



Universidad Mayor de San Andrés  
Facultad de Medicina

# Eritrocitosis Patológica de Altura



Ricardo Amaru

1ra Edición  
2016



Unidad de Biología Celular Italo - Boliviano  
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular  
Departamento de Ciencias Funcionales



Ricardo Amaru MD.PD.  
Oncohematólogo / Biólogo Molecular  
Docente de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Medicina, UMSA.  
Académico, Academia Nacional de Ciencias  
Académico, Academia Boliviana de Medicina  
La Paz, febrero 2016.

## **DEDICATORIA**

*Este documento esta dedicado al II Congreso Internacional de Medicina de la Altura organizado por el Colegio Médico de Bolivia y el Colegio Médico del Perú.*

*De la misma manera, a la Sociedad Boliviana de Hematología y Hemoterapia en sus bodas de oro 1966 - 2016.*



### **COLEGIO MÉDICO DE BOLIVIA**

**Presidente:** Dr. Edgar Villegas Gallo

**Vice Presidente:** Dr. Alfredo Zambrana Sea

**Secretaria Gral:** Dra. Rosario Ruiz Dominguez



### **SOCIEDAD BOLIVIANA DE HEMATOLOGÍA**

**Presidente:** Dr. Ignacio Alurralde

**Vice Presidente:** Dr. Pedro Artieda

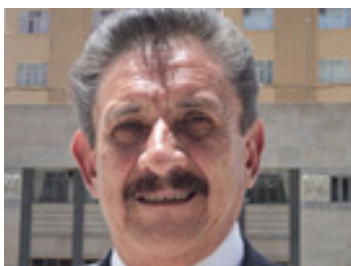
**Secretario Gral:** Dr. Mario Luis Tejerina



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**La Paz - Bolivia**



Dr. Waldo Albarracín Sánchez  
RECTOR



Dr. Guido Zambrana Ávila  
DECANO



Dr. Javier Peñaranda Méndez  
VICEDECANO



Dra. Marilyn Aparicio Effen  
JEFA DEPARTAMENTO  
CS. FUNCIONALES



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FUNCIONALES  
CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
UNIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR “ITALO-BOLIVIANO”**



Prof. Heriberto Cuevas Lizárraga MD. MSc.  
JEFE DE CÁTEDRA BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA CELULAR



Prof. Ricardo Amaru Lucana MD. PD.  
JEFE UNIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR



Dra. Rosario Peñaloza Imaña  
RESPONSABLE LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



Dra. Hortensia Miguez Vargas  
RESPONSABLE LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR



Dra. Gina Torres Aldunate. MSc.  
RESPONSABLE LABORATORIO DE CITOMETRÍA DE FLUJO



Dr. Teddy Quispe Soto. MSc.  
RESPONSABLE LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR



Dr. Ariel Amaru Calzada. MD. PhD.  
INVESTIGADOR ASISTENTE. DOCTOR EN BIOLOGÍA CELULAR



Dr. Josue Mamani . MD.  
INVESTIGADOR ASISTENTE



Univ. Daniela Patón Mamani  
RESPONSABLE DE CORRECCIÓN Y ESTILO



Univ. Jhonny Alfredo Ticona Limachi  
DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN



## PRESENTACIÓN



Prof. Heriberto Cuevas Lizárraga MD. MSc.  
JEFE DE CÁTEDRA

En el transcurso de 17 años de una ardua y constante labor investigativa, concretando procesos sistemáticos orientados a desarrollar, contribuir y extender el conocimiento humano; es menester nuestro, emitir y facilitar los frutos obtenidos a lo largo de este tiempo.

La Unidad de Biología Celular de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Funcionales, bajo la tutela de nuestra Casa de Estudios Superiores, ha venido desarrollando investigaciones biomoleculares y biocelulares con el fin de conocer las características tanto biológicas como clínicas de patologías propias de habitantes que viven en altitudes elevadas. Estos estudios han permitido distinguir las principales patologías asociadas al Mal Crónico de Montaña en nuestra región, categorizar aspectos moleculares y celulares, describir mecanismos y factores involucrados; finalmente, proponer tratamientos y protocolos.

Todas estas experiencias se plasman en el presente trabajo denominado “Eritrocitosis Patológica de Altura” como un aporte, todavía modesto, a la comunidad científica y en especial al área de la salud, proporcionando un discernimiento más amplio de nuevo entendimiento, útil para el diseño de tratamientos estandarizados y adecuados a nuestra región. Es por tanto, un grato honor y entera satisfacción conferirme proporcionar esta información para servicio de nuestra sociedad.

Prof. Dr. Heriberto Cuevas Lizárraga MSc.  
Docente Emérito de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Medicina  
Universidad Mayor de San Andrés

La Paz, febrero 2016.



## CONTENIDO

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.<br>ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS<br>EN HABITANTES A GRANDES ALTURAS.....                                                                                                                     | 13 |
| II.<br>CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA<br>DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA.....                                                                                                           | 19 |
| III.<br>CARACTERIZACIÓN CLÍNICA<br>DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA.....                                                                                                            | 27 |
| IV.<br>TRATAMIENTO IN VITRO<br>DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA.....                                                                                                                | 35 |
| V.<br>MECANISMO MOLECULAR DE LAS ESTATINAS<br>EN EL TRATAMIENTO DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA.....                                                                               | 43 |
| VI.<br>TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO<br>DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA.....                                                                                                           | 53 |
| VII.<br>LÍNEAS GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO<br>DE LAS ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS EN LA ALTURA.....                                                                                 | 59 |
| VIII.<br>ERITROCITOSIS MICROCÍTICA POST FLEBOTOMÍA<br>Reporte preliminar de una nueva entidad clínica.....                                                                                  | 69 |
| IX.<br>AFINIDAD DE LA HEMOGLOBINA POR EL OXÍGENO<br>EN LA ADAPTACIÓN A GRANDES ALTURAS.....                                                                                                 | 75 |
| X.<br>BOLIVIAN AYMARA NATIVES WITH CHRONIC MOUNTAIN<br>SICKNESS HAVE AUTONOMOUS BFU-E GROWTH.....                                                                                           | 81 |
| XI.<br>SUCCESSFUL TREATMENT OF HU-REFRACTORY POLYCYTHEMIA VERA<br>WITH ATORVASTATIN AND LOW DOSE HYDROXYUREA.<br>Results from a Pilot Study in Bolivia.....                                 | 85 |
| XII.<br>HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC<br>MOUNTAIN SICKNESS LACK THE JAK2 MUTATION, SHOW HYPERSENSITIVITY<br>TO ERYTHROPOIETIN AND ARE INHIBITED BY STATINS..... | 89 |



# Capítulo I

## ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS EN HABITANTES A GRANDES ALTURAS

Ricardo Amaru, Gina Torres, Teddy Quispe, Josue Mamani, Rosario Peñaloza, Hortencia Miguez,  
Ariel Amaru, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

*Corrección y estilo:*

Tania Daniela Patón Mamani

*Diseño y Diagramación:*

Jhonny Alfredo Ticona Limachi



## INTRODUCCIÓN

La tierra, desde su formación, ha estado marcada por acontecimientos importantes tales como la formación de las montañas del Himalaya (Tíbet) entre 245 a 65 millones de años y la formación de la Cordillera de Los Andes entre 138 a 65 millones de años<sup>1,2,3</sup>. Las poblaciones nativas del Tíbet y Los Andes colonizaron dichas formaciones desde hace 25.000 y 11.000 años atrás, respectivamente. En la actualidad, se estima que en el mundo, alrededor de unos 140 millones de personas viven en regiones superiores a 2.500 msnm de los cuales 35 millones radican en Los Andes y 80 millones en Asia, incluyendo China y Asia Central<sup>4,5,6,7,8</sup>.

La baja presión de oxígeno en grandes alturas, procesos evolutivos y tiempos de exposición distintos en los que vivieron ambas poblaciones permitió una selección natural y adaptación genética de modos diferentes<sup>9,10,11</sup>. Los Tibetanos montañeses, gracias a la selección positiva de genes involucrados en el control de la eritropoyesis, evolucionaron hacia una concentración de hemoglobina similar al de los habitantes del nivel del mar; mientras que, los Andinos evolucionaron a una concentración de hemoglobina elevada en relación a los habitantes del nivel del mar, esto probablemente por mecanismos de selección genética distintos o por un periodo insuficiente de exposición a grandes alturas. Así, los nativos montañeses tibetanos y andinos presentan una baja concentración de hemoglobina en relación a los nativos de tierras bajas que migraron recientemente a grandes alturas<sup>12,13,14,15</sup>.

La exposición a baja presión barométrica de los habitantes de grandes alturas, contribuye a la presentación de patologías agudas y crónicas. Entre las agudas se encuentran la Enfermedad Aguda de Montaña, edema cerebral y edema pulmonar; mientras tanto, las crónicas están representadas por la Enfermedad Crónica de Montaña cuya repercusión es de carácter sistémico y donde la eritrocitosis se constituye como una manifestación hematológica de la misma. La prevalencia de la esta enfermedad difiere de acuerdo a la región, el tiempo de residencia y la altura de radicación. De este modo, la prevalencia es de 1.2% en Tibetanos

Nativos, 5.6% en los Chinos Han, 7% en nativos de la ciudad de La Paz, Bolivia (3.600 – 4.000 msnm) y 15.6 % en los habitantes de la cordillera de Los Andes<sup>7,16</sup>.

## CLASIFICACIÓN DE LA ERITROCITOSIS

La eritrocitosis se caracteriza por un aumento de la masa eritrocitaria por encima de los parámetros normales, y se clasifica en:

a) Eritrocitosis primaria, se caracteriza por presentar la eritropoyetina sérica disminuida o normal; ésta eritrocitosis a su vez se subclasifica en adquiridas o congénitas. La eritrocitosis primaria adquirida se debe a mutaciones somáticas como la mutación del gen JAK2 en la Policitemia Vera (PV). La eritrocitosis primaria congénita se debe a cambios en la línea germinal del DNA como las mutaciones en el gen del receptor de la eritropoyetina (EPO-R) y mutaciones hereditarias recesivas del gen VHL en la policitemia de Chuvash. Estas mutaciones se expresan dentro de los progenitores eritroides que impulsan el aumento de la eritropoyesis y son detectadas por respuestas EPO BFU-E hipersensibles o autónomas (Cuadro 1).

b) Eritrocitosis secundaria, caracterizada por el aumento de eritropoyetina sérica, también se subclasifican en adquiridas, como en las patologías cardiopulmonares; y congénitas, como en las cardiopatías congénitas (Cuadro 1).

Con todo lo descrito anteriormente, las eritrocitosis de importancia clínica en habitantes de grandes alturas son: Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA), Eritrocitosis secundaria (ES) y Policitemia Vera (PV).

### Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA)

Constituye el 9% de las eritrocitosis en consulta médica. La Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) es la manifestación hematológica de Enfermedad Crónica de Montaña (Chronic Mountain Sickness, CMS) presente en sujetos que viven en alturas superiores a 2.500 msnm.

### Eritrocitosis Secundaria (ES)

Constituye el 90% de todas las eritrocitosis en consulta médica, representa la consecuencia de patologías asociadas al aumento de la

**Cuadro 1.**  
**Clasificación de las eritrocitosis patológicas**

|                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------|
| 1. Eritrocitosis Primaria (eritropoyetina sérica normal o disminuida) |
| a. Adquiridas                                                         |
| • Policitemia Vera                                                    |
| b. Congénitas                                                         |
| • Eritrocitosis por mutaciones del Epo-R                              |
| • Eritrocitosis de Chuvash                                            |
| • Hemoglobinopatía de alta afinidad con oxígeno                       |
| • Deficiencia de 2,3 BPG mutasa                                       |
| 2. Eritrocitosis Secundaria (Eritropoyetina sérica elevada)           |
| a. Adquiridas                                                         |
| • Secundaria a EPOC                                                   |
| • Secundaria a Obesidad / Síndrome metabólico                         |
| • Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS)                      |
| • Eritrocitosis por cardiopatía adquirida.                            |
| • Tabaquismo                                                          |
| • Neoplasias                                                          |
| b. Congénitas                                                         |
| • Cardiopatías congénitas                                             |
| • Estenosis de arteria renal                                          |

*Esta clasificación se argumenta en los trabajos de Tiziano Barbui, Guido Finazzi, Joseph Prchal y Ricardo Amaru.*

eritropoyetina sérica como las patologías cardiopulmonares, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), obesidad, síndrome metabólico, Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño y cardiopatías.

#### **Policitemia Vera (PV)**

Constituye el 1% de las eritrocitosis en consulta médica, es una verdadera enfermedad oncohematológica clonal asociada a leucocitosis, trombocitosis, crecimiento autónomo de colonias

eritroides (BFU-E), eritropoyetina sérica baja y mutación somática de gen JAK2 V617F.

#### **DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL**

En la práctica clínica, es necesario realizar un diagnóstico diferencial entre las 3 principales eritrocitosis patológicas: ES, EPA y PV. Probablemente estas 3 eritrocitosis comprenden el 99% de todas las eritrocitosis patológicas propias de los habitantes en grandes alturas. (Tabla 1)

**Tabla1.**  
**Diagnóstico diferencial de las eritrocitosis patológicas en habitantes de grandes alturas**

|                            | CN     | EPA    | ES      | PV   |
|----------------------------|--------|--------|---------|------|
| EPOC, Obesidad, tabaquismo | No     | No     | Si      | No   |
| Esplenomegalia             | No     | No     | No      | Si   |
| Leucocitosis               | No     | No     | No      | Si   |
| Eritropoyetina sérica      | Normal | Normal | Elevada | Baja |
| Mutación JAK2              | No     | No     | No      | Si   |

## REFERENCIAS

1. Joel Cracraft.«The Scientific Response to Creationism ». Department of Astronomy, University of Illinois.1982. .es.wikipedia.org/wiki/Historia\_de\_la\_Tierra.
2. Futuyma, Douglas J. Evolution. Sunderland, Massachusetts: Sinuer Associates, 2005. ISBN0-87893-187-2. es.wikipedia.org/wiki/Historia\_de\_la\_vida
3. Storz JF. Genes for High Altitudes. *Science*. 2010;329(5987):40-41. doi:10.1126/science.1192481.
4. Moore LG. Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt Med Biol*. 2001;2(2):257-279.
5. Laura B Scheinfeldt, Sameer Soi, Simon Thompson, Alessia Ranciaro, Dawit Woldemeskel, William Beggs, Charla Lambert, Joseph P Jarvis, Dawit Abate, Gurja Belay, and Sarah A Tishkoff. Genetic adaptation to high altitude in the Ethiopian highlands. *Genome Biol*. 2012; 13(1): R1.
6. Kurt Rademaker, Gregory Hodgins, Katherine Moore, Sonia Zarrillo, Christopher Miller, Gordon R. M. Bromley, Peter Leach, David A. Reid, Willy Yépez Álvarez, Daniel H. Sandweiss. Paleoindian settlement of the high-altitude Peruvian Andes. *Science* 346, 466 (2014); DOI: 10.1126/science.1258260
7. Pasha MA, Newman JH. High-altitude disorders: pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010;137(6 Suppl):13-19.
8. Felipe R Lorenzo, Chad Huff, Mikko Myllymäki, Benjamin Olenchock, Sabina Swierczek, Tsewang Tashi, Victor Gordeuk, Tana Wuren, Ge Ri-Li, Donald A McClain, Tahsin M Khan, Parvaiz A Koul, Prasenjit Guchhait, Mohamed E Salama, Jinchuan Xing, Gregg L Semenza, Ella Liberzon, Andrew Wilson, Tatum S Simonson, Lynn B Jorde, William G Kaelin, Jr, Peppi Koivunen, Josef T Prchal. A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. *Nat Genet*. 2014;46(9):951-956.
9. Simonson TS, Yang Y, Huff CD, et al. Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet. *Science*. 2010;329(5987):72-75. doi:10.1126/science.1189406.
10. Tsewang Tashi, Tang Feng, Parvaiz Koul, Ricardo Amaru, Dottie Hussey, Felipe R. Lorenzo, Ge RiLi, Josef T. Prchal High altitude genetic adaptation in Tibetans: no role of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Blood Cells Mol Dis*. 2014; 53: 27-29.
11. Ri-Li Ge, Tatum S. Simonson, Robert C. Cooksey, Uran Tanna,1 Ga Qin, Chad D. Huff, David J. Witherspoon, Jinchuan Xing, Bai Zhengzhong, Josef T. Prchal, Lynn B. Jorde, Donald A. McClain2. Metabolic insight into mechanisms of high-altitude adaptation in Tibetans. *Mol Genet Metab*. 2012; 106(2): 244-247.
12. Nayia Petousi and Peter A. Robbins. Human adaptation to the hypoxia of high altitude: the Tibetan paradigm from the pregenomic to the postgenomic era. *J Appl Physiol*. 2014; 116(7): 875-884.
13. Beall CM (2011) Genetic Changes in Tibet. *High Altitude Medicine & Biology* 12: 101–102
14. Tatum S. Simonson, Yingzhong Yang, Chad D. Huff, Haixia Yun, Ga Qin, David J. Witherspoon, Zhenzhong Bai, Felipe R. Lorenzo, Jinchuan Xing, Lynn B. Jorde, Josef T. Prchal, RiLi Ge. Genetic Evidence for High-Altitude Adaptation in Tibet. *Science*. 2010;329:72-75.
15. Cynthia M. Beall. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *PNAS*. 2007;104:8655-8660.
16. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013; 19(2):5-18.



## Capítulo II

### CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA

Ricardo Amaru, Gina Torres, Teddy Quispe, Josue Mamani, Rosario Peñaloza, Hortencia Miguez,  
Ariel Amaru, María Aguilar, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

La eritropoyesis es un proceso de proliferación y diferenciación de la línea eritroide, desde Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) hasta eritrocitos; este proceso está regulado por un delicado equilibrio entre la proliferación y la apoptosis de los eritrocitos. Las citocinas hematopoyéticas juegan un rol crucial en la regulación de este equilibrio homeostático, y la falta de estas citocinas inducen la apoptosis celular. La eritropoyetina (EPO) es una citocina hematopoyética de linaje específico, importante para la proliferación, diferenciación y supervivencia de la línea eritroide. Todos estos procesos están regulados a través de proteínas anti-apoptóticas que involucran a los reguladores Bcl-XL y Bim, miembros de la familia Bcl-2<sup>1,2,3</sup>.

En condiciones patológicas, como por ejemplo en las neoplasias, el aumento de la eritropoyetina produce Eritrocitosis Secundaria (ES)<sup>4</sup>.

## DESCRIPCIÓN

### Material y métodos

Para establecer las características biológicas de la Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA), se obtuvo muestras de sangre periférica y aspirado de médula ósea de 10 personas saludables como controles normales (CN) y 30 de pacientes con eritrocitosis patológicas (EPA, ES y PV), todos ellos con radicación en las ciudades de La Paz y El Alto a 3.600 y 4.000 m.s.n.m. respectivamente. Las muestras de aspirado de médula ósea y sangre venosa periférica fueron tomadas previo consentimiento informado, y los datos clínicos se obtuvieron de la historia clínica.

### Niveles de Hemoglobina y Hematocrito

Las concentraciones de hemoglobina y hematocrito fueron obtenidas de las muestras de sangre venosa periférica depositadas en tubos Vacutainer con EDTA (Becton Dickinson, USA) y procesadas en un contador hematológico automático (Micro 60, USA), para confirmar los resultados se llevaron a cabo estudios con técnicas manuales, utilizando una microcentrífuga (Hawksley, England) para el hematocrito y la técnica colorimétrica (Unico 1200 Spectrophotometer, USA) para la concentración de hemoglobina<sup>5</sup>.

Los niveles de concentración de hemoglobina en

condiciones normales y patológicas dependen de la edad, género, grupo étnico y altura de residencia (Amaru /Prchal datos no publicados). Los valores normales para los habitantes adultos de las ciudades de La Paz y El Alto son de 14 a 17 g/dl para las mujeres y de 15 a 18 g/dl para los varones. Se consideró como eritrocitosis patológicas a los niveles de hemoglobina mayor a 18 g/dl en las mujeres y mayor a 19 g/dl en los varones; estos puntos de corte fueron determinados considerando la presencia de síndrome de hiperviscosidad sanguínea en más del 80% de los pacientes. Es importante mencionar que, existen pacientes de ambos sexos que toleran hemoglobinas elevadas sin sintomatología de hiperviscosidad sanguínea y contrariamente también se observa pacientes, sobre todo mujeres, que presentan este síndrome a valores inferiores al del punto de corte.

Los controles normales (CN) presentaron un valor medio de Hb:15,9 g/dl (Ht:50,5%); los pacientes con Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) presentaron Hb 20,2 g/dl (Ht:62,1%), Eritrocitosis Secundaria (ES) Hb:22,9g/dl (Ht:70,7%) y finalmente, Policitemia Vera (PV) 20,3 g/dl (Ht:63,4%).

De esta manera, se evidenció que los pacientes con EPA tienen la hemoglobina y el hematocrito estadísticamente diferentes al de los pacientes con ES y CN; similar al de los pacientes con PV.

### Hemoglobina Fetal y Metahemoglobina

La concentración de la hemoglobina fetal se estableció por método fotocolorimétrico, con el Kit Emoglobina Fetal Kit (Globe Diagnostic, Italy) en un espectrofotómetro (Unico1200 Spectrophotometer, USA); la metahemoglobina fue determinada con el método de Evelyn y Malloy, y la determinación de la concentración de hemoglobina fetal fue revalidada por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)<sup>6</sup>.

Los CN presentaron una concentración media de Hbf:0,46% (MetHb:0,63%), los pacientes con EPA Hbf:0,57% (metHb:0,43%), ES Hbf:0,76% (metHb:0,34%) y PV Hbf:0,44% (metHb:0,29%). De acuerdo con los valores citados anteriormente, tanto la hemoglobina fetal como la metahemoglobina en pacientes con EPA, ES y PV son normales.

