

## Rassegna

# L'eritropoietina e la cardiopatia ischemica: un nuovo attore tra apoptosi e angiogenesi cardiovascolare

F. Floccari<sup>1</sup>, L. Di Lullo<sup>2</sup>, P. Polito<sup>2</sup>, M. Malaguti<sup>1</sup>, M. Buemi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale San Paolo, Civitavecchia

<sup>2</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale San Giovanni Evangelista, Tivoli

<sup>3</sup>Cattedra di Nefrologia, Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Messina, Messina



Fulvio Floccari

## Introduzione

L'eritropoietina è universalmente intesa come l'ormone responsabile del mantenimento della massa eritrocitaria. Sintetizzata dal rene, essa svolge tale ruolo promuovendo la differenziazione delle cellule eritroidi midollari e prevenendone la morte cellulare

programmata, ossia l'apoptosi.

L'eritropoietina appartiene in realtà a un complesso sistema di biofeedback, caratteristico degli organismi superiori, chiamato a gestire il delicato equilibrio dell'afflusso di ossigeno ai tessuti.

I tessuti biologici vivono infatti un rapporto conflittuale con uno degli ingredienti irrinunciabili della vita. L'ossigeno, indispensabile alla biochimica degli eucarioti, è infatti anche una pericolosa sorgente di radicali liberi. Il fragile equilibrio tra prosperità e morte, vita e invecchiamento, dipende pertanto in maniera cruciale dalla capacità degli organismi complessi di dotarsi di un sistema che adegui tempestivamente il carico di ossigeno ai tessuti al loro fabbisogno, prevenendone l'eccesso quanto il difetto.

Negli ultimi quindici anni, la letteratura scientifica ha visto crescere il numero di tipi cellulari, estranei al midollo osseo, dotati di recettori per l'eritropoietina. Si è andato così componendo un puzzle che ha aperto alla fisiologia di questo ormone un orizzonte sempre più ampio.

L'eritropoietina ha mostrato di possedere pertanto, oltre alle note azioni endocrine, una serie di attività autocrine e

paracrine, totalmente sganciate dall'azione letteralmente eritropoietica, e che ne fanno, più ampiamente, il braccio effettore dell'HIF, il fattore inducibile dell'ipossia.

Scopo di questa review sarà illustrare brevemente le azioni dirette, non mediate dall'ematopoiesi, dell'EPO sull'apparato cardiovascolare e i loro potenziali utilizzi clinici.

## L'eritropoietina e la stabilità vascolare

In un recente lavoro apparso su *Journal of Clinical Investigation*, Chen et al illustrano in maniera affascinante il ruolo cruciale dell'eritropoietina nel mantenimento della "stabilità vascolare" (1).

I nostri Autori hanno condotto uno studio dal disegno estremamente elegante sul ruolo dell'eritropoietina nella retinopatia del pre-termine. Tale patologia è caratteristica dei neonati pre-maturi, esposti ad elevate tensioni atmosferiche di ossigeno. Tale insulto induce inizialmente la vaso-obliterazione del network vascolare retinico, come risposta adattativa che tenderebbe a ridurre l'eccessivo apporto di ossigeno.

A tale fase segue paradossalmente una condizione di ipossia periferica, un imponente stimolo alla neoangiogenesi, che conduce a fenomeni di massiva, disordinata angio-proliferazione patologica, assai simile a quanto si osserva nella retinopatia diabetica.

L'EPO ha mostrato di svolgere un ruolo centrale nelle singole fasi della malattia. All'iniziale iperossia si associa la soppressione dei livelli tissutali di mRNA per EPO. Ne consegue quindi l'impoverimento del network microvascolare della retina, per vaso obliterazione e ridotta neo-

angiogenesi. Segue nei giorni la brusca crescita dei livelli di mRNA per EPO e una fase di esuberante, patologica vaso-proliferazione retinica che conduce alla retinopatia proliferante e alla conseguente perdita di visus.

La somministrazione di EPO ad alte dosi (nell'ordine delle migliaia di UI per kg di peso corporeo) nelle prime giornate di vita del topino, mostra di ridurre notevolmente i fenomeni di vaso-obliterazione. Se invece la supplementazione con EPO è tardiva, a parità di dose e modalità di somministrazione, l'effetto ottenuto è opposto e il quadro vascolare appare ulteriormente compromesso da fenomeni di vaso-obliterazione e proliferazione aberrante.

