	0,27 ± 0,2	0,45 ± 0,22*	0,64 ± 0,36*	0,6 ± 0,35*	0,82 ± 0,5*
EPO (mU/ml)	14,5 ± 7,5	14,7 ± 5,4	14,7 ± 8,6	14,8 ± 5,9	19,1 ± 6,8*
Ferritina (ng/ml)	384,6 ± 574	340 ± 546	368 ± 623	331 ± 321	224 ± 256

* Diferencia significativa respecto al tiempo cero ($p < 0,05$).

El porcentaje de proeritroblastos, E. basófilos, E. policromatófilos y ortocromáticos es sobre 100 células rojas, mientras que el de estas últimas es referente a la celularidad global (500 células).

Tabla II. Evolución de los parámetros cualitativos en MO durante el tratamiento con r-HuEPO

Semana	0	3.*	9.*	16.*	24.*
Cellularidad global baja	41,6 %	46,1 %	15,38 %	25 %	18,1 %
Nidos eritroblástico bajos	90 %	66,6 %	23,07 %*	33,3 %*	27,7 %*
Hierro sideroblástico bajo	75 %	30,76 %*	33,3 %	33,3 %	18,2 %*
Hierro macrofágico bajo	25 %	30,76 %	33,3 %	25 %	18 %

Los valores expresan el porcentaje de pacientes con el parámetro disminuido. El resto lo tenía normal o alto.

* Diferencia significativa respecto a la semana 0 (pretratamiento).

ha encontrado sobre las células rojas, cuyo porcentaje aumenta significativamente en la tercera y novena semanas, manteniéndose por encima del nivel pretratamiento en la veinticuatro.

Los proeritroblastos, eritroblastos basófilos y eritroblastos policromatófilos incrementan sus porcentajes, pero lo hacen de forma significativa: los primeros, en la novena semana, y los últimos, en la dieciséis. En la veinticuatro descienden las tres series, pero aun así están más elevadas que al inicio.

Por el contrario, los eritroblastos ortocromáticos muestran un descenso porcentual durante casi todo el tratamiento y muestran una recuperación incompleta al final. Presentan una correlación $-0,7$ y $-0,68$ ($p < 0,05$) con los eritroblastos basófilos y policromatófilos, respectivamente.

Como se ha dicho, pretratamiento, la mayoría de los pacientes tienen nidos eritroblásticos disminuidos o despopulados de células rojas, hecho que empieza a corregirse muy pronto, se hace significativo en la novena semana, manteniéndose estable posteriormente (fig. 1). Fenómeno parecido ocurre, aunque no tan manifiesto, con los sideroblastos. Sin embargo, no se aprecian cambios sustanciales en el hierro reticular.

En el conjunto de pacientes existe una correlación débil, $0,48$ ($p < 0,05$), entre el porcentaje de células rojas en MO y la dosis semanal de rHuEPO (fig. 2). Curiosamente,

al realizarla por individuos hemos podido separar un grupo de cinco pacientes en los que es más fuerte ($r: 0,8-0,58$), y buscando una ecuación de regresión alternativa a la lineal para ellos, la que más se adapta es la recíproca (fig. 3). Este mismo fenómeno lo hemos apreciado respecto al hematócrito.

Sorprendentemente no hemos encontrado correlación significativa entre los cambios observados en MO, el nivel de EPO y la respuesta en sangre periférica.

Discusión

Nuestro trabajo demuestra, previo al tratamiento con rHuEPO i.v., una MO con eritropoyesis poco efectiva aun disponiendo de hierro reticular y factores vitamínicos.

Una vez iniciada la terapéutica ocurre un cambio llamativo en la serie roja, con incremento de sus células y el porcentaje de las formas más jóvenes. Es posible que el descenso en las últimas semanas de los proeritroblastos, eritroblastos basófilos y policromatófilos, coincidiendo con el aumento de los ortocromáticos, se deba al paso de los primeros a la forma más madura.