### Reticulocitos

El recuento de reticulocitos se realizó por microscopia, previa tinción con azul brillante de cresil.

Los CN presentaron una media de índice de reticulocitos de 1,3%; EPA 2,9%; ES 3,6% y los pacientes con PV 2,1%.

El análisis estadístico realizado para verificar las diferencias entre grupos evidenció que las eritrocitosis patológicas (EPA, ES, PV) presentaron un incremento del índice de reticulocitos y que no existen diferencias estadísticas entre ellas.

### Niveles de Eritropoyetina Sérica

La determinación de eritropoyetina sérica se realizó con el método de ELISA, utilizando Kit comercial (R&D System, USA) y un lector Stat Fax 2100 (Awareness Technologies Inc., USA), estos datos fueron revalidados con la técnica de quimioluminiscencia.

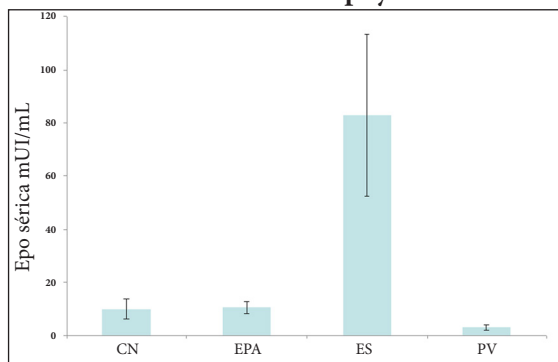
Para ello, se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica depositadas en tubos Vacutainer SST II Advance (Becton Dickinson, Plymouth, UK).

Los CN presentaron una media de eritropoyetina sérica de 10,0 mU/ml; EPA 10,5 mU/ml; ES 30,5 mU/ml y los pacientes con PV 2,1 mU/ml.

Estos datos reflejan que, la concentración de eritropoyetina sérica en pacientes con EPA es normal, elevada en pacientes con ES y disminuida en pacientes con PV (Cuadro 1).

**Cuadro 1.**

#### Concentración de Eritropoyetina Sérica



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

### Leucocitos y Plaquetas

La cuantificación de leucocitos y plaquetas se realizó en sangre venosa periférica obtenida

en tubos con EDTA (Becton Dickinson, USA) y procesados en un contador hematológico automatizado (Micro 60, USA).

Los grupos estudiados presentaron una media de leucocitos y plaquetas de 6.300/ul y 273.000/ul en CN; 7.200/ul y 229.000/ul en EPA; 6.600/ul y 193.000/ul en ES; 16.600/ul y 604.000/ul en PV. Los datos analizados reflejan que, los pacientes con PV presentan leucocitosis y trombocitosis; mientras que, la EPA y la ES presentan valores normales. La leucocitosis y trombocitosis son características de la PV debido a que esta es una enfermedad neoplásica mieloproliferativa que compromete a toda la línea mieloide.

### Gasometría arterial

La gasometría se determinó por medio de un gasómetro automatizado (Critical Care Xpress, Nova Biomedical, UK), la medición se realizó en muestras de sangre obtenidas de la arteria radial. Se observó que, el pH de los cuatro grupos estudiados son normales; la pCO<sub>2</sub> está elevada tanto en la ES como en la EPA, pero más elevada en ES; la pO<sub>2</sub> está disminuida en ES y EPA, pero más disminuida en ES; y la saturación de O<sub>2</sub> está disminuida en ES y EPA. Los resultados se describen en la tabla 1.

El incremento de pCO<sub>2</sub> y la disminución de pO<sub>2</sub> y Sat O<sub>2</sub>, presentes en la ES, probablemente se deban a la hemoglobina/hematocrito elevados, además de una etiología pulmonar que dificulta el intercambio gaseoso en este grupo de pacientes.

### Mutación del gen Jak2<sup>V617F</sup>

El DNA de células mononucleares de la médula ósea fue extraído con método fenol/cloroformo. Para la amplificación por PCR, se utilizó 100 ng de DNA, 50 pM de los oligos JAK2R, JAK2F Y JAK2FWT. El annealing se realizó a 59°C seguido de 35 ciclos de amplificación.

El producto del PCR fue separado en gel de agarosa al 2%; observándose la banda de 364 bp que corresponde al exón 12 del gen Jak2 no mutado y la banda 203 bp que corresponde al gen Jak2<sup>V617F</sup> mutado.

Los pacientes con PV presentan mutación del gen Jak2<sup>V617F</sup>; mientras que, las muestras de CN, EPA y ES no presentan la mutación de este gen (Figura 1).

Tabla 1.  
Gasometría Arterial

|                               | CN<br>10         | CMS<br>15        | ES<br>10         | PV<br>5          |
|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| pH (mmHg) (SD)                | 7.39<br>(+ 0.01) | 7.41<br>(+ 0.02) | 7.39<br>(+ 0.02) | 7.42<br>(+ 0.02) |
| paCO <sub>2</sub> (mmHg) (SD) | 30.0<br>(+ 0.1)  | 34.1<br>(+ 3.3)  | 37.8<br>(+ 3.5)  | 27.5<br>(+ 3.8)  |
| paO <sub>2</sub> (mmHg) (SD)  | 60.2<br>(+ 0.4)  | 49.9<br>(+ 4.3)  | 43.4<br>(+ 1.6)  | 48.3<br>(+ 3.4)  |
| Sat O <sub>2</sub> % (SD)     | 93.2<br>(+ 1.6)  | 86.1<br>(+ 3.8)  | 78.3<br>(+ 2.7)  | 91<br>(+ 2.6)    |

CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

Figura 1.  
Mutación del Gen JAK2<sup>V617F</sup>



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

### BFU-E Endógenas

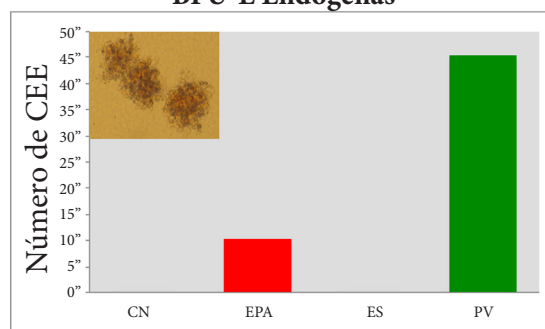
Las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) de la médula ósea fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, USA), luego lavadas con tampón de lisis y RPMI1640 con suero fetal bovino al 2%. Posteriormente, fueron identificadas y cuantificadas por citometría de flujo con anti CD34; finalmente, la viabilidad se determinó con Azul Tripan.

Se cultivó 2x10<sup>5</sup> cel/ml de CPH en cajas petri de 33 mm con grilla en 1 ml de Metilcelulosa (MethoCult H4230 Without Epo, StemCell Technologies, Canadá), penicilina 250 UI/ml, estreptomicina 50 ug/ml; suplementadas con y sin 2 UI/ml de Epo. Los cultivos se realizaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> y la lectura de las colonias BFU-E se realizó a los días 7 y 14 de acuerdo a criterios estandarizados.

De esta manera, se observó un crecimiento autónomo de las colonias eritrocitarias BFU-E (BFU-E endógenas) en pacientes con PV y EPA;

aunque, el número de colonias fue menor en la EPA (Cuadro 2).

Cuadro 2.  
BFU-E Endógenas



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

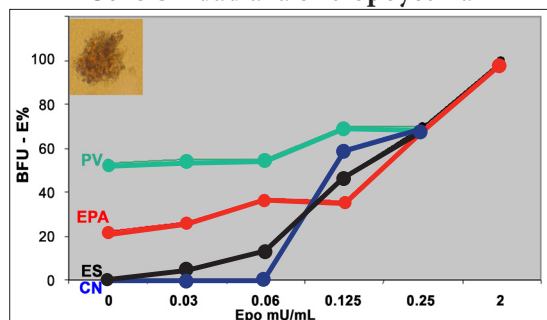
### Sensibilidad de Células Progenitoras Hematopoyéticas a la eritropoyetina

La sensibilidad de las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) a la eritropoyetina se determinó por técnica de cultivo celular. Para ello se cultivaron 2x10<sup>5</sup> cel/ml de CPH en medio de Metilcelulosa (Metho Cult 4531medium, StemCell Technologies Inc, Vancouver, Canadá) con penicilina 250 UI/ml, estreptomicina 50 ug/ml y luego suplementadas con eritropoyetina a las siguientes concentraciones: 0; 0.03; 0.06; 0.125; 0.250 y 2 U/ml. El cultivo fue realizado en cajas Petri de 35 mm a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y la lectura de colonias BFU-E se realizó al día 14 de acuerdo a criterios estandarizados.

La evaluación de este experimento evidencia que, las CPH de los pacientes con EPA y PV

son hipersensibles a la eritropoyetina; mientras que, las CPH de los CN y pacientes con ES responden de manera normal a la presencia de eritropoyetina. (Figura 2).

**Figura 2.**  
**Sensibilidad a la eritropoyetina**



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

### Apoptosis celular

El estudio de la apoptosis celular se realizó con las técnicas DNA ladder, cultivo de colonias BFU-E y Anexina V/7AAD.

Para el DNA ladder, se cultivaron  $5 \times 10^6$  cel/ml de células mononucleares en 700  $\mu$ l de RPMI-1640 con 300  $\mu$ l de suero fetal bovino, 2 nM de L-Glutamina, 250 UI de Penicilina, 50 mg de estreptomicina y 2 UI/ml de Epo. Los cultivos se realizaron en placas CCW (Corning Cell Well, USA) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Fueron cultivadas durante 1, 2, 7 y 14 días; luego estas células fueron adquiridas, lavadas con PBS y lisadas en solución de guanidinio; posteriormente fueron expuestas a proteasa K. Se procedió a la incubación de células a 58 °C por 60 minutos, para luego separarlas a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%. El patrón de DNA ladder fue visualizado y fotografiado bajo luz ultravioleta (Figura 3).

Para el cultivo de BFU-E, se emplearon  $2 \times 10^5$  cel/ml de CPH en metilcelulosa (Metho Cult

4531medium, StemCell Technologies Inc. Vancouver, Canadá) con 250 UI/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina y 2 UI/ml de eritropoyetina. Los cultivos fueron realizados en cajas Petri de 35 mm a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días. La lectura de BFU-E se realizó de acuerdo a criterios estandarizados (Figura 4).

Para la técnica de Anexina-V/7AAD (Becton Dickinson, Pharmigen, USA), se cultivaron  $5 \times 10^6$  cel/ml de células mononucleares en RPMI-1640 al 30% de suero fetal bovino con 2 nM de L-Glutamina, 250 UI de Penicilina, 50 mg de estreptomicina y 2 UI/ml de Epo por un tiempo de 48 horas; posteriormente, las células fueron marcadas con Anexina V/7AAD de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y evaluadas en un citómetro de flujo FASCAN (Becton Dickinson, USA) (Figura 5).

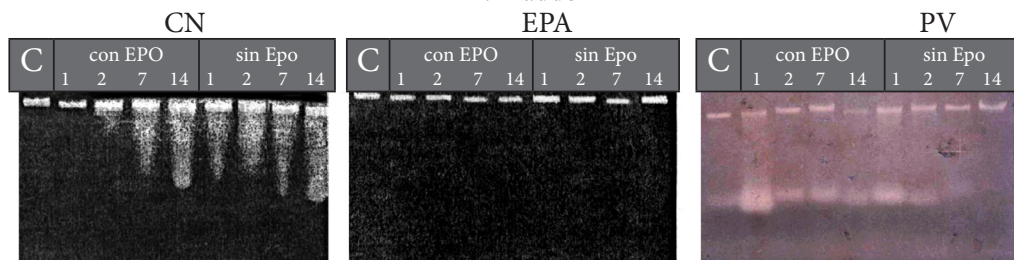
Los estudios realizados evidenciaron que los progenitores eritropoyéticos de los pacientes con EPA presentan una apoptosis celular retardada en relación a los controles normales.

### CONCLUSIÓN

La Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) es la manifestación hematológica de la Enfermedad Crónica de Montaña (enfermedad de Monge), caracterizada por el aumento de número de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito. Clínicamente se expresa por la presencia de síndrome de hiperviscosidad sanguínea y cianosis.

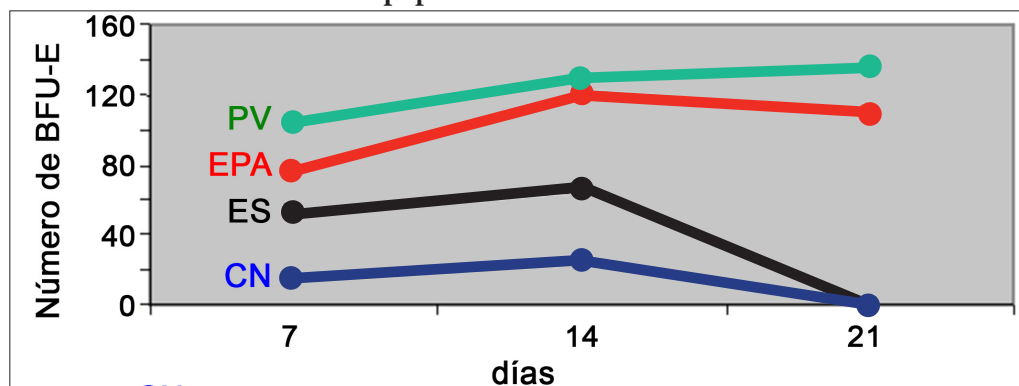
La EPA tiene características propias que la distinguen de las demás eritrocitosis patológicas; siendo las características más representativas la concentración de eritropoyetina sérica normal, apoptosis celular retardada, presencia de colonias BFU-E endógenas y ausencia de mutación de gen JAK2<sup>V617F</sup> (Tabla 2).

**Figura 3.**  
**DNA ladder**



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), PV (Policitemia Vera). Los números representan los días de cultivo celular.

Figura 4.  
Apoptosis de colonias BFU-E



CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera). Los números representan los días de lectura de las colonias.

Figura 5.  
Técnica de Anexina-V/7AAD

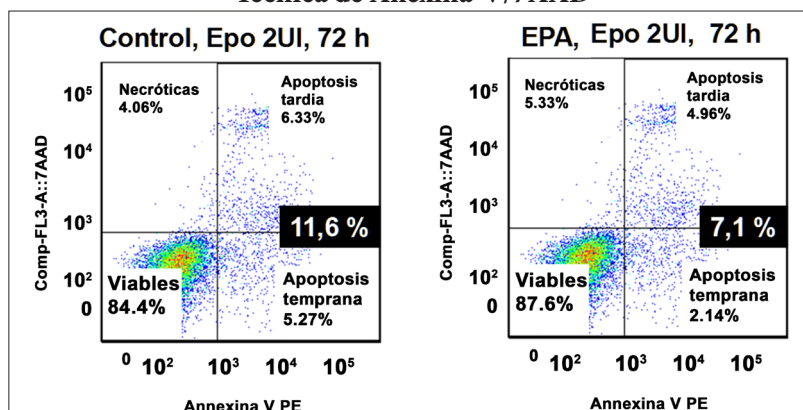


Tabla 2.  
Características biocelulares de la Eritrocitosis Patológica de Altura

|                                      | CN<br>(n=10)        | EPA<br>(n=10)       | ES<br>(n=10)        | PV<br>(n=5)         |
|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Hemoglobina g/dl (DS)                | 15,9 (+0,6)         | 20,2(+0,8)          | 22,9 (+1,1)         | 20,3 (+2,5)         |
| Hb fetal % (mediana y rangos)        | 0,46<br>(0,27-0,55) | 0,57<br>(0,36-0,72) | 0,76<br>(0,31-1,24) | 0,44<br>(0,28-0,84) |
| MetHb % (mediana y rangos)           | 0,63<br>(0,98-0,40) | 0,43<br>(0,24-2,35) | 0,34<br>(0,28-0,99) | 0,29<br>(0,11-0,82) |
| Hematocrito % (DS)                   | 50,5 (+2,7)         | 62,1 (+3,7)         | 70,7 (+3,7)         | 63,4 (+5,9)         |
| Índice de reticulocitos % (DS)       | 1,3 (+0,3)          | 2,9 (+1,3)          | 3,6 (+1,2)          | 2,1 (+0,3)          |
| Leucocitos x103/ul (DS)              | 6,3 (+1,6)          | 7,2 (+1,9)          | 6,6 (+1,7)          | 16,6 (+4,8)         |
| Plaquetas x103/ul (DS)               | 273 (+80)           | 229 (+58)           | 193 (+54)           | 604 (+177)          |
| Eritropoyetina sérica mU/<br>ml (DS) | 10,0 (+1,7)         | 10,5 (+1,1)         | 30,5 (+2,8)         | 2,1 (+0,6)          |
| pH                                   | 7,39 (+0,01)        | 7,41 (+0,02)        | 7,39 (+0,02)        | 7,42                |
| pCO2 (mmHg)                          | 30 (+0,1)           | 34,1 (+3,3)         | 37,8 (+3,5)         | 27,5                |
| pO2 (mmHg)                           | 60,2 (+0,4)         | 49,9 (+4,3)         | 43,4 (+1,6)         | 48,3                |
| Sat O2 (%)                           | 93,2 (+1,6)         | 86,1 (+3,8)         | 78,3 (+2,7)         | 91                  |
| Mutación Jak2 V617F                  | 0/10                | 0/10                | 0/10                | 5/5                 |
| BFU-E autónomos, No (rangos)         | 0                   | 11 (2-25)           | 0                   | 46 (25-70)          |
| Hipersensibilidad a EPO              | 0/3                 | 3/3                 | 0/3                 | 3/3                 |
| Apoptosis celular                    | Normal              | Retardada           | Normal              | Retardada           |

CN (Controles Normales), EPA (Eritrocitosis Patológica de Altura), ES (Eritrocitosis Secundaria), PV (Policitemia Vera).

## REFERENCIAS

1. Barminko J, Reinholt B, Baron MH. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Dev Comp Immunol*. 2015 Dec 18. pii: S0145-305X(15)30095-1. doi: 10.1016/j.dci.2015.12.012. [
2. Liu J, Han X, An X. Novel methods for studying normal and disordered erythropoiesi. *Sci China Life Sci*. 2015;58(12):1270-5.
3. Moura IC1, Hermine O, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoiesis and transferrin receptors. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(3):193-8.
4. Tandon R, Goel P, Kataria S, Saha PK, Punia RPS, Dimri K. Paraneoplastic erythrocytosis in a malignant ovarian steroid cell tumour. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014;30(1):54-55.
5. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013; 19(2):5-18.
6. Tsewang Tashi, Tang Feng, Parvaiz Koul, Ricardo Amaru, Dottie Hussey, Felipe R. Lorenzo, Ge RiLi, Josef T. Prchal High altitude genetic adaptation in Tibetans: no role of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Blood Cells Mol Dis*. 2014; 53: 27-29.

## Capítulo III

### CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA

Ricardo Amaru, Josue Mamani, Ariel Amaru, Maria Aguilar, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

La eritrocitosis se caracteriza por el incremento patológico de la masa de eritrocitos en la sangre circulante. Este incremento se da por encima del rango normal, establecido en cada región, y esta asociado a un aumento de hemoglobina y hematocrito<sup>1,2,3</sup>. El cuadro clínico de las eritrocitosis patológicas se manifiesta por síntomas de hiperviscosidad y complicaciones sistémicas.

Los síntomas de hiperviscosidad sanguínea se caracterizan por cefaleas, parestesias, tinnitus, hipersomnias, disneas, alteraciones del estado de conciencia, visión borrosa y mialgias<sup>4</sup>. Del mismo modo, las principales complicaciones sistémicas observadas se caracterizan por eventos trombóticos, Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP), hemorragia e Insuficiencia Cardíaca Congestiva<sup>5</sup>. Estos síntomas de hiperviscosidad son característica común de las principales eritrocitosis patológicas (EPA: Eritrocitosis Patológica de Altura, ES: Eritrocitosis Secundaria, PV: Policitemia Vera)<sup>5,6</sup>; sin embargo, cada una de ellas presenta sintomatología adicional que la distingue una de otra. Así por ejemplo, la ES generalmente presenta una patología cardiopulmonar<sup>7,8</sup>; mientras que, la Policitemia Vera presenta sintomatología propia de enfermedades neoplásicas, como evento trombótico frecuente, esplenomegalia y pérdida de peso<sup>9,10,11</sup>.

El punto de corte de los valores de hemoglobina/hematocrito para el diagnóstico de eritrocitosis en una población, depende de muchas variables, entre ellas, edad, género, raza y lugar de residencia. Así por ejemplo, en la ciudad de La Paz se considera eritrocitosis cuando el paciente presenta una hemoglobina superior a 18 g/dl en las mujeres y superior a 19 g/dl en los varones<sup>5</sup>.

De acuerdo a nuestras primeras observaciones, de todas las eritrocitosis patológicas observadas en la consulta externa, el 90% corresponden a ES, 9% a EPA y 1% a PV.

Adicionalmente, se pudo evidenciar que los pacientes con daño pulmonar leve, que viven a nivel del mar no presentan ninguna manifestación clínica; mientras que, estos mismos pacientes, a grandes alturas, tienen mayor riesgo de presentar Eritrocitosis Secundaria.

## DESCRIPCIÓN

### Material y métodos

El estudio clínico realizado incluyó 175 sujetos, distribuidos en Controles Normales (CN), pacientes con EPA, pacientes con ES y con PV. Todos los participantes fueron varones con radicatura en las ciudades de La Paz y El Alto a 3.600 y 4.000 m.s.n.m respectivamente. El seguimiento de los pacientes fue realizado mensualmente por consultorio externo. El diagnóstico de eventos trombóticos fue confirmado con Eco doppler y Tomografía axial computarizada.