In sintesi, in questo modello di patologia micro vascolare, l'eritropoietina appare cardinale nell'equilibrio dell'angiogenesi. Una soppressione iniziale dei livelli di EPO, compensatoria all'iperossia rilevata dai tessuti, conduce all'ipossia, quindi all'iperattivazione della stessa sintesi di EPO e alla conseguente angiogenesi patologica.

L'EPO si mostra, in questo studio, un affascinante agente autocrino e paracrino, capace di regolare l'apoptosi delle cellule endoteliali e l'effetto chemio-tattico delle cellule CD34+, progenitrici dell'endotelio (EPC).

Già nel 2002 Buemi et al erano riusciti a dimostrare la capacità dell'EPO, ad alte dosi, di accelerare la guarigione di ferite cutanee in ratti diabetici, mediante meccanismi pro-angiogenetici (2).

L'effetto proangiogenetico dell'EPO era a breve stato confermato nel lavoro di Heeschen et al, apparso su *Blood* nel 2003 (3).

In tale studio, sottoponendo dei ratti a legatura della arteria iliaca, si osservava come il trattamento con EPO ad alti dosaggi comportasse un sorprendente miglioramento della capacità di rivascolarizzazione dell'arto inferiore a confronto con ratti non trattati. Tale risposta appare basata sul reclutamento massivo di cellule CD34+ e quindi sull'attivazione del network dell'angiogenesi.

L'azione angiogenetica dell'eritropoietina, nello stesso studio, appare in tutta la sua efficacia quando gli stessi Autori dimostrano la formazione di un network di capillari addirittura in un disco di spugna di polivinile e milipore, posizionato chirurgicamente nel sottocute degli stessi animali prima del trattamento con EPO (3).

## L'eritropoietina e la cardio-protezione

La protezione d'organo è operata dall'EPO innanzitutto nella maniera più ovvia. La correzione dell'anemia elimina infatti uno degli stimoli più potenti allo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra, uno degli elementi fisiopatologici di base della cardiopatia ischemica.

L'EPO può però proteggere l'apparato cardiovascolare

in maniera totalmente indipendente dalla sua azione di regolazione della massa eritrocitaria.

La somministrazione di elevatissime dosi di EPO, in animali sottoposti a legatura delle coronarie, riduce infatti grandemente la mortalità e l'estensione dell'infarto in acuto, ossia ben prima che si possano osservare variazioni dell'ematocrito. La zona grigia peri-infartuale, negli animali trattati, mostra un numero di cardiomiociti in apoptosi estremamente ridotto. A ciò si associa l'attiva proliferazione dei cardiomiociti superstiti e l'afflusso copioso di EPC e cellule del midollo osseo, che acquisiscono fenotipo da cardiomiociti e riparano il danno muscolare e micro vascolare (4, 5).

Oltre alla ripopolazione della parete cardiaca con nuovi cardiomiociti e alla genesi di nuovi capillari, l'EPO promuove anche la maturazione delle arteriole cardiache collaterali ai vasi interessati dalla sindrome coronarica, così da supplire alla funzione perduta dal vaso occluso. Tale azione di stimolazione della genesi di nuove arteriole sarebbe addirittura preminente rispetto a quella operata sui vasi di minor calibro (6).

L'azione cardioprotettiva dell'EPO si avvera, per quanto sin qui descritto, tramite molteplici attori cellulari, ognuno dei quali chiamato ad assolvere una funzione specifica: cardiomiociti, monociti, EPC.

Si chiarisce sempre di più quindi come l'EPO sia il supervisore dello stato di ossigenazione tissutale, e che pertanto operi sia in chiave sistemica, gestendo la massa eritrocitaria circolante, sia in chiave locale con una moltitudine di azioni autocrine e paracrine. Quest'ultime mirano a garantire livelli di ossigeno efficaci e non tossici a ogni singola cellula, modulando la rete capillare e stimolando alla bisogna lo sviluppo di nuove arteriole. Esse inoltre entrano in gioco, in condizioni di ischemia, limitando i fenomeni apoptotici peri-necrotici e chiamando forze fresche a tutela del microambiente tissutale.

Le potenziali applicazioni cliniche di quanto sin qui esposto sono notevoli. L'interesse, anche economico, che esse destano è giustificato dal beneficio clinico atteso e dalle dimensioni epidemiologiche delle patologie in cui si avrebbe ragione di prevederne l'utilizzo.