Otro cambio morfológico a destacar es el aumento o realce de los nidos eritroblásticos, lo que debe tener importancia en la maduración de los eritroblastos y capta-

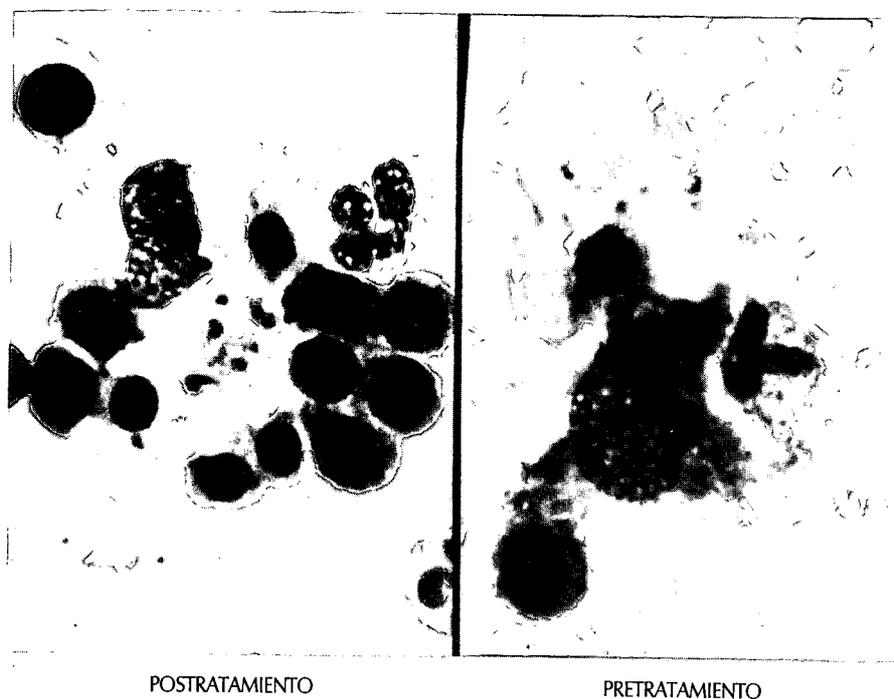


Fig. 1.—Imagen de un nodo eritroblástico pre y postratamiento con r-HuEPO i.v.: Mientras que antes de la terapéutica la célula reticular está casi despoblada de eritroblastos, tras la administración del fármaco se rodea llamativamente por éstos, convirtiéndose en una verdadera «célula nodriza».

ción de hierro por rofeocitosis. La mejora en la utilización del hierro la apreciamos también por el incremento de los sideroblastos.

Estos hechos expresan, sin lugar a dudas, el paso de una mala a una buena eritropoyesis al administrar el fármaco, situación no conseguida con otros tratamientos. No obstante, queremos recalcar que estos cambios pueden ser consecuencia de su acción a niveles anteriores y no directamente sobre las células que hemos cuantificado.

La rHuEPO se considera tiene un efecto dosis-dependiente¹³. Somos de la opinión que es más cierto para el individuo que para el colectivo, pues no necesariamente el de mayor dosis tiene mejor respuesta; sin embargo, en un mismo sujeto sí la hay a mayor cantidad administrada.

Valorado el efecto como porcentaje de células rojas en MO, hemos encontrado una débil correlación significativa con la dosis semanal y se ha podido aislar un grupo donde la relación es más fuerte y predecible mediante una ecuación recíproca. El resto no tiene este comportamiento. Todo ello nos induce a pensar en la importancia del componente individual en la respuesta, posiblemente relacionado con los inhibidores de la eritropoyesis, hiperparatiroidismo, niveles de aluminio intracelular u otros factores desconocidos.