### CLÍNICA DE LAS ERITROCITOSIS

Las eritrocitosis patológicas (EPA, ES, PV) presentan como manifestación clínica común:

- síntomas de hiperviscosidad sanguínea (cefaleas, parestesias, tinnitus, hipersomnias, disneas, visión borrosa, mialgias y alteraciones del estado de conciencia),
- signos de aumento de masa eritrocitaria (hiperemia),
- signos de disminución de la saturación de oxígeno (cianosis periférica) y
- signos de hipervolemia (facies pletórica, ingurgitación venosa y edema) (Tabla 1).

### Cefalea

La cefalea en la eritrocitosis es de tipo indefinido, la mayoría de los pacientes la detallan como una “pesadez”, ubicada usualmente en la región occipital, de intensidad moderada a leve y presente en las mañanas; algunas veces los pacientes son despertados por el dolor. La cefalea, cuando se asocia a Hipertensión Arterial Sistémica, se hace más intensa y no remite totalmente a analgésicos. En el estudio realizado, todos los pacientes con eritrocitosis patológicas (EPA, ES y PV) presentaron cefalea, la cual constituyó la sintomatología más frecuente y el primer motivo de consulta médica.

### Parestesia

La parestesia se presenta generalmente en miembros superiores e inferiores, se inicia durante la noche mientras el paciente duerme y usualmente se asocia a la falta de movimiento.

**Tabla 1.**  
**Características clínicas de pacientes con eritrocitosis patológicas**  
**y controles normales al momento del diagnóstico**

|                                  | CN           | EPA          | ES           | PV         |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| Número de pacientes              | 15           | 17           | 51           | 8          |
| Sexo Masculino/Femenino          | 15/0         | 17/0         | 51/0         | 6/2        |
| Edad, años<br>(mediana y rangos) | 36.5 (28-46) | 49,3 (43-71) | 51,2 (36-76) | 61 (56-73) |
| Cefalea, n (%)                   | NA           | 17 (100%)    | 51 (100%)    | 8 (100%)   |
| Parestesias, n (%)               | NA           | 17 (100%)    | 51 (100%)    | 5 (62%)    |
| Tinnitus, n (%)                  | NA           | 9 (53%)      | 24 (47%)     | 3 (50%)    |
| Hipersomnia, n (%)               | NA           | 8 (47%)      | 24 (47%)     | 1 (12%)    |
| Disnea, n (%)                    | NA           | 17 (100%)    | 51 (100%)    | 8 (100%)   |
| Cianosis, n (%)                  | NA           | 17 (100%)    | 51 (100%)    | 8 (100%)   |
| Evento trombótico, n (%)         | 0            | 0            | 6 (11.3%)    | 2 (25%)    |
| HAS n (%)                        | 0            | 2 (11,85)    | 25 (49%)     | 1 (12,5%)  |

**CN:** controles normales, **EPA:** eritrocitosis patológica de altura, **ES:** eritrocitosis secundaria, **PV:** policitemia vera. El estudio fue realizado con sujetos masculinos para eliminar el confundente género, por la acción inhibitoria de la eritropoyesis de las hormonas femeninas.

Se pudo evidenciar que todos los pacientes con EPA y ES presentaron parestesias, sin embargo, los pacientes con PV manifestaron esta condición solo en un 62%.

### Tinnitus

Se presenta como silbido, soplo o chirrido, exacerbándose probablemente durante la noche debido a la disminución de los ruidos externos propios del día. Se observó que el 50% de los pacientes con eritrocitosis presentaron tinnitus, pero estos remitieron posterior a las primeras sangrías.

### Hipersomnia

La hipersomnia en pacientes eritrocíticos es frecuente durante la marea alcalina post prandial y/o mientras observan la televisión.

El 47% de los pacientes con EPA y ES presentaron hipersomnia, y solo el 12% de los pacientes con PV reflejaron esta condición.

### Disnea

La disnea se observó como otro de los síntomas comunes en pacientes con eritrocitosis patológicas (EPA, ES, PV), esta fue de medianos esfuerzos

y frecuentemente asociada a palpitaciones precordiales.

### Prurito

El prurito se manifestó en el 50 % de los pacientes con PV generalmente evidenciable después de las duchas con agua caliente, síntoma propio de pacientes con enfermedad mieloproliferativa. En contraste, los pacientes con EPA y ES no presentaron este síntoma.

### Hiperemia

La hiperemia se manifiesta con mayor evidencia en la palma de las manos, labios y lóbulos de las orejas. Todos los pacientes con eritrocitosis patológicas presentaron hiperemia y se evidenció que a mayor concentración de Hemoglobina/Hematocrito mayor fue la hiperemia.

### Cianosis periférica

Todos los pacientes con eritrocitosis presentan diversos grados de cianosis, desde lo leve hasta lo más severo, evidenciable principalmente en los pulpejos de los dedos, labios y lóbulos de la oreja. Los pacientes con hábitos de tabaquismo presentaron cianosis más severas probablemente por la methemoglobinemia.

### Hipervolemia

Los signos de la hipervolemia se caracterizaron por facies pletórica, ingurgitación venosa y edema en miembros inferiores. Estos signos se reflejaron con mayor intensidad en pacientes con hemoglobina/hematocrito muy incrementados.

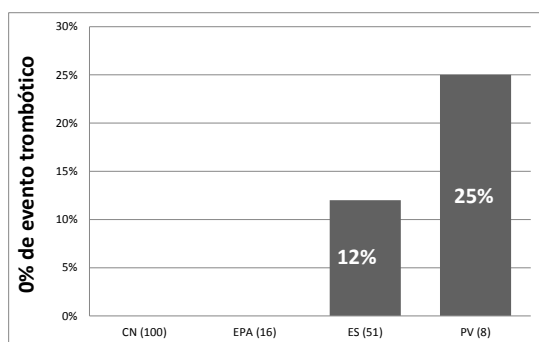
### COMPLICACIONES DE LAS ERITROCITOSIS

Las eritrocitosis patológicas suelen presentar complicaciones que agravan el cuadro clínico, mismas que requieren una atención médica de urgencia. Entre las complicaciones más frecuentemente observadas se encuentran los eventos trombóticos, Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP), hemorragias e insuficiencias cardíacas.

#### Evento trombótico

Los pacientes con PV presentaron un 25% de evento trombótico, seguido de los pacientes con ES con un 12%; mientras que, los pacientes con EPA no presentaron estos eventos (Cuadro 1).

**Cuadro 1.**  
**Eventos trombóticos en pacientes con eritrocitosis patológicas**



El evento trombótico más comunmente observado fue la Trombosis Venosa Profunda (TVP); mientras que, la trombosis mesentérica, tromboembolia pulmonar y trombosis en vena porta fueron poco frecuentes. Estos últimos 3 generalmente se asociaron a comorbilidades como la obesidad mórbida, la dislipidemia y la Hipertensión Arterial Sistémica (Tabla 2).

#### Hipertensión Arterial Sistémica (HAS)

La HAS fue otra de las complicaciones observadas en el estudio, 13 % en pacientes con EPA y 49% en pacientes con ES. Estas complicaciones

se normalizaron posterior a las sangrías, con excepción de pacientes con ES (12%) que continuaron con HAS, los mismos presentaron comorbilidades de obesidad y dislipidemia (Cuadro 2) (Tabla 3).

#### Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)

Los pacientes con eritrocitosis patológicas en la altura presentaron HAP y se evidenció que a mayores niveles de Hemoglobina/Hematocrito mayores fueron los valores de HAP. Esta hipertensión disminuyó notablemente posterior a las sangrías aunque, sin llegar a niveles normales.

#### Epistaxis

Esta complicación se presentó aproximadamente en un 5%, la mayoría de estos pacientes presentaron PA elevada.

#### Insuficiencia Cardíaca congestiva

Dos de los pacientes observados presentaron Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC). Esos pacientes presentaron en común rasgos de obesidad y un hematocrito superior a 70%. El cuadro clínico remitió con sangrías de volúmenes menores hasta alcanzar niveles normales de Hemoglobina/Hematocrito.

#### Convulsiones

Esta complicación se observó en un solo paciente, con un hematocrito superior a 70% y saturación de oxígeno inferior a 70%. El uso de ácido valproico fue necesario.

### CONCLUSIÓN

La caracterización clínica de la Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) se manifiesta clínicamente por síntomas de hiperviscosidad sanguínea, signos de aumento de masa eritrocitaria, signos de disminución de la saturación de oxígeno y signos de hipervolemia. Los pacientes con EPA seguidos por más de 3 años, no presentaron eventos trombóticos, probablemente porque la eritrocitosis aislada no es un factor de riesgo para eventos trombóticos. Sin embargo, estos eventos son frecuentes en la PV y la ES, ambas asociadas a la obesidad; y en el caso de la PV, por la presencia de factores procoagulantes propios de una enfermedad neoplásica.

La EPA presenta como principales complicaciones a la Hipertensión Arterial Sistémica y la Hipertensión Arterial Pulmonar,

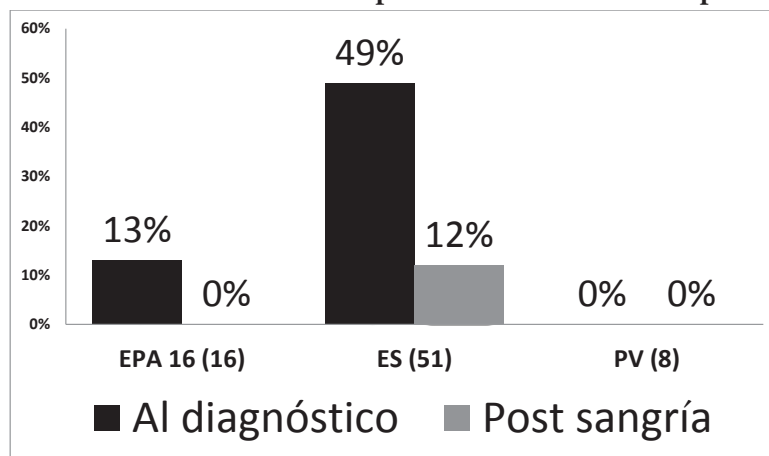
ambas secundarias a hipervolemia; y cuando la eritrocitosis esta asociada a HAS, la presencia de epistaxis es más frecuente.

**Tabla 2.**  
**Comorbilidades asociadas a trombosis en pacientes con eritrocitosis patológicas**

| Diagnóstico | Edad    | Comorbilidad      | Hb (g/dl) | P/A diagnóstico | Trombosis  |
|-------------|---------|-------------------|-----------|-----------------|------------|
| PV          | 60 años | No                | 23,5      | 130/88          | Vena porta |
| PV          | 73 años | DM, HAS           | 18,7      | 150/120         | TVP        |
| ES          | 68 años | Obesidad, várices | 19,1      | 105/90          | TVP        |
| ES          | 38 años | Obesidad, várices | 22,9      | 125/90          | TVP        |
| ES          | 64 años | Obesidad          | 21,3      | 114/80          | Mesenterio |
| ES          | 71 años | Dislipidemia      | 19,0      | 110/80          | Vena porta |
| ES          | 43 años | Obesidad          | 18,8      | 110/80          | TEP        |
| ES          | 38 años | Obesidad, Has     | 22,9      | 126/90          | TVP        |

**PV:** Policitemia Vera, **ES:** Eritrocitosis Secundaria, **DM:** Diabetes Mellitus, **HAS:** Hipertensión Arterial Sistémica, **TVP:** Trombosis Venosa Profunda, **TEP:** Tromboembolia Pulmonar.

**Cuadro 2.**  
**Hipertensión Arterial Sistémica en pacientes con eritrocitosis patológicas**



Las barras negras representan la HAS al momento del diagnóstico y las barras gris a post sangrías.

**Tabla 3. Comorbilidades de pacientes con ES**

| Dx | Edad | Evol | Comorbilidad  | Hb   | P/A     | P/A     |
|----|------|------|---------------|------|---------|---------|
| ES | 42   | 2    | Obesidad      | 25.3 | 140/102 | 120/90  |
| ES | 53   | 10   | Obesidad, HAS | 20.9 | 150/120 | 130/90  |
| ES | 38   | 5    | Obesidad, HAS | 22.3 | 126/90  | 150/110 |

## REFERENCIAS

1. Finazzi G, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT. Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):471-82.
2. McMullin MF. The classification and diagnosis of erythrocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2008;30(6):447-59.
3. Lee G, Arcasoy MO. The clinical and laboratory evaluation of the patient with erythrocytosis. *Eur J Intern Med*. 2015;26(5):297-302.
4. Oliver Ruiz JM, González García AE. Síndrome hipoxémico crónico. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2009;9:13E-22E
5. Amaru Ricardo, Miguez Hortencia, Pe.aloza Rosario, Torres Gina, Vera Oscar, Jeaneth Velarde, Nelly Huarachi, Reyna Mamani, Cuevas Heriberto. Eritrocitosis Patológica de Altura: Caracterización biológica, diagnóstico y Tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013;19(2):5-18.
6. Gonzales GF. Contribución Peruana a la hematología en poblaciones nativas de altura. *Acta Andina* 1998; 7: 105
7. Pasha MA, Newman JH. High-altitude disorders: pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010;137(6 Suppl):13-19.
8. Whayne TF Jr. Cardiovascular medicine at high altitude. *Angiology*. 2014 Jul;65(6):459-72.
9. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: Morphology and clinical practice. *Am J Hematol*. 2015;30.
10. Raedler LA. Diagnosis and Management of Polycythemia Vera: Proceedings from a Multidisciplinary Roundtable. *Am Health Drug Benefits*. 2014;7:S36-47.
11. Stein BL, Oh ST, Berenzon D, Hobbs GS, Kremyanskaya M, Rampal RK, Abboud CN, Adler K, Heaney ML, Jabbour EJ, Komrokji RS, Moliterno AR, Ritchie EK, Rice L, Mascarenhas J, Hoffman R. Polycythemia Vera: An Appraisal of the Biology and Management 10 Years After the Discovery of JAK2 V617F. *J Clin Oncol*. 2015;33(33):3953-60



# **Capítulo IV**

## **TRATAMIENTO IN VITRO DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA**

Ricardo Amaru, Ariel Amaru, Gina Torres, Teddy Quispe, Josue Mamani, Rosario Peñaloza,  
Hortencia Miguez, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

Las estatinas son un grupo de fármacos inhibidores de la HMG CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa) que inhibe la síntesis del colesterol<sup>1,2,3</sup>. Debido a su efecto pleiotrópico han sido extensamente investigadas en varios ensayos clínicos tales como trastornos cardiovasculares<sup>4,5,6</sup>, enfermedades neoplásicas<sup>7,8,9</sup>, alteraciones en la hemostasia<sup>10,11,12</sup> y procesos de angiogénesis<sup>13,14,15</sup>; por lo que se considera, que sus beneficios podrían ser más amplios de lo que se suponía en un principio. Por otra parte, se ha reportado que las estatinas poseen un mecanismo de inhibición de la proliferación y diferenciación celular donde están involucrados los productos derivados de la vía del mevalonato como el farnesil y el geranilgeranil<sup>16,17,18</sup>.

La Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA), propia de las poblaciones ubicadas en grandes alturas, presenta alteraciones en la eritropoyesis y la apoptosis de progenitores eritroides, y como consecuencia la proliferación celular de los eritrocitos es excesiva<sup>19,20</sup>.

El presente capítulo describe la acción inhibitoria “in vitro” de las estatinas sobre la eritropoyesis en pacientes con eritrocitosis patológicas.

## DESCRIPCIÓN

### Material y métodos

Se estudió la acción farmacológica de las estatinas en líneas celulares y células progenitoras hematopoyéticas. Las líneas celulares estudiadas fueron UKE1<sup>21,22,23</sup> con el gen JAK2<sup>V617F</sup> mutado y K562<sup>24,25,26</sup> con el gen JAK2 normal. Las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) fueron obtenidas de la médula ósea de los siguientes grupos de pacientes:

- Controles Normales, (sujetos sin patología de eritrocitosis)
- Pacientes con EPA sin tratamiento
- Pacientes con EPA en tratamiento con atorvastatina, 20 mg día
- Pacientes con ES
- Pacientes con PV

Todos de sexo masculino con una edad promedio de 48 años.

Los pacientes con EPA en tratamiento recibieron

20 mg de atorvastatina por más de 6 meses; la prescripción médica fue hipercolesterolemia.

Se llevaron a cabo pruebas de proliferación celular, cultivo de colonias y test de apoptosis. Para ello, las células mononucleadas de médula ósea de todos los pacientes fueron aisladas por gradiente de concentración con una viabilidad superior a 95%. Los progenitores hematopoyéticos fueron evaluados por citometría de flujo con anticuerpo CD34. Los cultivos realizados en medio semisólido de metilcelulosa y en medio líquido de RPMI fueron suplementados con Eritropoyetina y Simvastatina.

### Inhibición de la proliferación celular

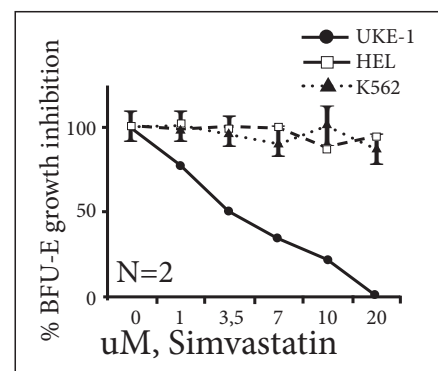
Las pruebas de proliferación celular realizadas en las líneas celulares UKE-1 y K562 demostraron que, la Simvastatina inhibe la proliferación de UKE-1; mientras que, las células K562 no se inhiben en concentraciones similares, pero expuestas a concentraciones mayores sí son inhibidas. Esta ha sido la primera demostración evidente de la actividad antiproliferativa de las estatinas en estas líneas celulares (Cuadro 1).

### Inhibición de colonias BFU-E

El cultivo de las colonias BFU-E realizadas en las líneas celulares UKE-1 y K562 demostraron que, la simvastatina inhibe la formación de las colonias a partir de UKE-1; mientras que, la simvastatina en la línea celular K562 no inhiben estas colonias. De acuerdo a estos experimentos realizados, se consideró que la concentración de 3,5 uM de simvastatina es la más adecuada para estudios de biología celular (Cuadro 2).

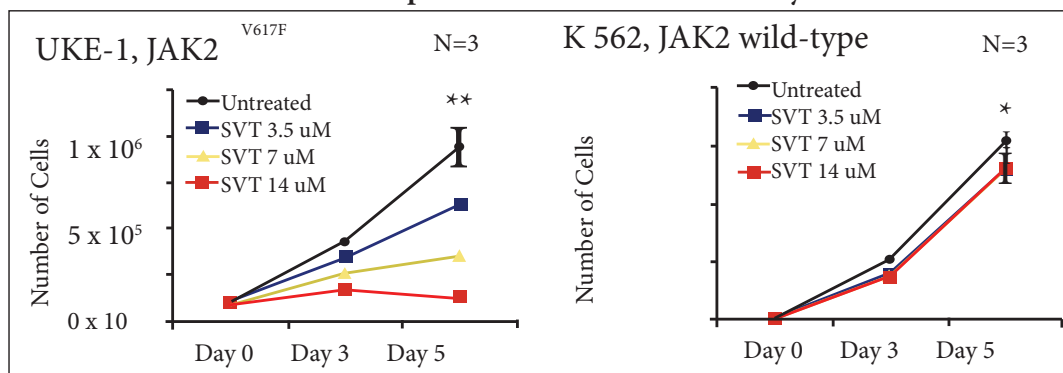
**Cuadro 2.**

**Inhibición de las colonias BFU-E con simvastatina**



*Estudio de cultivo de líneas celulares en medio de metilcelulosa a diferentes concentraciones de simvastatina.*

**Cuadro 1.**  
**Inhibición de la proliferación celular en UKE-1 y K562**



STV: Simvastatina (estatina), N: número de experimentos.

**UKE-1:** Línea celular homocigota con mutación del gen JAK-2, obtenida de un paciente con trombocitemia esencial.

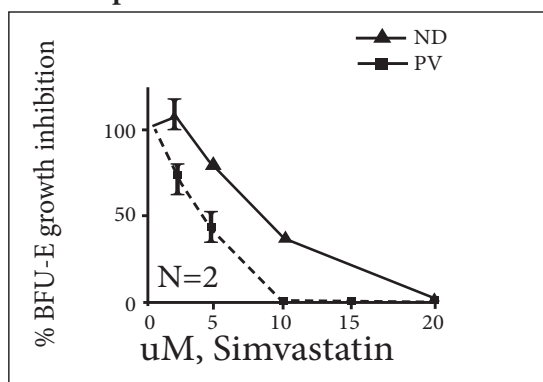
**K562:** Línea celular inmortalizada a partir de Leucemia Mieloide Crónica (BCR/ABL) en fase blástica.

### Inhibición de colonias BFU-E en Policitemia Vera

Las CPH de médula ósea de pacientes con PV y CN fueron cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa con suplemento de simvastatina a diferentes concentraciones. Se observó que, las colonias BFU-E en pacientes con PV se inhibieron a partir de 2.5 uM de simvastatina; mientras que, en la misma concentración estas colonias no se inhibieron en los Controles Normales, sin embargo, la inhibición se presentó a concentraciones mayores (Cuadro 3).

**Cuadro 3.**

### Inhibición de las colonias BFU-E con simvastatina en pacientes con Policitemia Vera



Cultivo en medio semisólido de metilcelulosa de CPH de médula ósea a diferentes concentraciones de simvastatina en pacientes con Policitemia Vera (PV) y Controles Normales (CN).