Dosaggi così elevati di EPO sono ovviamente gravati dal rapido incremento dell'ematocrito che si produce rapidamente e dalle ben note conseguenze sul rischio trombo-embolico. La ricerca tecnologica in materia, stimolata da un notevole potenziale ritorno economico, si è allora messa alla caccia di varianti dell'eritropoietina che mantenessero le proprietà tissuto-protettive senza avere effetti ematopoietici.

Per meglio comprendere le diverse strategie utilizzate a tale scopo, occorre però che si rivedano rapidamente i meccanismi della fisiologia dell'eritropoietina.

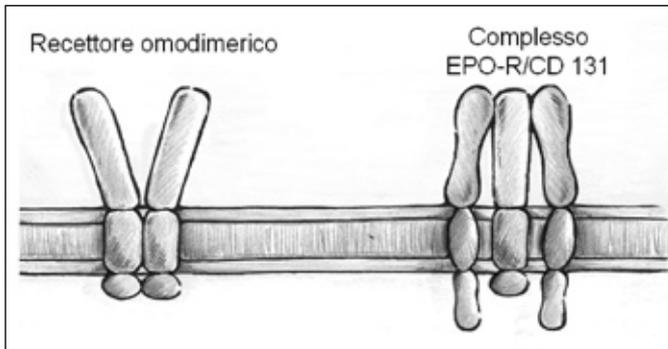


Fig. 1 - Recettori per l'eritropoietina.

## La protezione tissutale operata dall'eritropoietina: alcune note di fisiologia

**I recettori** - L'eritropoietina svolge la sua azione di regolazione della massa eritrocitaria tramite un recettore caratteristico. Esso è composto da due identiche, singole sub-unità, presenti come monomeri sulla superficie cellulare, forzate a formare un complesso omodimerico dall'interazione con la molecola dell'eritropoietina (Fig. 1). Tale azione si riconduce alla sintesi renale di eritropoietina, avviene pertanto a concentrazioni ematiche di eritropoietina complessivamente basse, tali da essere simulate farmacologicamente da dosi di EPO ricombinante di 20-60 UI pro kg di peso corporeo.

L'azione tissuto-protettiva dell'eritropoietina sembra appartenere a un ambito di fisiologia totalmente differente. Due sono infatti i punti critici da analizzare: i meccanismi recettoriali e le concentrazioni di eritropoietina, caratteristici di questo secondo meccanismo.

Da quanto emerge dalla letteratura scientifica, l'azione tissuto-protettiva si avvera attraverso un meccanismo recettoriale alternativo a quello strettamente eritropoietico. Eritropoietine private della capacità di interagire con il recettore omodimerico, e pertanto incapaci di implementare la massa eritrocitaria, conservano infatti le peculiarità tissuto-protettive (7, 10).

Queste si avverano infatti grazie all'interazione con un recettore "ibrido", costituito da un dimero tra il CD131 (ossia il recettore per il G-CSF) e un monomero del recettore dell'eritropoietina (Fig. 1) (9).

**Le concentrazioni** - L'azione protettiva dell'eritropoietina sui tessuti è stata osservata a seguito della somministrazione di elevatissimi dosaggi di EPO, nella misura di 3000-5000 UI di EPO per kg di peso corporeo. Una dose sistemica così elevata, apparentemente lontanissima da

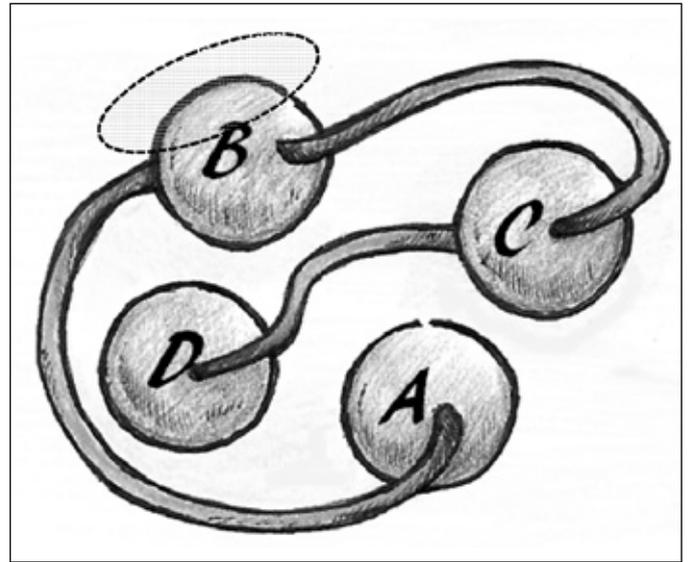


Fig. 2 - Struttura terziaria dell'EPO. Nel cerchio tratteggiato la porzione di  $\alpha$ -elica B rappresentata dal peptide BSP.

quella fisiologicamente prodotta da un rene sano, consente però di ottenere elevatissime concentrazioni locali di EPO, simili a quelle cui un tessuto ischemico darebbe luogo a seguito di secrezione autocrina e paracrina di ormone.