La falta de correlación entre los cambios en MO y la EPO sérica medida al inicio de semana, prediálisis, se puede deber a que un nivel tardío no es representativo del efecto conseguido, pues la cinética del fármaco es monoexponencial, con una T1/2 en nuestros pacientes de 6,44 horas (σ : 2,9)¹⁴ y los niveles alcanzados tras la administración (Cmax) muy altos. Seguramente el efecto depende de ellos, del área situada bajo la curva o al efecto

acumulativo de las dosis. Por tanto, esta determinación aislada no tiene valor para predecir la respuesta.

Quizá lo más sorprendente de este estudio es la inexistencia de correlación entre los cambios morfológicos en MO y la respuesta periférica. La explicación puede estar en el desfase de los fenómenos: lo que ocurre en MO no se refleja inmediatamente en la sangre, y aquí de nuevo el factor individuo debe ser determinante.

Bibliografía

1. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne 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 Eng J Med*, 316:73-78, 1987.
2. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR y Cotes PM: Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet*, 8517:1175-1178, 1986.
3. Gregory CJ: Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system. Studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J Cell Physiol*, 89:289-302, 1976.
4. Gregory CJ y Eaves AC: Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biological properties. *Blood*, 51:527-537, 1978.
5. Hara H y Ogawa M: Erythropoietic precursors in mice under erythropoietic stimulation and suppression. *Exp Hematol*, 5:141-148, 1977.
6. Mladenovic J, Eschbach JW, García JF y Adamson JW: The anaemia of chronic renal failure in sheep: studies *in vitro*. *British Journal of Haematology*, 58:491-500, 1984.
7. Carozzi S, Nasini MG y Lamperi S: Tratamiento con eritropoyetina humana recombinante y con ácido retinoico-CIS en pacientes en hemodiálisis y diálisis peritoneal. *Eritropoyetina*. Springer-Verlag Ibérica, pp. 146-155, 1990.