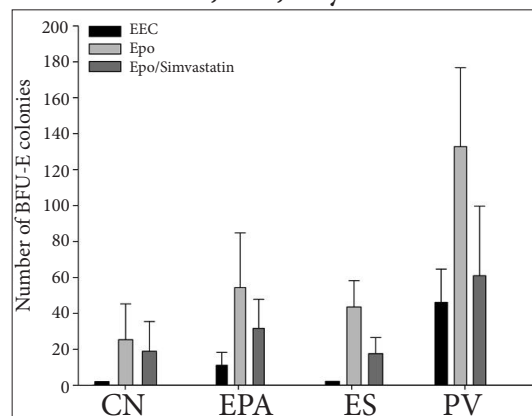
### Inhibición de las colonias BFU-E en pacientes con eritrocitosis patológica

Las CPH de médula ósea de sujetos normales (CN), Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA),

Eritrocitosis Secundaria (ES) y Policitemia Vera (PV) fueron cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa con suplemento de 3.5 uM de simvastatina. Las colonias BFU-E fueron inhibidas en un 25% en CN, 40% en EPA, 45% en ES y 50% en PV (Cuadro 4).

**Cuadro 4.**

### Inhibición de las colonias BFU-E en CN, EPA, ES y PV



Cultivo en medio semisólido de metilcelulosa de CPH de médula ósea de CN, EPA, ES y PV sin suplemento (barra negra), con suplemento de Eritropoyetina 2UI (barra clara) y suplementos de Eritropoyetina 2UI más 3.5 uM de simvastatina (barra gris). Número de experimentos: 10

### Inhibición de Colonias BFU-E en EPA sin tratamiento de atorvastatina

Las CPH de médula ósea de pacientes con EPA sin tratamiento con atorvastatina, cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa suplementadas con 2 UI de eritropoyetina indujeron la proliferación de colonias BFU-E hasta el día 18; mientras que,

las suplementadas con 2 UI de eritropoyetina y 30 uM de simvastatina inhibieron esta proliferación; al día 18 no se observaron colonias viables.

Por otro lado, en el medio de cultivo sin eritropoyetina, se observó una proliferación de colonias BFU-E hasta el día 18, pero no en la misma intensidad que en las suplementadas con eritropoyetina. Mientras, en el medio de cultivo sin eritropoyetina y con suplemento de 30 uM de simvastatina la proliferación de colonias fue inhibida (Tabla 1).

**Tabla 1.**  
**Colonias BFU-E en pacientes con EPA sin tratamiento**

| Pacientes EPA   | Suplemento 1 | Suplemento 2 | Número de BFU-E |        |        |
|-----------------|--------------|--------------|-----------------|--------|--------|
|                 |              |              | día 7           | día 14 | día 18 |
| Sin tratamiento | Epo 2 UI     | Sin SMV      | 71              | 111    | 90     |
|                 |              | SMV 30uM     | 48              | 73     | 0      |
|                 | Sin Epo      | Sin SMV      | 2               | 25     | 13     |
|                 |              | SMV 30uM     | 2               | 19     | 0      |
|                 |              |              |                 |        |        |
|                 |              |              |                 |        |        |

Las Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) suplementadas con Epo y simvastatina.

EPA: Eritrocitosis Patológica de Altura; Epo: Eritropoyetina; SMV: Simvastatina.

### Inhibición de Colonias BFU-E en EPA con tratamiento de atorvastatina

Las CPH de médula ósea, de pacientes con EPA en tratamiento con 20 mg de atorvastatina VO día por más de 6 meses, fueron cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa con suplemento de 2 UI de eritropoyetina. Se observó que la eritropoyetina indujo la proliferación de colonias BFU-E hasta el día 14; mientras que, en los cultivos suplementados con 2 UI de eritropoyetina y 30 uM de simvastatina, esta proliferación fue inhibida.

Así mismo, las CPH de pacientes con EPA en tratamiento con 20 mg de atorvastatina cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa sin eritropoyetina y sin simvastatina indujeron la proliferación de colonias BFU-E hasta el día 14, pero no en la misma intensidad que las suplementadas con eritropoyetina; sin embargo, en las colonias cultivadas sin eritropoyetina y

suplementadas con 30 uM de simvastatina, la proliferación fue totalmente inhibida (Tabla 2).

**Tabla 2.**  
**Colonias BFU-E en pacientes con EPA en tratamiento con atorvastatina**

| Pacientes EPA                    | Suplemento 1 | Suplemento 2 | Número de BFU-E |        |        |
|----------------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------|--------|
|                                  |              |              | día 7           | día 14 | día 18 |
| Con tratamiento de atorvastatina | Epo 2 UI     | Sin SMV      | 119             | 159    | 0      |
|                                  |              | SMV 30uM     | 67              | 92     | 0      |
|                                  | Sin Epo      | Sin SMV      | 10              | 11     | 0      |
|                                  |              | SMV 30uM     | 0               | 2      | 0      |

Células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH) suplementadas con Epo y simvastatina.

EPA: Eritrocitosis Patológica de Altura; Epo: Eritropoyetina; SMV: Simvastatina.

### Inhibición de la diferenciación de colonias BFU-E

Las CPH de médula ósea, cultivadas en medio semisólido de metilcelulosa con suplemento de 3.5 uM de simvastatina, inhibieron la diferenciación de las colonias BFU-E de pacientes con EPA, expresándose en colonias pequeñas y sin hemoglobinización (Figura 1).

### Inducción de apoptosis celular

Las CPH de pacientes con EPA fueron cultivadas en medio líquido de RPMI con suplemento de simvastatina. Este estudio fue realizado con la técnica de Annexina V/7AAD utilizando un citómetro de flujo. Se observó que la apoptosis celular fue de un 28,9% con suplemento de simvastatina y un 12,3% sin suplemento de simvastatina (Figura 2).

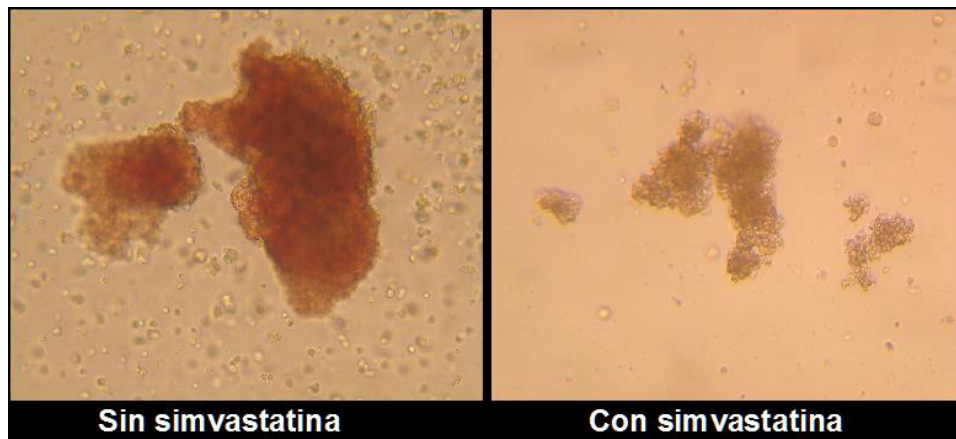
### CONCLUSIÓN

Existen evidencias experimentales de que los productos del mevalonato tales como el farnesil, el dolicol, el geranil y la ubiquinona están implicados en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación celular y la apoptosis celular. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa bloquean la vía del mevalonato reduciendo todos sus productos finales.

Los experimentos realizados han evidenciado que la simvastatina inhibe la proliferación y diferenciación tanto de líneas celulares como de CPH de pacientes con Eritrocitosis Patológica de

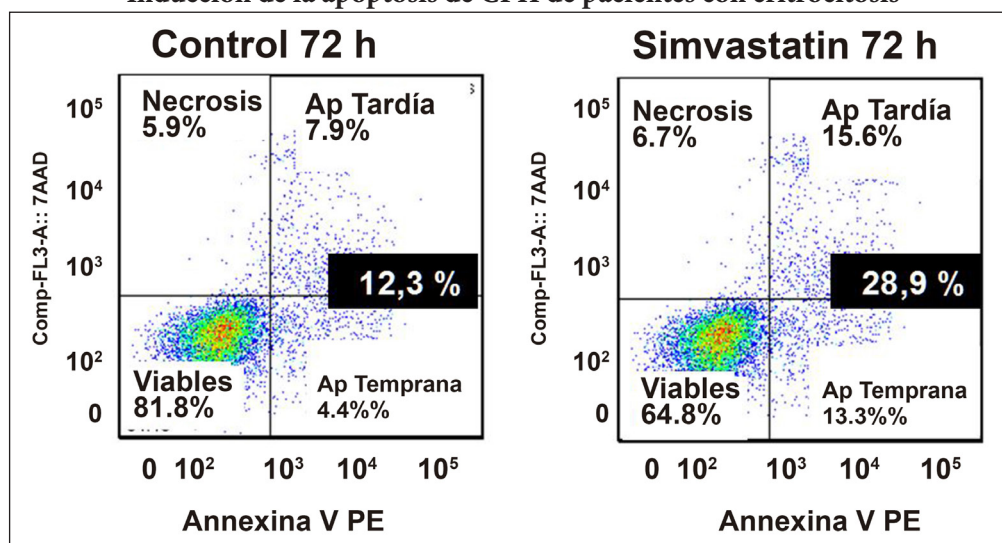
Altura. La demostración 'in vitro' de la eficacia del tratamiento de la EPA con estatinas se constituye en una base fundamental para el tratamiento de pacientes con EPA, ES y PV.

**Figura 1.**  
**Inhibición de la diferenciación de colonias BFU-E en EPA**



A la derecha, se observa la inhibición de la diferenciación de las colonias BFU-E suplementadas con simvastatina, caracterizada por la presencia de colonias pequeñas y un retardo en la hemoglobinización. Número de experimentos: 15.

**Figura 2.**  
**Inducción de la apoptosis de CPH de pacientes con eritrocitosis**



El cálculo de porcentaje de la apoptosis es producto de la sumatoria de la apoptosis tardía y la apoptosis temprana. Número de experimentos: 12.

## REFERENCIAS

1. Sahebkar A, Simental-Mendía LE, Pedone C, Ferretti G, Nachtigal P, Derosa G, Maffioli P, Watts GF. Statin therapy and plasma free fatty acids: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Dec 1. doi: 10.1111
2. Wong WWL, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002;16(4):508-519.
3. Ling Q, Tejada-Simon MV. Statins and the brain: New perspective for old drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2015;66:80-86.
4. Hasvold P, Thuresson M, Sundström J, Hammar N, Kjeldsen SE, Johansson G, Holme I, Bodegård Association Between Paradoxical HDL Cholesterol Decrease and Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients Initiated on Statin Treatment in a Primary Care Setting. *J Clin Drug Investig*. 2015 Dec 30. (DOI 10.1007/s40261-015-0372-9).
5. McCarthy M. US panel recommends statins for adults aged 40 to 75 at 10% or greater risk of cardiovascular disease. *BMJ*. 2015 Dec 29;351:h7008. doi: 10.1136/bmj.h7008.
6. Colivicchi F, Sternhufvud C, Gandhi SK. Impact of treatment with rosuvastatin and atorvastatin on cardiovascular outcomes: evidence from the Archimedes-simulated clinical trials. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2015;7:555-65.
7. Rigoni M, Riganti C, Vitale C, Griggio V, Campia I, Robino M, Foglietta M, Castella B, Sciancalepore P, Buondonno I, Drandi D, Ladetto M, Boccadoro M, Massaia M, Coscia M. Simvastatin and downstream inhibitors circumvent constitutive and stromal cell-induced resistance to doxorubicin in IGHV unmutated CLL cells. *Oncotarget*. 2015;6(30):29833-46.
8. Shadman M, Mawad R, Dean C, Chen TL, Shannon-Dorcy K, Sandhu V, Hendrie PC, Scott BL, Walter RB, Becker PS, Pagel JM, Estey EH. Idarubicin, cytarabine, and pravastatin as induction therapy for untreated acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 2015;90(6):483-6.
9. Ahmed T, Hayslip J, Leggas M. Simvastatin interacts synergistically with tipifarnib to induce apoptosis in leukemia cells through the disruption of RAS membrane localization and ERK pathway inhibition. *Leuk Res*. 2014;38(11):1350-7
10. Pršić A, Kiwanuka E, Caterson SA, Caterson EJ. Anticoagulants and Statins As Pharmacological Agents in Free Flap Surgery: Current Rationale. *Eplasty*. 2015;20:15.
11. Bitto N, Salerno F, Tripodi A, La Mura V. Coagulation and fibrosis: A potential non-negligible target of statins in chronic hepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(1):277-8.
12. Li L, Zhang P, Tian JH, Yang K. Statins for primary prevention of venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;18:12.
13. Chang CC, Wang SS, Hsieh HG, Lee WS, Chuang CL, Lin HC, Lee FY, Lee SD, Huang HC. Rosuvastatin improves hepatopulmonary syndrome through inhibition of inflammatory angiogenesis of lung. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(6):449-60.
14. Escudero P, Navarro A, Ferrando C, Furio E, Gonzalez-Navarro H, Juez M, Sanz MJ, Piqueras L. Combined treatment with bexarotene and rosuvastatin reduces angiotensin-II-induced abdominal aortic aneurysm in apoE(-/-) mice and angiogenesis. *Br J Pharmacol*. 2015;172(12):2946-60.
15. Huang D, Wang FB, Guo M, Li S, Yan ML, Yu T, Wei M, Li JB. Effect of combined treatment with rosuvastatin and protein kinase C $\beta$ 2 inhibitor on angiogenesis following myocardial infarction in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2015;35(3):829-38.
16. Wang T, Seah S, Loh X, Chan CW, Hartman M, Goh BC, Lee SC. Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget*. 2015 Nov 11. doi: 10.18632/oncotarget.6304.

17. Karlic H, Thaler R, Gerner C, Grunt T, Proestling K, Haider F, Varga F. Inhibition of the mevalonate pathway affects epigenetic regulation in cancer cells. *Cancer Genet.* 2015;208(5):241-52.
18. Altwaigi AK. Statins are potential anticancerous agents (review). *Oncol Rep.* 2015;33(3):1019-39.
19. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz.* 2013; 19(2):5-18.
20. Amaru R, Vera O, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Mecanismo molecular de las estatinas en el Tratamiento de la Eritrocitosis Patológica de Altura. *Rev Med La Paz.* 2013;19(2):19-27.
21. Lippert E, Girodon F, Hammond E, Jelinek J, Reading NS, Fehse B, et al. Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: a multicenter study. *Haematologica.* 2009;94:38-45.
22. Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia.* 2006;20:471-476.
23. Fiedler W, Henke RP, Ergun S, Schumacher U, Gehling UM, Vohwinkel G, et al. Derivation of a new hematopoietic cell line with endothelial features from a patient with transformed myeloproliferative syndrome: a case report. *Cancer.* 2000;15:344-351.
24. Lozzio C.B.; Lozzio, B. "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome". *Blood* 1975;45 (3): 321-34.
25. Klein, E.; Ben-Bassat, H.; Neumann, H.; Ralph, P.; Zeuthen, J.; Polliack, A.; Vánky, F. "Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia". *International Journal of Cancer,* 1976;18 (4): 421-31.
26. Andersson, LC.; Nilsson, K.; Gahmberg CG. "K562 - A human erythroleukemic cell line". *International Journal of Cancer,* 1979; 23 (2): 143-7.

## Capítulo V

### MECANISMO MOLECULAR DE LAS ESTATINAS EN EL TRATAMIENTO DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA

Ricardo Amaru, Ariel Amaru, Gina Torres, Teddy Quispe, Josue Mamani, Rosario Peñaloza,  
Hortencia Miguez, Maria Aguilar, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

La proliferación y la diferenciación celular está regulada por un complejo mecanismo molecular donde los productos finales de la vía del mevalonato juegan un rol importante<sup>1,2</sup>; esto hace que exista un interés especial en los fármacos que inhiben esta vía permitiendo así, diseñar protocolos de tratamiento en enfermedades cuya etiología está relacionada con la alteración de la proliferación y diferenciación celular, como por ejemplo en las neoplasias y las eritrocitosis patológicas<sup>3,4</sup>.

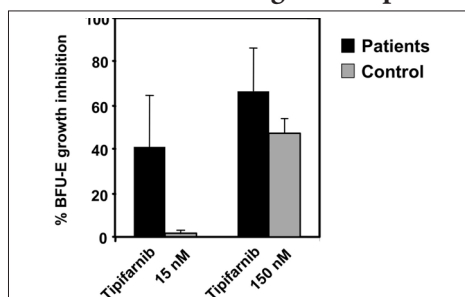
Las estatinas, inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa, bloquean la vía del mevalonato reduciendo la concentración de sus productos derivados tales como el farnesil, el geranil, el dolicol y otros<sup>5,6</sup>.

## DESCRIPCIÓN

### MECANISMO FARMACOLÓGICO Y MOLECULAR

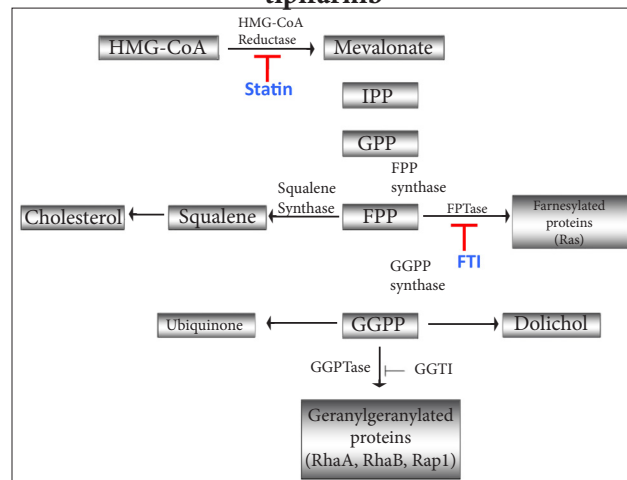
Larghero J et al.<sup>7</sup> reportó que el tipifarnib, un inhibidor de la farnesiltransferasa, inhibe la proliferación de las colonias BFU-E en pacientes con Policitemia Vera (Cuadro 1). El tipifarnib inhibe específicamente a la enzima farnesiltransferasa disminuyendo así las proteínas farnesiladas<sup>7,8</sup>. De igual manera, las estatinas inhiben específicamente, “río arriba” en la vía del mevalonato, a la enzima HMG-Co A reductasa disminuyendo de este modo las concentraciones de todos los metabolitos de esta vía (Cuadro 2). Esta observación constituyó un fundamento para diseñar protocolos experimentales con estatinas.

**Cuadro 1.**  
Mecanismo farmacológico de tipifarnib



Las columnas oscuras representan a pacientes con Policitemia Vera y las columnas claras a controles normales. Las concentraciones de 15 nM de Tipifarnib solo inhiben las colonias BFU-E de pacientes con Policitemia Vera, pero a 150 nM de concentración se inhiben tanto las colonias de pacientes como las de controles normales. Larghero J et al. Blood 2005;105:3743-3745.

**Cuadro 2.**  
Mecanismo molecular de las estatinas y el tipifarnib

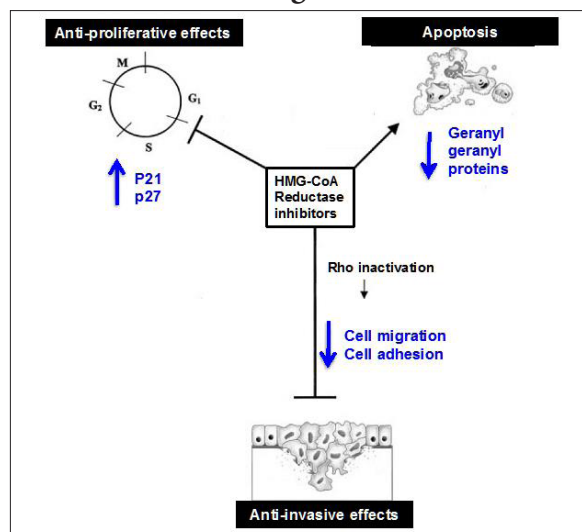


El Tipifarnib, inhibidor específico de la farnesilación de las proteínas. Las estatinas, inhibidores de los productos finales de la vía del mevalonato. Sumaya N et al. JPET 2006;316:403-409.

### ACCIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS ESTATINAS

La acción farmacológica de las estatinas tiene que ver con la disminución de las proteínas geranylgeranilizadas, la inactivación de la proteína Rho y el aumento de las proteínas p21/p27. Subsecuentemente, la disminución de las proteínas geranylgeranilizadas induce apoptosis celular; la inactivación de la proteína Rho provoca efectos anti-invasivos y finalmente, el aumento de las proteínas p21/p27 bloquea la fase S del ciclo celular produciendo efectos antiproliferativos<sup>9,10</sup> (Cuadro 3).

**Cuadro 3.**  
Acción farmacológica de las estatinas

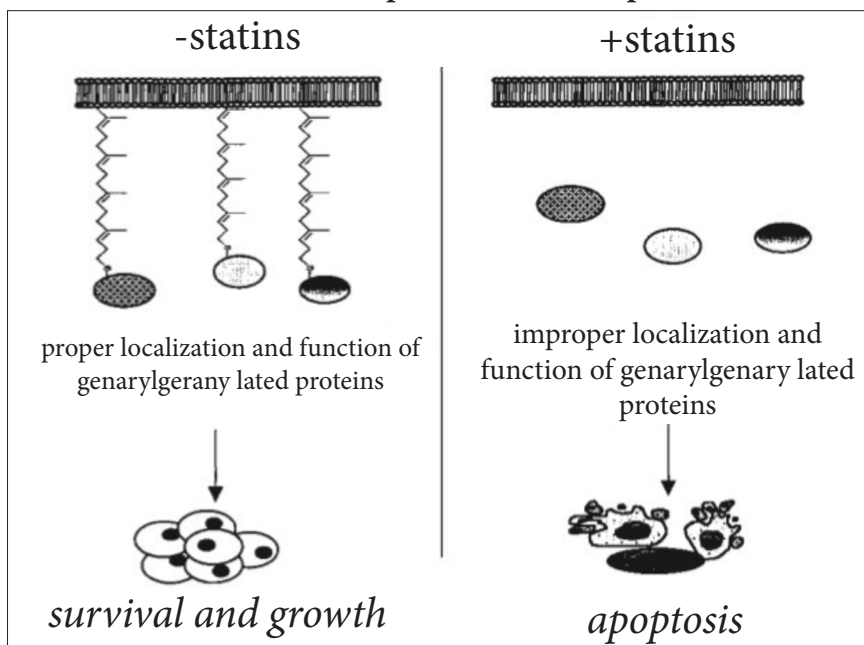


### Efecto apoptótico

Las estatinas disminuyen la concentración del geranilgeranilo, seguida de un incremento de proteínas no geranilgeranilizadas (proteínas biológicamente inactivas) que no logran unirse a la membrana celular, provocando de este modo la apoptosis celular <sup>11</sup> (Cuadro 4).