## Le idee per una EPO unicamente tissuto-protettiva

Come utilizzare allora delle dosi così elevate di EPO senza incorrere in indesiderati aumenti dell'ematocrito?

Una via ripetutamente percorsa a tal scopo è stata l'utilizzo di forme variamente manipolate dell'eritropoietina alfa, rese pertanto capaci di interagire solo con il recettore EPOR-CD131. Queste comprendono:

- una versione carbamidata dell'eritropoietina alfa, nota come CEPO (7, 8);
- peptidi isolati dalla  $\alpha$ -elica B dell'eritropoietina alfa (BSP, HBSP e p-HBSP), ossia da un piccolissimo tratto della superficie esterna della molecola dell'EPO (9) (Fig. 2).

Un'alternativa è stata quella di abbreviare grandemente l'emivita dell'EPO. Questa è regolata dall'elevato numero di residui di acido sialico, caratteristico della molecola. È stata pertanto sintetizzata la asialo-eritropoietina, privata completamente di tutti i residui di acido sialico, e dotata di una emivita di pochi minuti (10).

Queste forme sintetiche dell'EPO, somministrate ai dosaggi tissuto-protettivi dell'EPO naturale, hanno tutte mo-

strato di conservarne a pieno la capacità di ridurre l'apoptosi dei cardiomiociti e le dimensioni dell'area infartuata, senza indurre incrementi dell'ematocrito (7-10).

Una via alternativa alla manipolazione della struttura molecolare dell'EPO prevede invece l'utilizzo di *device* in gelatina, contenenti altissime concentrazioni di EPO naive, da posizionare con procedura endovascolare alle immediate adiacenze dell'area ischemica. Una esperienza di Kobayashi et al ha confermato come questi *device* garantiscano tutti i noti effetti tissuto-protettivi dell'EPO, ovviamente senza che si osservino variazioni dell'ematocrito (11).

Una innovativa applicazione dei concetti fin qui espressi risiede poi nella possibilità di transfettare il gene dell'EPO in cellule stromali del mesenchima, ossia cellule staminali. Le cellule sottoposte a questa procedura presentano una amplificata capacità di sopravvivenza e proliferazione, potenzialmente molto interessante in previsione di un loro utilizzo terapeutico in corso di patologia vascolare ischemica (12).

## Le azioni pleiotropiche dell'EPO in oncologia: un'arma a doppio taglio?

L'azione angiogenetica e antiapoptotica dell'EPO hanno indubbiamente anche aspetti controversi, in particolare in ambito oncologico.

Proprio i pazienti oncologici sono infatti quelli nei quali le dosi di EPO utilizzate nel management dell'anemia più si avvicinano a quelle viste adoperare negli studi di cardioprotezione.

L'utilizzo delle dosi pulsatili di EPO, in specie quando si utilizzano formulazioni long-acting, comporta il raggiungimento di concentrazioni ematiche molto lontane da quelle fisiologiche (almeno in relazione alla fisiologia "endocrina" dell'EPO). A queste concentrazioni indubbiamente si attivano le azioni pleiotropiche dell'EPO e, tra i tanti scenari plausibili, si potrebbe indurre una accelerazione della crescita e della vascolarizzazione di neoformazioni tumorali. Le linee guida oncologiche in materia di management dell'anemia danno rilievo ai rischi protrombotici e non a quelli pro-angiogenetici/apoptotici della terapia con EPO nel paziente neoplastico.

Ribatti et al hanno in realtà dimostrato come il sistema EPO/EPOR sia coinvolto nell'angiogenesi del carcinoma epatocellulare umano e nella progressione della malattia neoplastica. Questo suggerisce l'esistenza di un "loop" nel sistema EPO/EPOR: l'EPO è secreta dalle cellule tumorali e agisce con meccanismo paracrino sull'endotelio vascolare mediante i suoi recettori promuovendo l'angiogenesi (13).