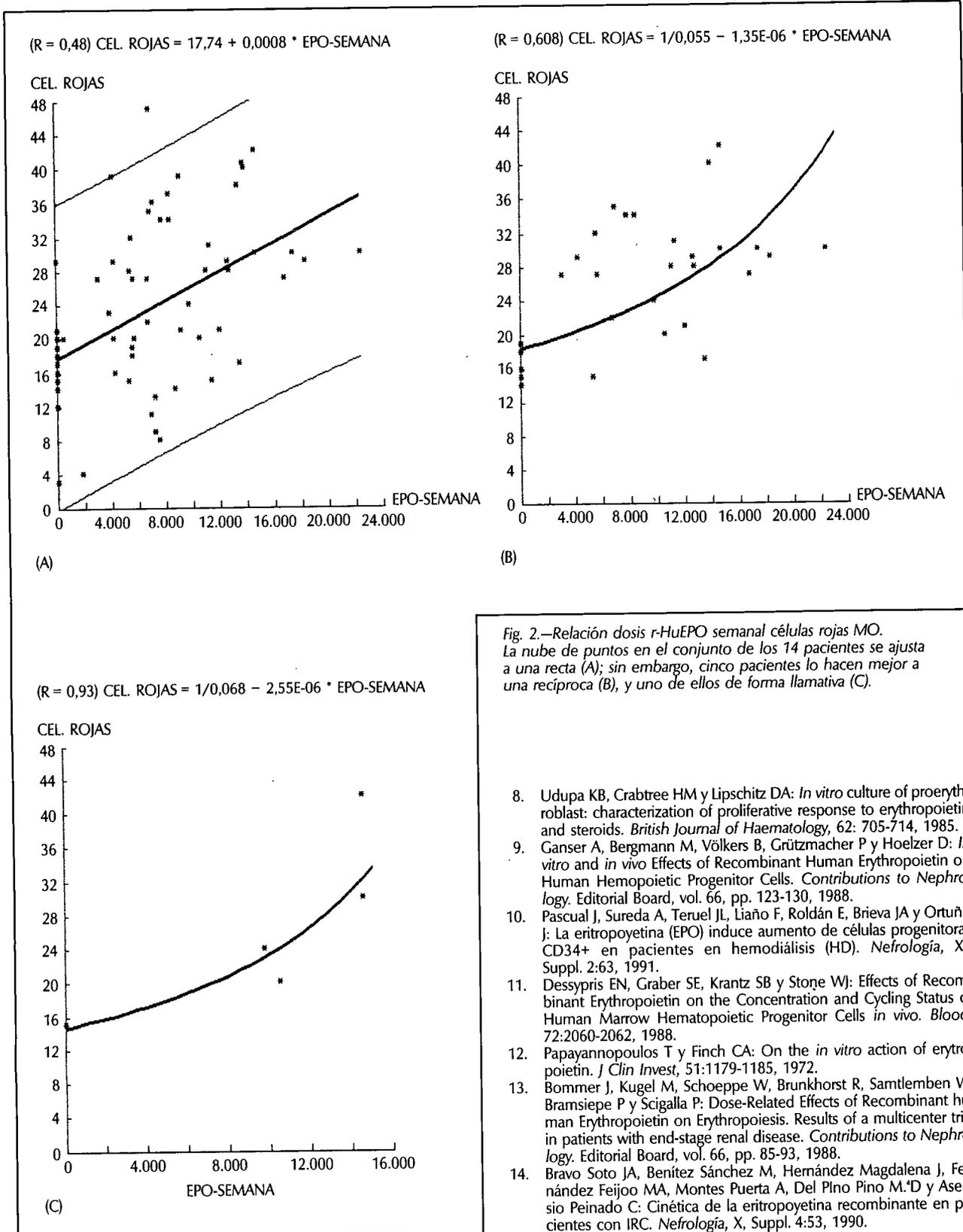


Fig. 2.—Relación dosis r-HuEPO semanal células rojas MO. La nube de puntos en el conjunto de los 14 pacientes se ajusta a una recta (A); sin embargo, cinco pacientes lo hacen mejor a una recíproca (B), y uno de ellos de forma llamativa (C).

8. Udupa KB, Crabtree HM y Lipschitz DA: *In vitro* culture of proerythroblast: characterization of proliferative response to erythropoietin and steroids. *British Journal of Haematology*, 62: 705-714, 1985.
9. Ganser A, Bergmann M, Völkers B, Grützmacher P y Hoelzer D: *In vitro* and *in vivo* Effects of Recombinant Human Erythropoietin on Human Hemopoietic Progenitor Cells. *Contributions to Nephrology*. Editorial Board, vol. 66, pp. 123-130, 1988.
10. Pascual J, Sureda A, Teruel JL, Liaño F, Roldán E, Brieva JA y Ortuño J: La eritropoyetina (EPO) induce aumento de células progenitoras CD34+ en pacientes en hemodiálisis (HD). *Nefrología*, XI, Suppl. 2:63, 1991.
11. Dessypris EN, Graber SE, Krantz SB y Stone WJ: Effects of Recombinant Erythropoietin on the Concentration and Cycling Status of Human Marrow Hematopoietic Progenitor Cells *in vivo*. *Blood*, 72:2060-2062, 1988.
12. Papayannopoulos T y Finch CA: On the *in vitro* action of erythropoietin. *J Clin Invest*, 51:1179-1185, 1972.
13. Bommer J, Kugel M, Schoeppe W, Brunkhorst R, Samtleben W, Bramsiepe P y Scigalla P: Dose-Related Effects of Recombinant human Erythropoietin on Erythropoiesis. Results of a multicenter trial in patients with end-stage renal disease. *Contributions to Nephrology*. Editorial Board, vol. 66, pp. 85-93, 1988.
14. Bravo Soto JA, Benítez Sánchez M, Hernández Magdalena J, Fernández Feijoo MA, Montes Puerta A, Del Pino Pino M.D y Asensio Peinado C: Cinética de la eritropoyetina recombinante en pacientes con IRC. *Nefrología*, X, Suppl. 4:53, 1990.