**Cuadro 4.**

#### Inhibición de la isoprenilación de las proteínas.



A la izquierda, proteínas geranilgeranilizadas biológicamente activas. A la derecha, proteínas no geranilgeranilizadas biológicamente inactivas (Wong W. *Leukemia*.2002;16:508-519).

Este mecanismo de apoptosis causado por las estatinas esta mediado por la disminución de la geranilgeranilización de la proteína Ras, lo que impide activar a ERK y AKT, inhibidores naturales de Caspasa 3. Esta caspasa al no tener inhibición queda libre para inducir apoptosis <sup>12,13</sup> (Cuadro 5).

### Inhibición del ciclo celular

La simvastatina, gracias a su efecto pleiotrópico, induce al aumento de la proteína p27 (proteína responsable de la regulación G1), bloqueando el ciclo celular entre las fases G1 a S, lo que favorece la inducción de apoptosis de la serie eritroide <sup>14,15</sup> (Cuadro 6).

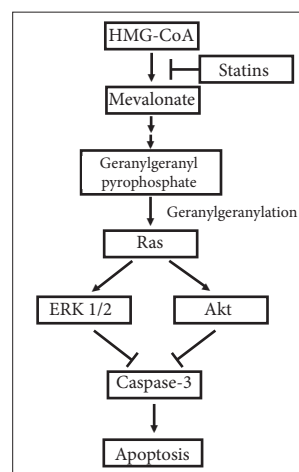
### Efectos antitrombóticos de la atorvastatina

El grupo dirigido por Danai Khemasuwan, del Centro Médico Albert Einstein, ha evaluado la influencia de las estatinas en la incidencia de la

trombosis venosa profunda en 740 pacientes con cáncer, donde los pacientes que recibieron atorvastatina presentaron un 8% de evento trombótico; mientras que, el grupo que no recibió atorvastatina presentó un 21%. Así también, el grupo del profesor Parra, del Hospital Universitario de Madrid en España, reportó

**Cuadro 5.**

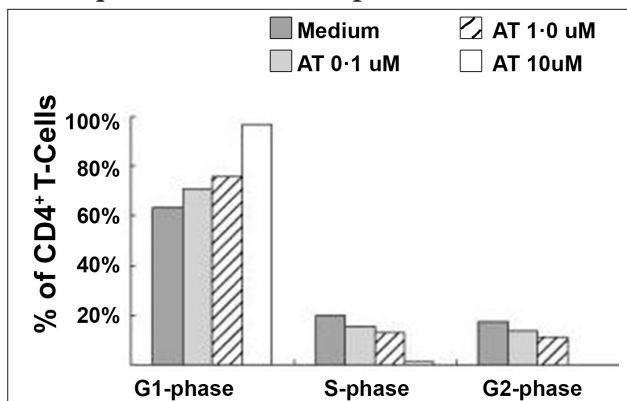
#### Estatinas en la inducción de la apoptosis



Las estatinas inducen apoptosis via BCL-xL y Caspasa 9 debido a la inhibición de la geranilgeranilización. *Kidney International* 2003; 64:181.

que las estatinas favorecían en la recanalización venosa tras un episodio de Trombosis Venosa

**Cuadro 6.**  
**Bloqueo del ciclo celular por la atorvastatina**



Los linfocitos T son bloqueados por la atorvastatina en la transición de fases G1 a S del ciclo celular.

Profunda (TVP), lo que evitaría la progresión del síndrome post trombótico<sup>16,17</sup>.

Por lo descrito anteriormente, los pacientes, con Eritrocitosis Secundarias y con probabilidades de presentar evento trombótico, se beneficiarían de esta acción farmacológica (Cuadro 7).

- Bloqueo de la isoprenilación de las proteínas Rho y Ras.
- Inhibición de la fosforilación de Jak2 y Stat5.
- Inhibición de la glicosilación de la EpoR.
- Alteración de dominios lipid raft.

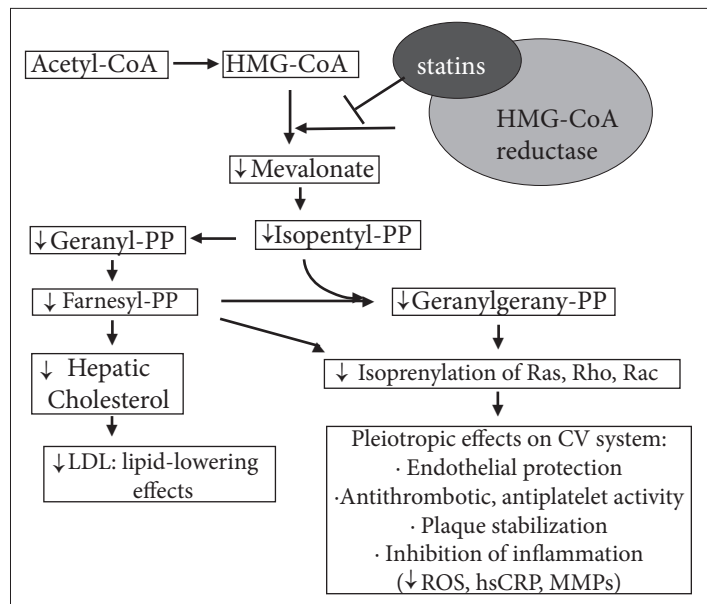
#### **Bloqueo de la isoprenilación por las estatinas**

La simvastatina reduce los productos de la vía del mevalonato. La depleción del farnesil produce la inactivación de la proteína RAS y la depleción del geranilo geranilo produce la inactivación de la proteína Rho. De este modo la proliferación celular y la diferenciación celular son inhibidas. En el western blot suplementado con simvastatina, la proteína RhoAm farnesilada esta disminuida, mientras que la proteína RhoAc no farnesilada o citoplasmática esta aumentada<sup>18,19</sup> (Cuadro 8).

#### **Inhibición de la fosforilación de Jak2 y Stat5**

La HMG CoA reductasa es inhibida por la estatina, en consecuencia la síntesis de geranylgeranyl PP disminuye, y por mecanismos aún desconocidos esta disminución inhibe la fosforilación de Jak-2

**Cuadro 7.**  
**Efectos antitrombóticos de las estatinas**



Esquema de eventos moleculares que explica la protección endotelial, el efecto antitrombótico y la actividad antiplaquetaria.

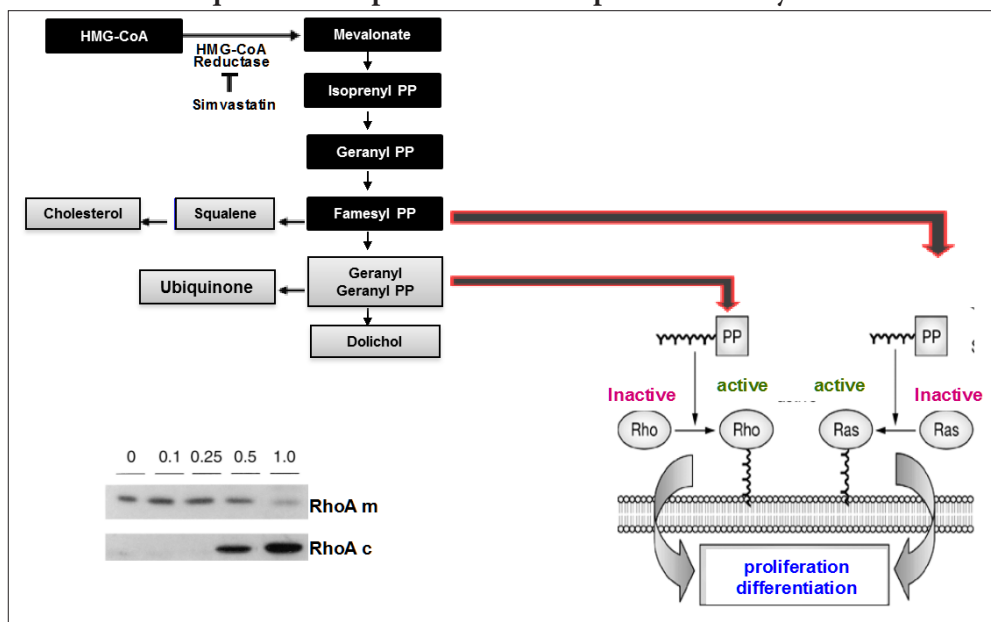
#### **MECANISMO MOLECULAR DE LAS ESTATINAS**

Los mecanismos moleculares de las estatinas en la inhibición de la proliferación y diferenciación de la línea eritroide son:

y Stat-5, bloqueando de este modo la proliferación y diferenciación celular. El Western Blot suplementado a diferentes concentraciones de lovastatina refleja la inhibición de la fosforilación de Jak2 y Stat-5<sup>8</sup> (Cuadro 9).

Cuadro 8.

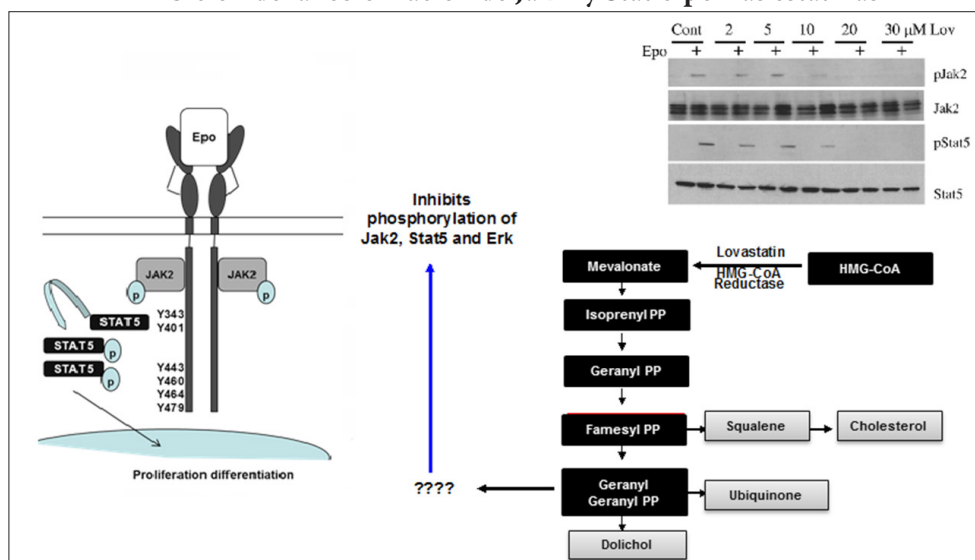
## Bloqueo de la isoprenilación de las proteínas RAS y Rho



Se observa la inhibición de la HMG-CoA reductasa seguida de la inhibición de la geranylgeranilización de la proteína Rho y la farnesilación de la proteína Ras. Las proteínas Rho y Ras no logran anclarse en la membrana lipídica, bloqueando las señales de proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides. Se presenta un Western blot con anticuerpos anti Rho a concentraciones de 0.5 y 1 mM de simvastatina, la proteína RhoAc esta incrementada en el citoplasma. (Weber M, Nature Reviews Neurology 2005;1:106-112, Kang S 2009; Wong W 2002).

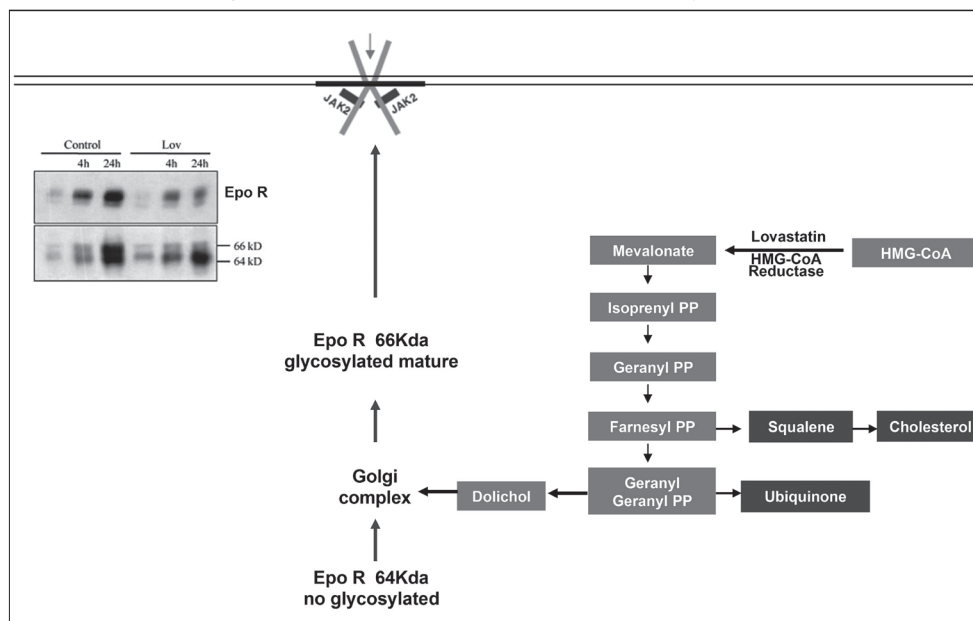
Cuadro 9.

## Inhibición de la fosforilación de Jak-2 y Stat-5 por las estatinas



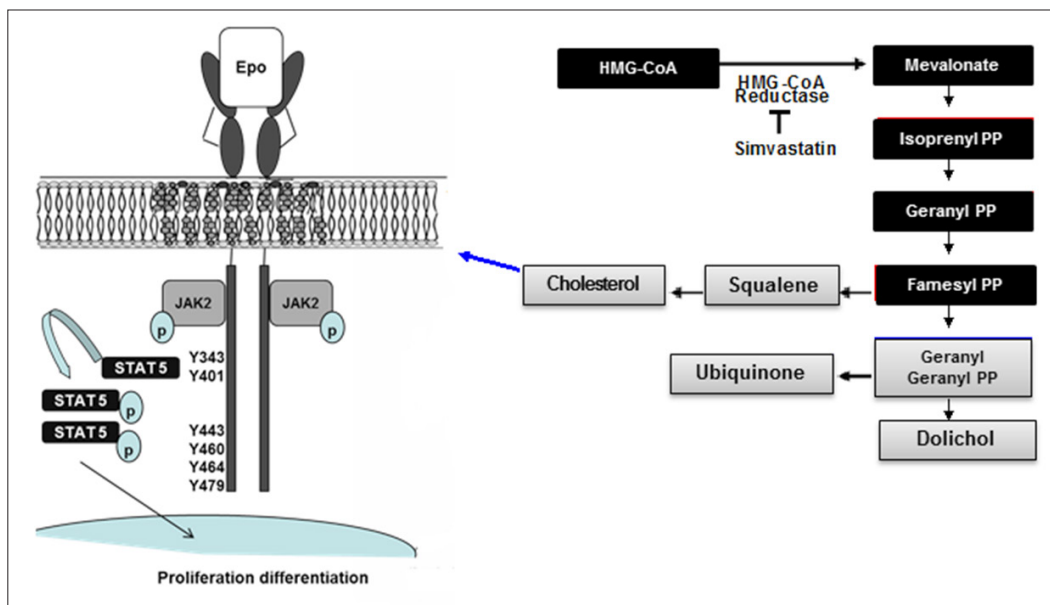
La depleción de geranylgeranilo inhibe la fosforilación de JAK2 y STAT5, de este modo se bloquea la vía de señalización para la proliferación celular. En este Western Blot suplementado con lovastatina, la fosforilación de JAK2 y el STAT5 esta inhibida (Sumaya N, 2006).

**Cuadro 10.**  
**Inhibición de la glicosilación del Receptor de Eritropoyetina por las estatinas**



La depleción del dolichol inhibe la síntesis de EpoR maduro de 66 Kda o forma glicosilada, de modo que el EpoR a nivel de la membrana celular está reducido. En este Western Blot con suplemento de lovastatina, el EpoR maduro está disminuido, mientras que el EpoR inmaduro está aumentado. (Hamadmad SN., 2007).

**Cuadro 11.**  
**Alteraciones de microdominios Lipid Raft**



La depleción del colesterol daña la estructura del Lipid Raft. En consecuencia el EpoR no realiza sus funciones fisiológicas normales (Lori N. Griner 2012).

### Inhibición de la glicosilación del Receptor de la Eritropoyetina (EpoR)

La inhibición de la HMG CoA bloquea la síntesis del dolicol, seguida de la inhibición de la glicosilación del Receptor de la Eritropoyetina (EpoR 64 Kda), de ese modo los EpoR 64 Kda no migran a la membrana celular y disminuyen la concentración de EpoR 66 Kda a nivel de la membrana, por lo tanto la eritropoyetina no encuentra receptores disponibles para su acción farmacológica. Se observa un Western Blot con la disminución del EpoR glicosilado (66 KD) y aumento del EpoR no glicosilado (64 KD)<sup>20</sup> (Cuadro 10).

### Alteración de dominios Lipid Raft

Los microdominios Lipid Raft, ricos en colesterol, son útiles para el anclamiento de los EpoR a nivel de la membrana celular. Las estatinas reducen la concentración de la síntesis del colesterol, esto altera la estructura de los microdominios y evita el anclamiento adecuado de los EpoR, bloqueando de esta manera la proliferación y diferenciación celular<sup>21</sup> (Cuadro 11).

### Aumento de p27

Las estatinas inducen el incremento de la proteína p27, éste a la vez bloquea la ciclina A/Cdk2 seguida de la inducción de la apoptosis<sup>22</sup> (Cuadro 12).

### CONCLUSIÓN

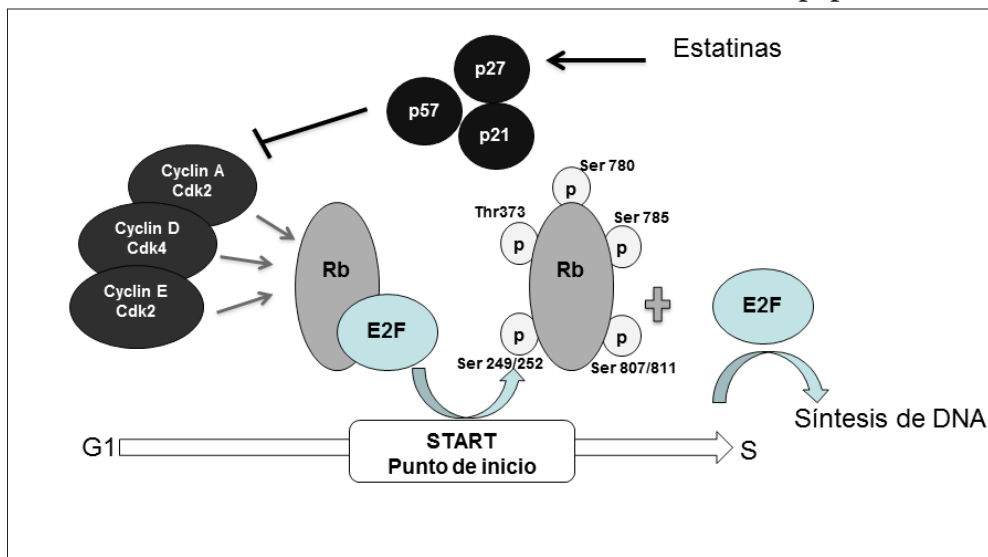
Las eritrocitosis patológicas se caracterizan por: a) el aumento de la hemoglobina y el hematócrito, como expresión del incremento de la eritropoyesis y disminución de la apoptosis de la serie eritroide; b) la presencia de eventos trombóticos, sobre todo en aquellas Eritrocitosis Secundarias asociadas a obesidad o dislipidemia; c) el aumento de la Presión Arterial Pulmonar que está directamente relacionado con los niveles de hematócrito elevado.

Precisamente, las estatinas actúan sobre estos 3 mecanismos fisiopatológicos, ya que gracias a la reducción de los productos de la vía del mevalonato, la eritropoyesis disminuye y la apoptosis de la serie eritroide se incrementa; reflejándose en la clínica por la disminución de la Hb y Ht.

Los efectos pleiotrópicos de las estatinas, al regular el proceso inflamatorio y la biología del endotelio, disminuyen la probabilidad de eventos trombóticos en pacientes con eritrocitosis patológicas y a través de este mismo mecanismo las estatinas tienen la propiedad de regular la Presión Arterial Pulmonar.

Por todo lo descrito anteriormente, aparentemente las estatinas se constituyen en un medicamento de primera línea que debería de usarse en pacientes con eritrocitosis patológicas, incluso en la Policitemia Vera como medicamento coadyuvante al tratamiento estándar.