L'EPO si è rivelata un importante fattore angiogenico anche in un modello di carcinoma mammario di roditore, ove ha mostrato di regolare l'induzione della neovascolarizzazione indotta dalle cellule tumorali e la crescita durante le fasi iniziali della cancerogenesi (14).

Nel management dell'anemia del paziente oncologico si potrebbe addirittura legittimare l'ipotesi di ribaltare l'idea del CEPO, così da ottenere una forma di EPO che mantenga la funzione eritropoietica, ma che sia privata delle azioni autocrine e paracrine pro-angiogenetiche.

## Conclusioni

In conclusione l'EPO, per molti anni intesa unicamente come agente eritropoietico *tout-court*, ha mostrato nel corso degli anni di essere l'elemento centrale di un complesso sistema che mantiene l'equilibrio tra ossigenazione periferica, stabilità vascolare e stress ossidativo. Al crescere delle conoscenze sulla fisiologia autocrina e paracrina dell'EPO, crescono le aspettative verso l'utilizzo clinico-pratico di tali conoscenze.

La promessa allettante è infatti quella di poter agire sull'albero micro vascolare coronarico, precluso alle attuali tecniche chirurgiche di rivascolarizzazione. L'entusiasmo di medici e ricercatori e quello dell'industria farmaceutica dovranno ora sposarsi alla cautela, necessaria a chi si prefigge di manipolare la chiave di volta dell'angiogenesi, cruciale nella fisiopatologia della cardiopatia ischemica come in quella della patologia neoplastica.

## Riassunto

L'eritropoietina, per molti anni intesa unicamente come principale regolatore della massa eritrocitaria circolante, ha svelato nel corso degli anni sempre nuove pagine di fisiologia, che l'hanno mostrata come elemento centrale di un complesso sistema che mantiene l'equilibrio tra ossigenazione periferica, stabilità vascolare e stress ossidativo.

Al crescere delle conoscenze sulla fisiologia autocrina e paracrina dell'EPO, sono cresciute le aspettative verso l'utilizzo clinico-pratico di tali conoscenze.

La presente review propone una rapida carrellata sulle diverse potenziali applicazioni dell'EPO nel management clinico della cardiopatia ischemica, con particolare riguardo alle strategie testate per ottenere gli effetti pleiotropici dell'EPO senza indurre indesiderati incrementi dell'ematocrito.

**Parole chiave:** Eritropoietina, Cardiopatia ischemica, Angiogenesi, Cardiomiociti

Indirizzo degli Autori:  
Fulvio Floccari, MD  
Via Monte Gennaro 30  
00010 San Polo dei Cavalieri, Roma  
fulviofloccari@gmail.com

---

## Bibliografia

1. Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LEH. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008; 118 (2): 526-33.
2. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, et al. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol* 2002; 82(6): 411-7.
3. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-6.
4. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003 112: 999-1007.
5. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* 2001, 98(18): 10344-9.
6. Imazuru T, Matsushita S, Hyodo K, et al. Erythropoietin enhances arterioles more significantly than it does capillaries in an infarcted rat heart model. *Int Heart J* 2008; 50: 801-10.
7. Moon C, Krawczyk M, Paik D, et al. Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties. *JPET* 2006; 316(3): 999-1005.
8. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *PNAS* 2005; 102(6): 2046-51.
9. Brines M, Patel NSA, Villa P, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *PNAS* 2008; 105 (31): 10925-30.
10. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *PNAS* 2003; 100 (11): 6741-6.
11. Kobayashi H, Minatoguchi S, Yasuda S, et al. Post-infarct treatment with an erythropoietin-gelatin hydrogel drug delivery system for cardiac repair. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 611-20.
12. Copland IB, Jolicoeur EM, Gillis MA, et al. Coupling erythropoietin secretion to mesenchymal stromal cells enhances their regenerative properties. *Cardiovasc Res*.
13. Ribatti D, Marzullo A, Gentile A, et al. Erythropoietin/erythropoietin-receptor system is involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 591-6.
14. Hardee ME, Cao Y, Fu P, Jiang X, Zhao Y, Rabbani ZN, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Arcasoy MO. Erythropoietin blockade inhibits the induction of tumor angiogenesis and progression. *PLoS One* 2007; 2(6): e549.