**Cuadro 12.**  
**Mecanismo molecular de las estatinas en la inducción de la apoptosis**



## REFERENCIAS

1. Miettinen TP, Björklund M. Mevalonate Pathway Regulates Cell Size Homeostasis and Proteostasis through Autophagy. *Cell Rep*. 2015 Dec 22;13(11):2610-20.
2. Tricarico PM, Crovella S, Celsi F. Mevalonate Pathway Blockade, Mitochondrial Dysfunction and Autophagy: A Possible Link. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16067-84.
3. Amaru R, Vera O, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Mecanismo molecular de las estatinas en el Tratamiento de la Eritrocitosis Patológica de Altura. *Rev Med La Paz*. 2013;19(2):19-27.
4. Crosbie J, Magnussen M, Dornbier R, Iannone A, Steele TA. Statins inhibit proliferation and cytotoxicity of a human leukemic natural killer cell line. *Biomark Res*. 2013;1(1):33.
5. Strykowska-Góra A, Karczmarek-Borowska B, Góra T, Krawczak K. Statins and cancers. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015;19(3):167-75.
6. Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernandez-Checa JC. Anticancer Agents Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. *Med Chem*. 2012;12(4):303-15
7. Larghero J1, Gervais N, Cassinat B, Rain JD, Schlageter MH, Padua RA, Chomienne C, Rousselot P. Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (R115777) preferentially inhibits in vitro autonomous erythropoiesis of polycythemia vera patient cells. *Blood*. 2005;105(9):3743-5.
8. Sumaya N. Hamadmad, Matthew K. Henry,1 and Raymond J. Hohl. Erythropoietin Receptor Signal Transduction Requires Protein Geranylgeranylation. *JPET* 2006;316:403-409.
9. Denoyelle C, Vasse M, Körner M, Mishal Z, Ganné F, Vannier JP, Soria J, Soria C. Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*. 2001;22(8):1139-48.
10. Feldt M, Bjarnadottir O, Kimbung S, Jirström K, Bendahl PO, Veerla S, Grabau D, Hedenfalk I, Borgquist S. Statin-induced anti-proliferative effects via cyclin D1 and p27 in a window-of-opportunity breast cancer trial. *J Transl Med*. 2015;13:133.
11. WW-L Wong, J Dimitroulakos, MD Minden, LZ Penn. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002;16; 508-519.
12. Masashi Yanae, Masanobu Tsubaki. Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011;30:2-8.
13. Luis Miguel Blanco-Colio, Pilar Justo, Ilse Daehn, Corina Lorz, Alberto Ortiz and Jesus Egido. Bcl-xL overexpression protects from apoptosis induced by HMG-CoA reductase inhibitors in murine tubular cells. *Kidney International*. 2003;64:181-191.
14. P-T Brinkkoetter, U Gottmann, J Schulte, F J van der Woude, C Braun, and B A Yard. Atorvastatin interferes with activation of human CD4+ T cells via inhibition of small guanosine triphosphatase (GTPase) activity and caspase-independent apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(3):524-532.
15. Wolfe AR, Debeb BG, Lacerda L, Larson R, Bambhroliya A, Huang X, Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Van Laere S, Diagaradjan P, Ruffell B, Trenton NJ, Chu K, Hittelman W, Diehl M, Levental I, Ueno NT, Woodward WA. Simvastatin prevents triple-negative breast cancer metastasis in pre-clinical models through regulation of FOXO3a. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;154(3):495-508.
16. Lassila R, et al. Statin use offers protection against first ever VTE events and appears as a primary prevention tool in patients without anticoagulation or antiplatelet medication. The association of statin use with reduced incidence of venous thromboembolism: a population-based cohort study. *BMJ*, 2014;4
17. Emil Kozarov, Teresa Padro, Lina Badimon. View of statins as antimicrobials in cardiovascular risk modification. *Cardiovascular Research*. 2014;102: 362-374.

18. Wong WWL, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002;16(4):508-519.
19. Kang S, Kim E-S, Moon A. Simvastatin and lovastatin inhibit breast cell invasion induced by H-Ras. *Oncol. Rep.* 2009;21(5):1317-1322.
20. Hamadmad SN, Henry MK, Hohl RJ. Erythropoietin receptor signal transduction requires protein geranylgeranylation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;316(1):403-409.
21. Lori N. Griner, Kathy L. McGraw, Joseph O. Johnson, Alan F. List, Gary W. Reuther. JAK2-V617F-mediated signalling is dependent on lipid rafts and statins inhibit JAK2-V617F-dependent cell growth. *British Journal of Haematology*. 2013;160:177-187.
22. Ashraful H. Statin Induces Apoptosis and Cell Growth Arrest in Prostate Cancer Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:88-94

## Capítulo VI

### TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICA DE ALTURA

Ricardo Amaru, Teddy Quispe, Josue Mamani, Ariel Amaru, María Aguilar, Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las eritrocitosis, particularmente en la Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) y la Eritrocitosis Secundaria (ES), ha recurrido a medidas terapéuticas como la flebotomía<sup>1,2</sup> y el uso de fármacos tales como Medroxiprogesterona<sup>3,4</sup>, Acetazolamida<sup>5,6</sup>, Almitrina<sup>7,8</sup>, teofilina<sup>9,10</sup> y enalapril<sup>11,12</sup>. Sin embargo, estos fármacos no son considerados tratamientos de primera línea debido a la presencia de eventos adversos, disponibilidad de los medicamentos y respuestas no satisfactorias. Esto hace necesario, realizar estudios y proponer fármacos que puedan controlar la etiopatogenia de la eritropoyesis y las complicaciones presentes en las eritrocitosis como los eventos trombóticos y la Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP).

La atorvastatina, por su acción inhibidora de la síntesis de novo del colesterol, es uno de los fármacos más utilizados en el mundo<sup>13,14</sup>; su acción pleiotrópica como inhibidor de la eritropoyesis<sup>14,15</sup>, regulador de los eventos trombóticos<sup>16,17</sup> e Hipertensión Arterial Pulmonar<sup>18,19</sup> la constituye en uno de los medicamentos más importantes para el tratamiento de las eritrocitosis patológicas.

## DESCRIPCIÓN

### Material y métodos

El estudio realizado incluyó 88 sujetos distribuidos en 3 grupos: 15 sujetos como Controles Normales (CN), 22 pacientes con Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) y 51 pacientes con Eritrocitosis Secundaria (ES), todos ellos de sexo masculino y con radicatura en las ciudades de La Paz y El Alto a 3.600 y 4.000 msnm respectivamente. Las muestras de aspirado de médula ósea, sangre venosa periférica fueron obtenidas previo consentimiento informado. Los datos clínicos y familiares fueron extractados de la historia clínica.

El seguimiento de los pacientes fue realizado mensualmente por consultorio externo. El diagnóstico de eventos trombóticos fue confirmado con Eco Doppler y Tomografía Axial Computarizada. Durante el estudio los tratamientos concomitantes prohibidos fueron la eritropoyetina, los estrógenos, los andrógenos y los corticoides.

Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a criterios establecidos<sup>1,20</sup>, seguidos de

estudios de laboratorio (glucemia, ácido úrico, creatinina, bilirrubinas, transaminasas, lactato deshidrogenasa, reticulocitos) y estudios de gabinete (Rx de torax, Ecocardiografía).

Para establecer el tratamiento, se realizó un protocolo de dos fases, la primera constituida por flebotomías y la segunda por tratamiento farmacológico.

La primera fase estableció sangrías de 450 ml semanales, sin reposición, hasta alcanzar una hemoglobina inferior a 18 g/dl. Los CN no aplicaron en esta fase.

La segunda fase se inició apenas alcanzados los niveles de hemoglobina establecidos. Esta fase tuvo una duración superior a un año. Los pacientes con eritrocitosis patológicas (EPA, ES) y Controles Normales (CN) recibieron 20 mg de atorvastatina. Los CN recibieron atorvastatina por diagnóstico de hipercolesterolemia.

La evaluación fue realizada posterior a los 12 meses de tratamiento farmacológico de acuerdo a criterios especificados en la tabla 1.

**Tabla 1.**  
**Criterios para la valoración de respuesta al tratamiento**

| Respuesta     | Hemoglobina  | Síntomas de hiperviscosidad | Requerimiento de flebotomías |
|---------------|--------------|-----------------------------|------------------------------|
| Completa      | < 18 g/dl    | No                          | No                           |
| Parcial       | 18 a 19 g/dl | No                          | Si                           |
| Sin respuesta | > 19 g/dl    | Si                          | Si                           |

## RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Los Controles Normales no presentaron cambios en los niveles de Hb y Ht que fueran estadísticamente significativos (Tabla 2).

Los pacientes con diagnóstico de EPA presentaron una Respuesta Completa de 64%, Respuesta Parcial 27% y Sin Respuesta 9% (Tabla 3). En pacientes con ES los resultados fueron similares (Tabla 4).

**Tabla 2.**  
**Respuesta a tratamiento farmacológico de CN**

| Respuesta | Número de pacientes | Edad años | Hb Pre Tx g/dl | Hto Pre Tx g/dl | Hb post tx g/dl | Hto Post Tx g/dl |
|-----------|---------------------|-----------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| NA        | 27                  | 59.6      | 16.2           | 51.6            | 16.8            | 53.6             |

*El número de pacientes consideró 20 varones y 7 mujeres.*

Tabla 3.

## Respuesta a tratamiento farmacológico de la EPA

| Respuesta        | Número de pacientes | Edad años | Hb Pre Tx g/dl | Hb post tx g/dl | Remisión síntomas | Sangrías sesiones |
|------------------|---------------------|-----------|----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Completa 64%     | 14                  | 59.2      | 19.7           | 16.8            | Si                | 0                 |
| Parcial 27%      | 6                   | 58.3      | 20.5           | 16.9            | Si                | 2.5               |
| Sin respuesta 9% | 2                   | 47.5      | 21.8           | 19.9            | No                | 7                 |
| Total pacientes  | 22                  | 55.6      | 20.0           | 17.0            | Si                | 1.3               |

Tabla 4.

## Respuesta a tratamiento farmacológico de la ES

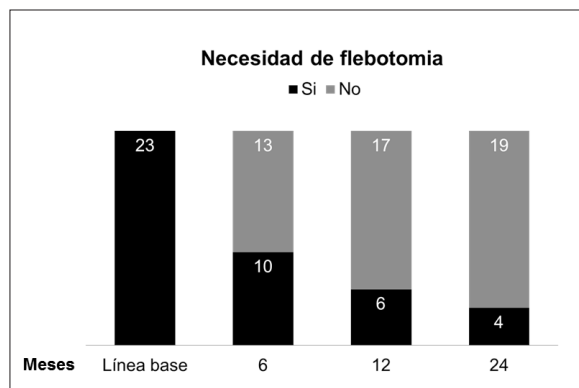
| Respuesta     | Número de pacientes | Edad años | Hb Pre-Tx g/dl | Hb post tx g/dl | Remisión síntomas % |
|---------------|---------------------|-----------|----------------|-----------------|---------------------|
| Completa      | 15                  | 53.8      | 20.7           | 16.6            | 73.3                |
| Parcial       | 6                   | 47        | 19.7           | 18.5            | 83.3                |
| Sin respuesta | 2                   | 49.5      | 24.8           | 20.2            | 0                   |
| TOTAL         | 23                  | 51.6      | 20.8           | 17.4            | 69.6                |

## Requerimiento de Flebotomías

Los pacientes con diagnóstico de EPA y ES, en tratamiento con atorvastatina, requirieron menor número de sangrías conforme transcurrió el tratamiento. De entre 73 pacientes con EPA y ES, 23 pacientes fueron controlados durante 24 meses para evaluar el requerimiento del número de sangrías. Al sexto mes, 10 de los 23 requirieron sangrías; a los 12 meses, solo 6 y finalmente, a los 24 meses el requerimiento de sangrías se redujo a 4 pacientes (Cuadro 1).

Cuadro 1.

## Requerimiento de sangrías durante el tratamiento con atorvastatina

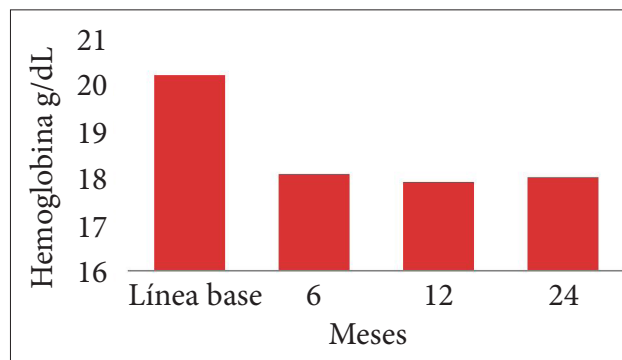


Los pacientes evaluados corresponden a EPA y ES.

Así mismo, este grupo fue controlado para evaluar los niveles de hemoglobina. En los primeros 6 meses, la concentración media de hemoglobina fue inferior a 18 g/dl; estos niveles permanecieron durante los 24 meses de seguimiento (Cuadro 2).

Cuadro 2.

## Concentración de hemoglobina durante el tratamiento con atorvastatina



Los pacientes evaluados corresponden a EPA y ES.

## CONCLUSIÓN

El tratamiento de las eritrocitosis patológicas, referidas a EPA y ES, con atorvastatina evidenció un resultado favorable, expresado en la significativa reducción de los niveles de concentración de hemoglobina/hematocrito y la remisión de la sintomatología de hiperviscosidad sanguínea.

Aproximadamente, el 60% de los pacientes tratados con atorvastatina alcanzó una Respuesta Completa seguida de una buena calidad de vida y un performance status de 0. Asimismo, un 30% de los pacientes lograron una Respuesta Parcial, y a pesar de tener hemoglobinas por encima de los valores normales, la calidad de vida mejoró notablemente suficiente para continuar sus actividades cotidianas. El 10% restante no presentó ninguna evolución favorable ni en la clínica ni en los resultados de laboratorio.

Existen suficientes datos de que los efectos pleiotrópicos de la atorvastatina benefician a pacientes con eritrocitosis patológicas asociadas a Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP), evento clínico desfavorable para los pacientes<sup>21,22</sup>. Además, disminuye los daños pulmonares producidos por HAP por medio de la inhibición de mecanismos antiinflamatorios e infiltrado pulmonar de macrófagos<sup>23,24,25</sup>.

Finalmente, las estatinas presentan acciones pleiotrópicas en la prevención de trombosis venosa profunda y el síndrome post-trombótico, sobre todo en pacientes sin terapia de anticoagulación o sin terapia de antiagregantes plaquetarios<sup>26,27,28</sup>.

## REFERENCIAS

1. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013; 19(2):5-18.
2. Gonzales GF. Contribución Peruana a la hematología en poblaciones nativas de altura. *Acta Andina* 1998; 7: 105
3. Kryger M. Impaired oxygenation during sleep in excessive polycythemia of high altitude. *Sleep*. 1978;1:3-17.
4. Kryger M, McCullough RE, Collins D, Scoggin CH, Weil JV, Grover RF. Treatment of excessive polycythemia of high altitude with respiratory stimulant drugs. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117(3):455-64.
5. Richalet JP, Rivera-Ch M, Maignan M, Privat C, Pham I, Macarlupu JL, Petitjean O, León-Velarde F. Acetazolamide for Monge's disease: efficiency and tolerance of 6-month treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 15;177(12):1370-6.
6. Richalet JP, Rivera M, Bouchet P, Chirinos E, Onnen I, Petitjean O, Bienvenu A, Lasne F, Moutereau S, León-Velarde F. Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Dec 1;172(11):1427-33. Epub 2005 Aug 26.
7. Guénard H, Villena M, Vargas E. Pathologic altitude polycythemia: therapeutic trial with almitrine dimesylate. *Rev Med Interne*. 1985;6:11-3.
8. Villena M, Vargas E, Guénard H, Nallar N, Tellez W, Spielvogel H. Double-blind study on the action of almitrine in patients with polycythemia of high altitude. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1985;21(2):165-70.
9. Oren R, Berri M, Hubert A, Matzner Y. Effect of Theophylline on erythrocytosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of Internal Medicine* 1997;157:1474-1478
10. Romero R, Lens M. Tratamiento de la poliglobulia post trasplante con teofilina. *Nefrologia* 1992;12:174
11. Plata R, Cornejo A, Arratia C, Anabaya A, Perna A, Dimitrov BD, Remuzzi G, Ruggenti P. Angiotensin-converting-enzyme inhibition therapy in altitude polycythaemia: a prospective randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9307):663.
12. Akash N, Smadi I, El-Lozi M. Treatment of Post-transplant Erythrocytosis with Enalapril. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 1998 Apr-Jun;9(2):144-6.
13. Zonierczyk JD, Borowiak A, Hikiş P, Cebula-Obrzut B, Błoński JZ, Smolewski P, Robak T, Kiliańska ZM. Promising anti-leukemic activity of atorvastatin. *Oncol Rep*. 2013;29(5):2065-71
14. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015;19(5):554-62.
15. Amaru R, Vera O, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Mecanismo molecular de las estatinas en el Tratamiento de la Eritrocitosis Patológica de Altura. *Rev Med La Paz*. 2013;19(2):19-27.
16. April L, Rodriguez, Brandon M, Wojcik, Shirley K, Wroblewski, Daniel D, Myers, Jr., Thomas W, Wakefield, and Jose A. Diaz. Statins, inflammation and deep vein thrombosis: a systematic review. *J Thromb Thrombolysis*. 2012; 33(4):371-382.
17. Lianqiu Min, Shuai Shao, Xiaoning Wu, Lin Cong, Ping Liu, Haiping Zhao, Yumin Luo. Anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of atorvastatin in acute ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2013;8(23): 2144-2154.
18. Jiang X, Yuan L, Li P, Wang J, Wang P, Zhang L, Sun B, Sun W. Effect of Simvastatin on 5-HT and 5-HTT in a Rat Model of Pulmonary Artery Hypertension. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(5):1712-24.
19. Reshma S Baliga, Raymond J MacAllister, Adrian J Hobbs. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*. 2011;163(1):125-140.
20. Finazzi G, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT. Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):471-82.
21. Chen D. Atorvastatin prevents dehydromonocrotaline-induced pulmonary hypertension in beagles. *Exp Lung Res*. 2012;38(7):333-43.

22. Jasińska-Stroschein M. Rosuvastatin, sildenafil and their combination in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat. *Acta Pharm.* 2014;64(3):345-53.
23. Matsuo S. Single-dose rosuvastatin meliorates lung ischemia-reperfusion injury via upregulation of endothelial nitric oxide synthase and inhibition of macrophage infiltration in rats with pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149:902-9.
24. Girgis RE. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(3).
25. Jasińska-Stroschein M. HMG-COA reductase inhibitors: An opportunity for the improvement of imatinib safety. An experimental study in rat pulmonary hypertension. *Pharmacol Rep.* 2015;67(1):32-7.
26. Kessinger CW, Kim JW. Statins improve the resolution of established murine venous thrombosis: reductions in thrombus burden and vein wall remodeling. *PLoS One.* 2015;10:e0116621. doi: 10.1371/journal.
27. Lassila R. The association of statin use with reduced incidence of venous thromboembolism: a population-based cohort study. *BMJ Open.* 2014;4(11).
28. Satoh M, Takahashi Y. Cellular and molecular mechanisms of statins: an update on pleiotropic effects. *Clin Sci.* 2015;129:93-105.

## Capítulo VII

### LÍNEAS GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS EN LA ALTURA

Ricardo Amaru, Oscar Vera.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

La eritrocitosis, comúnmente llamada poliglobulia, es un síndrome caracterizado por un incremento anormal de la masa eritrocitaria, la hemoglobina y el hematocrito; es de etiología multifactorial y desencadena el deterioro de la salud, la vida social, familiar y laboral del paciente.

Las principales eritrocitosis patológicas de importancia clínica son la Eritrocitosis Patológica de altura (EPA), Eritrocitosis Secundaria (ES) y Policitemia Vera (PV), estas 3 patologías engloban más del 98% de todas las eritrocitosis patológicas. En consulta médica, la EPA constituye el 7% de las eritrocitosis patológicas, la ES el 90% y PV el 1% aproximadamente<sup>1</sup>.

En la región andina, comprendida por Bolivia, Perú, Ecuador y Chile, millones de habitantes residen a más de 2.500 msnm<sup>2</sup>. En Bolivia, alrededor de 2.000.000 de habitantes residen en las ciudades de La Paz y El alto, y se considera que existen más de 150.000 pacientes con eritrocitosis patológicas.

El presente documento, destinado a los cuatro niveles de atención médica, tiene la finalidad de establecer criterios comunes para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las eritrocitosis patológicas en la altura.

## CLASIFICACIÓN DE LAS ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS

Las eritrocitosis patológicas de importancia clínica se clasifican en:

- I. Eritrocitosis primaria, caracterizada por presentar la eritropoyetina sérica disminuida o normal; ésta eritrocitosis a su vez se subclasifica en adquiridas o congénitas. (Cuadro 1).
- II. Eritrocitosis secundaria, caracterizada por el aumento de eritropoyetina sérica, también se subclasifica en adquiridas y congénitas. (Cuadro 1).

Esta línea guía centra su atención en las 3 eritrocitosis patológicas de importancia clínica, presentes en poblaciones residentes de grandes alturas.

## Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA)

La EPA es la manifestación hematológica del mal crónico de montaña (Chronic Mountain Sickness, CMS), presente en sujetos que viven en alturas superiores a 2.500 msnm.

## Eritrocitosis Secundaria (ES)

La ES se presenta como una consecuencia de patologías asociadas al aumento de la eritropoyetina sérica como las patologías cardiopulmonares, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), obesidad, síndrome metabólico, Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS), cardiopatías y neoplasias secretoras de eritropoyetina.

## Policitemia Vera (PV)

La PV es una enfermedad oncohematológica clonal asociada a leucocitosis, trombocitosis, crecimiento autónomo de colonias eritroides (BFU-E), eritropoyetina sérica baja y mutación somática de gen JAK2 V617F.

## ETIOPATOGENIA

Cada una de las diferentes eritrocitosis patológicas (EPA, ES, PV) tienen una etiopatogenia específica.

## Eritrocitosis Patológica de Altura

La EPA es el resultado de una adaptación genética inadecuada a grandes alturas, superiores a 2.500 msnm; donde los progenitores hematopoyéticos de la médula ósea presentan una hipersensibilidad a la eritropoyetina, seguida de una eritropoyesis incrementada y una disminución de la apoptosis en la línea eritroide<sup>1,5</sup>.

## Eritrocitosis Secundaria

La ES basa su etiopatogenia en el incremento de la eritropoyetina sérica, está asociada a patologías cardiopulmonares, enfermedades neoplásicas y obesidad<sup>1,6</sup>.

## Policitemia Vera

Esta enfermedad neoplásica se caracteriza por una mutación del gen JAK-2<sup>V617F</sup>, esta mutación permite la fosforilación continua (hiperactivación) de JAK2 y STAT5, factores de transcripción involucrados en la eritropoyesis; dando como resultado una eritropoyesis incrementada<sup>7,8</sup>.

**Cuadro 1.**  
**Clasificación de las eritrocitosis patológicas**

- 1. Eritrocitosis Primaria (eritropoyetina sérica normal o disminuida)**
  - a. Adquiridas**
    - Policitemia Vera
    - Eritrocitosis Patológica de Altura
  - b. Congénitas**
    - Eritrocitosis por mutaciones del Epo-R
    - Eritrocitosis de Chuvash
    - Hemoglobinopatía de alta afinidad con oxígeno
    - Deficiencia de 2,3 BPG mutasa
- 2. Eritrocitosis Secundaria (Eritropoyetina sérica elevada)**
  - a. Adquiridas**
    - Secundaria a EPOC
    - Secundaria a Obesidad / Síndrome metabólico
    - Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS)
    - Eritrocitosis por cardiopatía adquirida
    - Tabaquismo
    - Neoplasias (secretoras de eritropoyetina)
  - b. Congénitas**
    - Cardiopatías congénitas
    - Estenosis de arteria renal

*Esta clasificación se argumenta en los trabajos de Tiziano Barbui, Joseph Prchal y Ricardo Amaru<sup>1,3,4</sup>.*

## INCIDENCIA

Los diferentes estudios epidemiológicos realizados en la región andina han reportado datos de eritrocitosis patológicas (EPA, ES y otras) en forma conjunta; por ello, no se tiene datos sobre la incidencia real de cada una de ellas. La incidencia de las eritrocitosis patológicas en la región andina varía de acuerdo a la población, ocupación y lugar de residencia. Por ejemplo en las ciudades de La Paz y El Alto (3.600 y 4.000 msnm) se considera una incidencia del 10% de la población<sup>1,9</sup>.

Los datos históricos de la incidencia de la Policitemia Vera se encuentran alrededor de 1 por cada 100.000 habitantes por año<sup>10,11</sup>.

## FACTORES PREDISPONENTES

Las eritrocitosis patológicas presentan diferentes factores predisponentes para su desarrollo.

## Eritrocitosis Patológica de Altura

- Radicatoria en alturas mayores a 2.500 msnm
- Ausencia de adaptación genética
- Sujetos nacidos a nivel del mar
- Historia familiar de residencia a nivel del mar

## Eritrocitosis Secundaria

- Secuelas de patologías pulmonares
- Patologías pulmonares crónicas
- Obesidad / Síndrome metabólico.
- Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS).
- Cardiopatía
- Tabaquismo

## Policitemia Vera

- Edad, adulto mayor

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Las eritrocitosis patológicas (EPA, ES, PV) presentan manifestaciones clínicas comunes.

**Síntomas de hiperviscosidad sanguínea**

- cefaleas,
- parestesias,
- tinnitus,
- hipersomnias,
- disneas,
- visión borrosa,
- mialgias y
- alteraciones del estado de conciencia

**Signos de aumento de masa eritrocitaria**

- hiperemia
- facies pletórica

**Signos de disminución de la saturación de oxígeno**

- cianosis periférica

**Signos de hipervolemia**

- ingurgitación venosa
- edema

Sin embargo, cada una de las eritrocitosis patológicas presentan sintomatología adicional propia que las distingue una de otra. Así por ejemplo, la ES generalmente presenta una patología cardiopulmonar<sup>7,8</sup>; mientras que, la PV presenta sintomatología propia de enfermedades neoplásicas, como evento trombótico frecuente, esplenomegalia y pérdida de peso<sup>9,10,11</sup>.

Así mismo, las eritrocitosis patológicas suelen presentar complicaciones que agravan el cuadro clínico y que por ende requieren una atención médica de urgencia; entre las complicaciones más frecuentes se tiene eventos trombóticos, Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP), hemorragias e insuficiencias cardíacas<sup>1,12,13</sup>.

**MANIFESTACIONES LABORATORIALES**

Las eritrocitosis patológicas presentan alteraciones de química sanguínea relacionadas con un aumento en la eritropoyesis, la hemólisis y la apoptosis de precursores eritroides.

**a) Aumento de eritropoyesis**

- Hemoglobina elevada
- Hematocrito elevado

El punto de corte de los valores de hemoglobina para el diagnóstico de eritrocitosis en una población depende de muchas variables, entre ellas, edad, género, raza y lugar de residencia. Así por ejemplo, en Bolivia, en las ciudades de La Paz y El Alto, los valores normales son de 14 a 17 g/dl para las mujeres y de 15 a 18 g/dl para los varones. Se considera eritrocitosis, cuando el paciente presenta una hemoglobina superior a 18 g/dl en mujeres y superior a 19 g/dl en varones<sup>1,14,15</sup>.

**b) Aumento de hemólisis**

- Lactato deshidrogenasa ligeramente incrementada
- Bilirrubina indirecta ligeramente incrementada<sup>16,17</sup>

**c) Incremento de apoptosis en progenitores eritroides**

- Ácido úrico elevado<sup>18,19,20</sup>

**DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LA ERITROCITOSIS PATOLÓGICAS**

Probablemente, la EPA, ES, y PV comprendan el 98% de todas las eritrocitosis patológicas en habitantes de grandes alturas. Sin embargo, en la práctica clínica es necesario realizar un diagnóstico diferencial entre estas 3 principales eritrocitosis patológicas<sup>1,21,22</sup>. (Tabla 1)

**Tabla 1.**

**Diagnóstico diferencial de las eritrocitosis patológicas en habitantes a grandes alturas**

|                            | CN     | EPA    | ES      | PV   |
|----------------------------|--------|--------|---------|------|
| EPOC, Obesidad, tabaquismo | No     | No     | Si      | No   |
| Esplenomegalia             | No     | No     | No      | Si   |
| Leucocitosis               | No     | No     | No      | Si   |
| Eritropoyetina sérica      | Normal | Normal | Elevada | Baja |
| Mutación JAK2              | No     | No     | No      | Si   |

**CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO**

Cada una de las eritrocitosis patológicas presenta criterios de diagnóstico específicos y diferenciales<sup>1,21</sup>

**a) Eritrocitosis Patológica de Altura**

- Eritropoyetina sérica normal
- Ausencia de Enfermedad pulmonar crónica
- Ausencia de Obesidad/Síndrome metabólico
- Ausencia de Cardiopatía
- Presencia de colonias BFU-E autónomas

**b) Eritrocitosis Secundaria**

- Eritropoyetina sérica aumentada > 40 UI/ml
- Enfermedad pulmonar crónica
- Obesidad/Síndrome metabólico
- Cardiopatía
- Tabaquismo
- Ausencia de colonias autónomas BFU-E

**c) Policitemia Vera**

- La PV tiene criterios establecidos internacionalmente.

**Criterio Mayor**

A1: Masa eritrocitaria aumentada (>25% por encima de la media normal)

Hemoglobina > 18 g/dl o Hematocrito > 60% en mujeres

Hemoglobina > 19 g/dl o Hematocrito > 63% en varones

A2: Ausencia de criterios para eritrocitosis secundaria

A3: Esplenomegalia palpable

A4: Marcador de clonalidad (mutación JAK2)

**Criterio Menor**

B1: Trombocitosis (>400/ul)

B2: Leucocitosis con neutrofilia (Neutrófilos >10.000/ul en no fumadores y 12.000/ul en fumadores)

B3: Esplenomegalia, documentada por ecografía.

B4: Presencia de colonias BFU-E autónomas

El diagnóstico definitivo de la PV resulta de la sumatoria de los criterios descritos.

A1 + A2 + A3 or A4 = PV

A1 + A2 + 2B = PV

**HISTORIA CLÍNICA**

La anamnesis debe considerar antecedentes familiares, laborales y patológicos, además del lugar de residencia.

**Antecedentes familiares**

- Historia familiar de eritrocitosis

**Antecedentes laborales**

- Trabajadores de interior mina
- Trabajadores con riesgo de desarrollar silicosis

**Antecedentes patológicos**

- Asma bronquial
- Tuberculosis pulmonar
- Enfisema
- Cardiopatía

**Lugar de residencia**

- Altura de residencia

**ESTUDIOS LABORATORIALES****a) Fase 1 (imprescindible)**

- Hemograma
- Eritropoyetina sérica
- Ácido úrico
- Deshidrogenasa láctica
- Colesterol
- Triglicéridos
- Ferritina sérica
- Saturación de oxígeno
- Rx PA de tórax

En caso de no tener aún un diagnóstico definido, pero alta sospecha de Eritrocitosis Secundaria, pasar a fase 2.

**b) Fase 2. (Sospecha de Eritrocitosis Secundaria)**

- Ecocardiografía
  - ✓ Hipertensión arterial pulmonar
- Pruebas funcionales respiratorias
  - ✓ Patología pulmonar
- TAC toraco-abdominal.
  - ✓ Sospecha de secreción anormal de eritropoyetina por neoplasia
- Gasometría arterial
  - ✓ Acidosis respiratoria

En caso de no tener un diagnóstico definitivo aún, pero sospecha de Policitemia Vera, pasar a fase 3.

**c) Fase 3. (Sospecha de Policitemia Vera)**

- Aspirado de médula ósea
- Estudio biomolecular de la mutación del gen JAK-2 V617F

En casos excepcionales, de no tener diagnóstico definitivo, pasar a fase 4.

**d) Fase 4. (Estudios específicos)**

- Cultivo de colonias BFU-E
- Polisomnografía (estudio del sueño)
- Electroforesis de hemoglobina
- Mutación del gen EpoR (Receptor de Eritropoyetina)
- Mutación del gen VHL (Von Hippel Lindau)

**TRATAMIENTO DE LA EPA**

El tratamiento de las Eritrocitosis Patológica de Altura (EPA) se realiza en dos fases; la primera, el procedimiento de flebotomías, el cual tiene el objetivo de disminuir la sintomatología del paciente; la segunda, el tratamiento farmacológico, con la finalidad de mantener el cuadro clínico estable y evitar recaídas.

**Flebotomía**

La flebotomía se realiza con frecuencia semanal, hasta alcanzar valores normales de Hb/Ht (Varones < 18 g/dl, mujeres <17g/dl). La flebotomía se realiza con una bolsa de transfusión sanguínea, al nivel de la vena del pliegue del codo.

- Flebotomía de 450 ml, sin reposición
  - ✓ Edad menor a 60 años
  - ✓ Hemodinámicamente estable
  - ✓ Hipertensión Arterial Sistémica
- Flebotomía de 250 ml, sin reposición
  - ✓ Edad de 60 a 75 años
  - ✓ Hemodinámicamente estable
  - ✓ Hipertensión Arterial Sistémica
- Flebotomía de 100 ml, sin reposición
  - ✓ Edad mayor a 75 años
  - ✓ Hemodinámicamente inestable
  - ✓ Hipotensión Arterial Sistémica

**Tratamiento farmacológico**

Iniciar el tratamiento inmediatamente después de la última flebotomía. El tratamiento dura un

año como mínimo y luego se procede a valorar su continuidad.

- Atorvastatina 20 mg VO día, a horas 21; en pacientes mayores de 60 años, 10 mg VO día.

**TRATAMIENTO DE LA ERITROCITOSIS SECUNDARIA****Flebotomía**

La flebotomía se realiza con frecuencia semanal, hasta alcanzar valores normales de Hb/Ht (Varones < 18 g/dl, mujeres <17g/dl). La flebotomía se realiza con bolsa de transfusión sanguínea al nivel de la vena del pliegue del codo.

- Flebotomía de 450 ml, sin reposición
  - ✓ Edad menor a 60 años
  - ✓ Hemodinámicamente estable
  - ✓ Hipertensión Arterial Sistémica
- Flebotomía de 250 ml, sin reposición
  - ✓ Edad 60 a 75 años
  - ✓ Hemodinámicamente estable
  - ✓ Hipertensión Arterial Sistémica
- Flebotomía de 100 ml, sin reposición
  - ✓ Edad mayor a 75 años
  - ✓ Hemodinámicamente inestable
  - ✓ Hipotensión Arterial Sistémica
- En caso de hematocrito superior o mayor a 75%, se recomienda administrar 3 L/min de oxígeno húmedo durante la flebotomía.

**Tratamiento farmacológico**

Iniciar el tratamiento inmediatamente después de la última flebotomía. El tratamiento dura un año como mínimo y luego se procede a valorar su continuidad.

- Atorvastatina 20 mg VO día, a horas 21; en pacientes mayores de 60 años, 10 mg VO día.
- ASA 100 mg VO día, horas almuerzo.
- Warfarina en pacientes con historia de evento trombótico. En caso de tomar Warfarina no debe recibir ASA.

## TRATAMIENTO DE LA POLICITEMIA VERA

La PV al ser una enfermedad neoplásica adecuadamente caracterizada, presenta líneas guía establecidas internacionalmente.

## TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES EN LAS ERITROCITOSIS

Las eritrocitosis patológicas suelen presentar complicaciones que agravan el cuadro clínico, lo cual requiere una atención médica de urgencia. Los eventos trombóticos, Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP), Hemorragias e insuficiencias cardíacas son las complicaciones más frecuentemente observadas.

### Evento trombótico

- Proceder de acuerdo a protocolo establecido.

### Hipertensión Arterial Sistémica (HAS)

- Proceder con sangrías, considerando que la HAS en ES es secundaria a hipervolemia, ya que en estos casos la PA disminuye posterior a las sangrías. Más de 50% de pacientes con ES presentan HAS secundaria a hipervolemia.
- Coordinar con cardiología el posible uso de anti-hipertensivos.

### Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)

- Proceder con sangrías. La HAP disminuye con las sangrías, por lo que es preciso valorar la HAP posterior a las mismas.
- Coordinar con cardiología para iniciar el tratamiento farmacológico de la HAP.

### Hemorragias

- Proceder de acuerdo a protocolo institucional. Generalmente las hemorragias remiten con el descenso de la HAS.

## Insuficiencias cardíacas

- Sangrías de 100 ml, cada día, durante 5 días. Posteriormente, efectuar una valoración para continuar sangrías hasta alcanzar niveles normales de Hemoglobina/Hematocrito.
- Coordinar manejo con cardiología para tratamiento farmacológico.

## RECOMENDACIONES

Las eritrocitosis patológicas, por su complejidad y presentación clínica variada, requieren el concurso de los cuatro niveles de atención médica.

### Niveles de Resolución

#### Primer nivel

- Promoción de vida saludable.
- Prevención de la Obesidad
- Estimulación de una actividad física permanente
- Tratamiento de patologías crónicas de vías respiratorias
- Seguimiento del tratamiento de las eritrocitosis patológicas

#### Segundo Nivel

- Flebotomías
- Tratamiento farmacológico: inicio y seguimiento

#### Tercer Nivel

- Tratamiento de las complicaciones en las eritrocitosis patológicas

#### Cuarto Nivel

- Estudios de eritrocitosis patológicas con etiología no definida
- Diseño y análisis de estudios clínicos para el tratamiento de eritrocitosis patológicas

## CRITERIOS DE REFERENCIA

Eritrocitosis asociada a leucocitosis

Eritrocitosis asociada a complicaciones

## REFERENCIAS

1. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013; 19(2):5-18.
2. Christina A. Eichstaedt et al. The Andean Adaptive Toolkit to Counteract High Altitude Maladaptation: Genome-Wide and Phenotypic Analysis of the Collas. *PLoS One*. 2014; 9(3): e93314.
3. Prchal JT. Classification and molecular biology of polycythemia (erythrocytoses) and thrombocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(5):1151-8.
4. Finazzi G1, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT. Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):471-82.
5. Alteración en el patrón de apoptosis de células precursoras de eritrocitos en mujeres postmenopáusicas con eritrocitosis patológica de altura. *Cuadernos del Hospital de Clínicas* 2000; 46:31-40.
6. Prchal JT1, Sokol L. "Benign erythrocytosis" and other familial and congenital polycythemia. *Eur J Haematol*. 1996;57(4):263-8.
7. McKeage K. Ruxolitinib: A Review in Polycythaemia Vera. *Drugs*. 2015;75(15):1773-81.
8. Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;8428(15):30074-3.
9. Pasha MA, Newman JH. High-altitude disorders: pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010;137(6 Suppl):13-19.
10. Tefferi A. Myeloproliferative Neoplasms: A Decade of Discoveries and Treatment Advances *Am J Hematol*. 2015;22:10
11. De Freitas RM, da Costa Maranduba CM. Myeloproliferative neoplasms and the JAK/STAT signaling pathway: an overview. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(5):348-53.
12. Zulec M, Volf A, Puharić Z. Hyperbaric oxygen therapy in treating post-ischemic pain caused by polycythemia vera complications: a case report. *Undersea Hyperb Med*. 2015;42(6):607-11.
13. Barbui T. White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: a subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood*. 2015;126(4):560-1
14. Ishikawa Y, Maeda M, Pasham M, Aguet F, Tacheva-Grigorova SK, Masuda T, Yi H, Lee SU, Xu J, Teruya-Feldstein J, Ericsson M, Mullally A, Heuser J. *Haematologica*. 2015;100(4):439-51.
15. Lorenzo FR, Huff C, Myllymäki M, Olenchock B, Swierczek S, Tashi T, Gordeuk V, Wuren T, Rili G, McClain DA, Khan TM, Koul PA, Guchhait P, Salama ME, Xing J, Semenza GL, Liberzon E, Wilson A, Simonson TS, Jorde LB, Kaelin WG Jr, Koivunen P, Prchal JT. A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. *Nat Genet*. 2014;46(9):951-6.
16. Chalasani P, Segar JM, Marron M, Stopeck A. Pathophysiology of tumour-induced microangiopathic haemolytic anaemia. *BMJ*. 2016;2016:2015213521.
17. Poupon C, Lefèvre G, Ngo-François S, Alibeu C, Barbé F, Bourbonneux V, Cartier R, Morin C, Szymanowicz A, Vuillaume I. Hemolysis interferences on frequently required stat analysis: a French multicentric study *Ann Biol Clin (Paris)*. 2015;73(6):705-716.
18. TZhu X1, Chen J, Han F, Cheng M, Xu L, Zhang L, Ding X, Le Y. Efficacy and safety of losartan in treatment of hyperuricemia and posttransplantation erythrocytosis: results of a prospective, open, randomized, case-control study. *ransplant Proc*. 2009;41(9):3736-42.
19. Jefferson JA, Escudero E, Hurtado ME, Kelly JP, Swenson ER, Wener MH, Burnier M, Maillard M, Schreiner GF, Schoene RB, Hurtado A, Johnson RJ. Hyperuricemia, hypertension, and proteinuria associated with high-altitude polycythemia. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(6):1135-42.
20. Peñaloza Rosario, Navía María del Pilar, Amaru Ricardo. Relación entre ácido urico sérico y la eritrocitosis de altura. *Cuad Hosp Clín*. 2000;46(1):18-25.
21. Mary F. McMullin, D. Bareford, P. Campbell, A. R. Green, Claire Harrison, Beverley Hunt, D. Osier, M. I. Polkey, J. T. Reilly, E. Rosenthal, Kate Ryan, T. C. Pearson. Bridget Wilkins. Guidelines

for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *British Journal of Haematology*. 2005; 130: 174–195

22. Giovanni Barosi, Ruben Mesa, Guido Finazzi, Claire Harrison, Jean-Jacques Kiladjian, Eva Lengfelder, Mary F. McMullin, Francesco Passamonti, Alessandro M. Vannucchi, Carlos Besses, Heinz Gisslinger, Jan Samuelsson, Srdan Verstovsek, Ronald Hoffman, Animesh Pardanani, Francisco Cervantes, Ayalew Tefferi, Tiziano Barbui. Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus Project. *Blood*. 2013;121: 4778-4781.

## Capítulo VIII

### **ERITROCITOSIS MICROCÍTICA POST FLEBOTOMÍA** **Reporte preliminar de una nueva entidad clínica**

Maria Aguilar, Jeaneth Velarde, Nelly Huarachi, Josue Mamani, Ricardo Amaru.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

Las eritrocitosis patológicas (Eritrocitosis Patológica de Altura, Eritrocitosis Secundaria, Policitemia Vera) tienen como tratamiento de inicio a las flebotomías, cuyo objetivo tiene que ver con la remisión de los síntomas de hiperviscosidad sanguínea (cefalea intensa, parestesias en las extremidades superiores e inferiores, tinnitus, disnea), los cuales llegan a dificultar las actividades cotidianas del paciente. Generalmente, se realizan 3 sesiones de flebotomía de 450 ml en cada paciente, esto con una frecuencia semanal hasta alcanzar valores de hemoglobina inferiores a 18 g/dl.<sup>1,2</sup> Cuando los pacientes llegan al consultorio, normalmente tienen una historia de flebotomías anteriores superiores a 5 sesiones. Estas frecuentes sangrías hacen que el hierro del organismo disminuya a niveles que producen una disminución del VCM de los eritrocitos y de la ferritina sérica. Por cada 2 ml de sangre retirada por flebotomía, se pierde alrededor de 1mg de hierro; por lo tanto, en cada flebotomía de 450 ml se pierde aproximadamente 250 mg de hierro<sup>3,4,5</sup>; subsecuentemente, se pierde alrededor de 750 mg de hierro en 3 sesiones de flebotomía. Por tanto, teniendo en cuenta que el 25 % del hierro del organismo se encuentra en el tejido hematopoyético, que el depósito total del hierro en el organismo es de 3000 a 4000 mg, y que la absorción del hierro por vía intestinal es de 1 mg día, las flebotomías están directamente relacionadas con la deficiencia de hierro<sup>6,7</sup>.

La eritropoyesis en condiciones de deficiencia de hierro produce una eritrocitosis que presenta VCM disminuido (microcitosis) y una membrana eritrocitaria alterada, esto disminuye el transporte de oxígeno y la movilidad de los eritrocitos<sup>8,9</sup>.

La deficiencia de hierro es frecuente en donantes

voluntarios para Bancos de Sangre<sup>10,11,12,13</sup> y en pacientes con Policitemia Vera, estos últimos disminuyen su reserva de hierro debido a las constantes flebotomías<sup>14</sup>. En una etapa inicial de esta deficiencia, el nivel de ferritina sérica es el indicador más fidedigno de la reserva de hierro, pero en un estadio avanzado, se debe considerar también el VCM de los eritrocitos<sup>15,16,17</sup>.

## DESCRIPCIÓN

### Material y métodos

Se estudió muestras de pacientes con eritrocitosis patológicas, 19 varones y 3 mujeres, mismos que presentaron deficiencia de hierro posterior a flebotomías. Las características de los pacientes estudiados se detallan en la tabla 1.

Se obtuvo muestras de sangre venosa periférica depositadas en tubos Vacutainer con EDTA (Becton Dickinson, USA) y procesadas en un contador hematológico automático (Micro 60, USA), para confirmar los resultados se llevaron a cabo estudios con técnicas manuales, utilizando una microcentrífuga (Hawksley, England) para el hematocrito y la técnica colorimétrica (Unico 1200 Spectrophotometer, USA) para la concentración de hemoglobina.

La evaluación para el diagnóstico de deficiencia de hierro fue realizada a los 2 meses de iniciada la flebotomía, posteriormente, la evaluación de la respuesta al tratamiento con hierro fue realizada a los 4 meses de iniciada la flebotomía.

## RESULTADOS

### Flebotomía y deficiencia de hierro

Los pacientes con eritrocitosis patológicas, posterior a flebotomías realizadas hasta alcanzar valores normales de <18 g/dl en varones y <17 g/dl en mujeres, fueron evaluados a los dos meses posteriores a la primera flebotomía. Se observó

**Tabla 1.**  
**Características de los pacientes con eritrocitosis patológicas**

| Sujetos | Número | Edad (años)             | Hb (g/dl)                 | Hto %                         | VCM fl                  | Flebotomía mL                 |
|---------|--------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Varones | 19     | 47.7<br>(23-80) DS 14.5 | 21.7<br>(18.6-26.4) DS2.3 | 69.6<br>(59.5-84.5)<br>DS 6.8 | 89<br>(81-99)<br>DS 6.1 | 2729<br>(500-5850)<br>DS 1364 |
| Mujeres | 3      | 57<br>(48-65) DS 8.5    | 21.6<br>(18.3-23.8) DS2.9 | 150/120                       | 92<br>(86-95)<br>DS 5.2 | 2167<br>(1750-2500)<br>DS382  |

que los pacientes presentaron niveles normales de hemoglobina y hematocrito; sin embargo, el VCM presentó una disminución en relación a valores normales, reflejando así una deficiencia de hierro (Tabla 2, Tabla 3).

**Tabla 2.**  
**Características de pacientes varones**  
**post flebotomía**

|         | Pre flebotomía                | Post flebotomía               | p     |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Hb g/dL | 21.7<br>(18.6-26.4)<br>DS 2.3 | 17.9<br>(15.4-22.7)<br>DS 1.9 | 0.000 |
| Hto %   | 69.6<br>(59.5-84.5)<br>DS 6.8 | 57<br>(45.8-72.6)<br>DS 6.5   | 0.000 |
| VCM fl  | 89<br>(81-99)<br>DS 6.1       | 71<br>(59-81)<br>DS 6.4       | 0.000 |

**Tabla 3.**  
**Características de pacientes mujeres**  
**post flebotomía**

|         | Pre flebotomía                | Post flebotomía               | p     |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Hb g/dL | 21.6<br>(18.3-23.8)<br>DS 2.9 | 16.7<br>(15.7-17.7)<br>DS 1.0 | 0.064 |
| Hto %   | 66.9<br>(60.3-72)<br>DS 6     | 53.4<br>(50.1-56.6)<br>DS 3.2 | 0.033 |
| VCM fl  | 92<br>(86-95)<br>DS 5.2       | 64<br>(60-67)<br>DS 3.7       | 0.024 |

### Tratamiento con hierro por vía oral

Doce pacientes con eritrocitosis microcítica fueron tratados con hierro por vía oral (hierro bisglicina), dosis estándar por dos meses. La hemoglobina y el hematocrito no presentaron cambios significativos; sin embargo, el VCM continuó disminuyendo en relación al diagnóstico, esto reflejó la poca efectividad del aporte de hierro para contrarrestar la deficiencia (Tabla 4).

**Tabla 4.**  
**Características de pacientes con eritrocitosis**  
**microcítica post tratamiento con hierro/vía oral**

|         | Pre flebotomía                | Pre tratamiento               | Post tratamiento              | p     |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Hb g/dL | 21.6<br>(18.3-26.4)<br>DS 2.6 | 17.8<br>(15.7-22.7)<br>DS 2   | 16.9<br>(14.5-19.1)<br>DS 1.5 | 0.328 |
| Hto %   | 69<br>(59.5-84.5)<br>DS 7.6   | 56.5<br>(45.8-72.6)<br>DS 7.1 | 54.3<br>(46.3-61.1)<br>DS 4.8 | 0.600 |
| VCM fl  | 89<br>(82-99)<br>DS 6.0       | 72.5<br>(66-81)<br>DS 5.5     | 66.6<br>(58-77)<br>DS 6.3     | 0.008 |

### Tratamiento con hierro por vía endovenosa

Diez pacientes con eritrocitosis microcítica fueron tratados con 500 mg de hierro por vía endovenosa (sacarato de hierro) 100 mg día por 5 días. La hemoglobina y el hematocrito no presentaron cambios significativos; sin embargo, el VCM mejoró sin llegar a valores normales (Tabla 5). Esto evidenció que la administración por vía endovenosa fue más beneficiosa que la vía oral.

**Tabla 5.**  
**Características de pacientes con eritrocitosis**  
**microcítica post tratamiento con sacarato de**  
**hierro/vía endovenosa**

|         | Pre flebotomía                | Pre tratamiento               | Post tratamiento              | p     |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Hb g/dL | 21.9<br>(20.0-23.3)<br>DS 1.2 | 17.6<br>(15.4-19.9)<br>DS 1.5 | 18.8<br>(16.9-21.8)<br>DS 1.7 | 0.161 |
| Hto %   | 69.7<br>(65.8-73.6)<br>DS 3.1 | 56.5<br>(52.9-60.5)<br>DS 3.2 | 60.5<br>(55.3-69.9)<br>DS 5.4 | 0.097 |
| VCM fl  | 88.8<br>(81-95)<br>DS 6.3     | 64.1<br>(59-73)<br>DS 5.3     | 78.5<br>(66-96)<br>DS 10.7    | 0.002 |

### CONCLUSIÓN

El hierro es un elemento de vital importancia en el mecanismo de la eritropoyesis, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular.

Los pacientes con eritrocitosis patológicas (EPA, ES), sometidos a flebotomías (sangrías) hasta alcanzar valores normales tanto en varones como en mujeres, presentan deficiencia de hierro; así lo refleja el control realizado a los dos meses desde la primera flebotomía. Esta deficiencia, similar a la observada en donadores voluntarios de sangre, depende no del número de flebotomías o donaciones sino de la frecuencia de las mismas; este mismo hecho hace que los pacientes con eritrocitosis patológicas presenten una eritropoyesis acelerada seguida de una disminución de las reservas de hierro (ferritina). Más del 90% de pacientes con eritrocitosis patológicas presentan síntomas de hiperviscosidad sanguínea. Igualmente, esta sintomatología está presente en pacientes con eritrocitosis microcítica, cuyos valores de Hemoglobina y Hematocrito se encuentran por debajo del punto de corte (varones >19 g/dl y mujeres > 18 g/dl). Esto posiblemente se deba a que los eritrocitos microcíticos producen mayor

viscosidad sanguínea y presentan una alteración de la membrana celular eritrocitaria.

Se debe asegurar que los pacientes a quienes se les realiza las flebotomías tengan las adecuadas reservas de hierro, por lo que será preciso administrar hierro sérico posterior a las flebotomías; y de esta manera, reponer el hierro disminuido. Se evidenció que los pacientes que fueron tratados con hierro parenteral (dosis recomendadas para anemia ferropénica) no

presentaron mejoría; sin embargo, los pacientes tratados con hierro endovenoso (sacarato de hierro) presentaron una mejoría expresada en el VCM de los eritrocitos.

En conclusión, este es un reporte preliminar que describe una nueva entidad clínica denominada Eritrocitosis Microcítica Post Flebotomía (EMPF), empero será necesario realizar estudios prospectivos que permitan caracterizar y prevenir este cuadro clínico.

## REFERENCIAS

1. Amaru R, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Vera O, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Eritrocitosis patológica de altura: Caracterización biológica, diagnóstico y tratamiento. *Rev Med La Paz*. 2013; 19(2):5-18.
2. Amaru R, Vera O, Miguez H, Peñaloza R, Torres G, Velarde J, Huarachi N, Mamani R, Cuevas H. Mecanismo molecular de las estatinas en el Tratamiento de la Eritrocitosis Patológica de Altura. *Rev Med La Paz*. 2013;19(2):19-27.
3. Rodolfo Delfini Cançado and Dante Langhi. Blood donation, blood supply, iron deficiency and anemia - it is time to shift attention back to donor health. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012; 34(5):330-331.
4. Cançado RD, Chiattonne CS, Alonso TT, Junior DML, Alves RCS. Iron deficiency in blood donors São Paulo Med J 2001;119 (4) 132-134.134
5. O'Meara A, Infanti L, Stebler C, Ruesch M, Sigle JP, Stern M, et al. The value of routine ferritin measurement in blood donors *Transfusion* 2011;51 (10) 2183-2188.2188
6. Aygun B, Mortier NA, Kesler K, Lockhart A, Schultz WH, Cohen AR, Alvarez O, Rogers ZR, Kwiatkowski JL, Miller ST, Sylvestre P, Iyer R, Lane PA, Ware RE; Stroke With Transfusions. Therapeutic phlebotomy is safe in children with sickle cell anaemia and can be effective treatment for transfusional iron overload. *Br J Haematol*. 2015 Apr;169(2):262-6
7. Tarek Bou Assi, Elizabeth Baz. Current applications of therapeutic phlebotomy. *Blood Transfus* 2014; 12 Suppl 1: s75-83
8. Archer NM, Brugnara C. Diagnosis of iron-deficient states. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2015;52(5):256-72.
9. Vanesa Herlax, Romina Vazquez, Sabina Mate, Laura Bakás. Eriptosis, la muerte suicida de eritrocitos: mecanismo y enfermedades asociadas. *Acta bioquímica Latinoamericana*. 2011; 45:
10. Luz Stella Coy Velandia, Martha Castillo Bohórquez, Ana Isabel Mora, Ángela Munévar, Yiyola Yami-le Peña R. Características hematológicas de donantes de sangre de Bogotá Colombia (2.600 msnm). *Rev Fac Med*. 2007;15(1):
11. Romero, M.S.; Puente, F.; Abós, M.D.; Guitiérrez, M. Incidencia de ferropenia en un colectivo de 922 candidatos altruistas a donantes de sangre. *Sangre*, 1989; 34: 126-9
12. Rodolfo Delfini Cançado, Carlos Sérgio Chiattonne, Fausto Forin Alonso, Dante Mário Langhi Júnior, Rita de Cássia Silva Alves. Iron deficiency in blood donors. *Sao Paulo Med*. 2001;119(4).
13. MSc. Carmen Yulieth Mantilla-Gutiérrez, MSc. Jaiberth Antonio Cardona-Arias. Meta-análisis: prevalencia de deficiencia de hierro en donantes de sangre repetitivos y asociación con sexo, 2001-2011. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2013;29(1).
14. Srdan Verstovsek MD PhD. Información sobre la Policitemia Vera. *Leukemia Lymphoma society* , Revisado 2012.
15. Camaschella C. Iron deficiency: new insights into diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015(1):8-13
16. Carlo Brugnara. Iron Deficiency and Erythropoiesis: New Diagnostic Approaches. *Clinical Chemistry*. 2003;49:10 1573-1578.
17. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-7.

## Capítulo IX

### AFINIDAD DE LA HEMOGLOBINA POR EL OXÍGENO EN LA ADAPTACIÓN A GRANDES ALTURAS

Ricardo Amaru, Josue Mamani, Maria Aguilar.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.

Redacción, corrección y estilo:  
*Tania Daniela Patón Mamani*  
Diseño y Diagramación:  
*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## INTRODUCCIÓN

Vivir en zonas con una altitud elevada ejerce una presión evolutiva selectiva, esto debido principalmente al entorno hipobárico que da lugar a múltiples respuestas adaptativas<sup>1</sup>. Así por ejemplo, estudios realizados en los Sherpas del Himalaya han reportado una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno<sup>2</sup>. Del mismo modo, los tibetanos, que han vivido en la meseta Qinghai-Tíbet durante miles de años a una altura de 3000-5000 m, han desarrollado fenotipos únicos tales como una reducción del bajo peso neonatal, una baja prevalencia de la hipertensión pulmonar y la protección a la policitemia, vinculada con la mutación PDH2 y resultando en la baja regulación de la vía HIF<sup>3,4,5,6,7,8</sup>.

## DESCRIPCIÓN

### Hipoxia en grandes alturas

La hipoxia en grandes alturas plantea un gran desafío para mantener una oxigenación tisular adecuada, además múltiples respuestas fisiológicas se producen para adaptarse a ese entorno. Las mutaciones aleatorias que alteran estas respuestas pasan por una selección natural cuando son beneficiosas, entonces la frecuencia de presentación de estas mutaciones continua en las generaciones posteriores. Así, los amerindios de Los Andes muestran un aumento del efecto Bohr en comparación con los no Amerindios a la misma altitud<sup>9</sup>. Estos cambios o respuestas de adaptación a la hipoxia garantizan el suministro de oxígeno adecuado a nivel celular, sin embargo la base genética de estas adaptaciones aún requiere ser dilucidado. Beall y otros en 1994, a través de un análisis estadístico complejo, sugirieron una base genética para el transporte de oxígeno mejorado en los tibetanos, esto como parte de su adaptación a grandes alturas<sup>10</sup>. Recientes estudios genómicos han informado que los haplotipos  $\beta$ -globina de la hemoglobina adulta (subunidad  $\beta$  codificada por el gen HBB) y la subunidad  $\gamma 2$  de la hemoglobina fetal (HbF, subunidad  $\gamma 2$  codificada por el gen HBG2) han sido objeto de una selección genética en los Tibetanos [11], lo que sugiere que la hemoglobina variante  $\gamma$ /o de transición modificada de HbF a hemoglobina adulta puede ser un factor beneficioso en la adaptación a grandes altitudes<sup>1</sup>.

### Afinidad de la hemoglobina por el oxígeno

El rol de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en el transporte de oxígeno en grandes alturas es complejo y no se basa únicamente en la saturación arterial de oxígeno. La saturación arterial de oxígeno es en gran medida un reflejo de la función alveolar y no indica un incremento de la afinidad por el oxígeno, el cual se mide correctamente mediante la derivación de su valor P50, la presión parcial de oxígeno en la que la hemoglobina se satura 50% con oxígeno. Además de una alta afinidad de las hemoglobinas mutantes, varias variables fisiológicas, incluyendo 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG), temperatura y pH, pueden aumentar la afinidad de la hemoglobina con oxígeno y por lo tanto disminuir el valor P50<sup>1</sup>. Asimismo, una mayor proporción de HbF, que ha reducido la interacción con 2,3 DPG, también podría aumentar la afinidad de la hemoglobina-oxígeno.

Considerando lo reportado por Morpurgo en 1976, se estimaba que la presencia de una alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno podía ser un elemento constitutivo de la adaptación de habitantes tibetanos en grandes alturas<sup>2</sup>. Entonces, con la finalidad de comprobar si los tibetanos desarrollaron una alta afinidad de hemoglobina-oxígeno como parte de su adaptación genética, se llevó a cabo un estudio que midió directa e indirectamente el P50 de sujetos tibetanos que vivían a diferentes altitudes. Este estudio también incluyó sujetos Aymaras y caucásicos, habitantes de la región andina (La Paz, Bolivia) con una altitud de 3.600 a 4.000 msnm.

### Medición del P50

Se llevó a cabo un estudio de cohorte en 15 tibetanos étnicos que vivían en 3 diferentes altitudes, la meseta tibetana en China, India y los EE.UU., con alturas que oscilan desde los 1300 m, 1730-2300 m y 4320 metros respectivamente. El rango de edad de los sujetos estudiados fue de 30 a 75 años. Cuatro voluntarios no tibetanos constituyeron el grupo de control y adicionalmente, otros 29 tibetanos, 25 Aymaras y 5 caucásicos residentes en grandes alturas (en Bolivia) participaron en la evaluación de la hemoglobina fetal (HbF) (Tabla 1).

**Tabla 1.**  
**Características demográficas**

|                         | Salt Lake City, UT, Estados Unidos | Srinagar, Jammu & Kashmir, India | Huashixia, provincia de Qinghai, China |
|-------------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| Altura                  | 1320m                              | 1730m                            | 4320m                                  |
| Sujetos                 | 5                                  | 5                                | 9                                      |
| Tibetanos/ no tibetanos | 5/0                                | 5/0                              | 5*/4                                   |
| Hombre/mujer            | 2/3                                | 2/3                              | 8/1                                    |
| Rango de edad           | 40-77                              | 37-70                            | 23-66                                  |

*a: inclusión adicional de 29 tibetanos, 25 Aymaras y 5 caucásicos procedentes de La Paz, Bolivia (4000m.s.n.m.) que participaron en la evaluación de la HbF.*

*Fuente: Blood Cells, Molecules & Diseases 2014;*

*53(1-2):27-29.*

Previo consentimiento informado, se obtuvo muestras de 5ml de sangre venosa periférica, recolectadas de la vena antecubital, en tubos ACD. La evaluación de la sangre de tibetanos habitantes en Salt Lake City, EE.UU. se realizó utilizando Hemox Analyzer (TCS Scientific Corporation, New Hope, PA). La gasometría venosa se realizó a través de Nova pHox (Nova Biomedical, Waltham, MA) en residentes de Huashixia en Qinghai, China y el GEM Premier 3000 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) en residentes de Srinagar, India; finalmente, la evaluación de variantes de hemoglobina y HbF se realizó por medio de HPLC (cromatografía líquida de alta presión).

El rango normal de P50 fue 22-28 mmHg utilizando Hemox Analyzer y 22,6 - 29,4 mmHg utilizando una fórmula descrita por Lichtman<sup>12</sup>.

## Resultados

El estudio realizado evidenció que todos los sujetos residentes de diferentes alturas estaban dentro del rango normal de P50, independientemente de su oxigenación arterial medida por un oxímetro de pulso de dedo.

Asimismo, a través de HPLC, no se detectó variantes de hemoglobina en ninguno de los sujetos y la HbF fue menos del 1% en los 19 tibetanos; la HPLC realizada en los sujetos adicionales, 29 tibetanos (Huashixia 4.320 m), 25

aymaras y 5 caucásicos bolivianos residentes en la ciudad de La Paz (3.800 m - 4100 m) revelaron una HbF de menos del 1% (media HbF 0,45%, SD 0,14). (Tabla 2)

**Tabla 2.**  
**La hemoglobina y el P50 en sujetos residentes a grandes alturas**

| Ubicación geográfica           | P50 (mmHg) (rango) | HbF% (rango) | HbA2% (rango) | Hb (g/dl) (rango) |
|--------------------------------|--------------------|--------------|---------------|-------------------|
| Salt Lake City, EE.UU. (1320m) | 22,35-25,16        | 0,2-0,3      | (rango)       | 12,0-13,7         |
| Srinagar, India (1730m)        | 22,72-26,38        | 0,5-0,8      | 1,8-2,3       | 11,8-15,3         |
| Huashixia, China (4320m)       | 25,74-25,99        | 0,3-0,7      | 2,3-2,7       | 13,8-19,3         |
| Controles no tibetanos (4320m) | 25,42-26,01        | 0,3-0,7      | 1,5-2,6       | 15,3-17,8         |

*Los controles no tibetanos incluyen 4 voluntarios no determinados, 25 Aymaras y 5 caucásicos bolivianos.*

*Fuente: Blood Cells, Molecules & Diseases 2014; 53(1-2):27-29.*

## CONCLUSIÓN

Contrastando la existencia de reportes de un aumento de HbF en individuos expuestos a hipoxia<sup>13</sup>, se pudo evidenciar que la cuantificación de HbF en 29 sujetos tibetanos que viven en 4.320 m, 25 aymara y 5 residentes caucásicos andinos fue normal. Este dato coincide con un informe acerca de la HbF normal en sujetos con policitemia Chuvash que tienen sensibilidad aberrante a la hipoxia debido a una mutación genética von Hippel-Lindau que lleva a una sensibilidad de hipoxia aumentada a baja altitudes<sup>14</sup>.

La adaptación a un ambiente hipobárico implica una serie de complejas respuestas fisiológicas que tienen por objeto garantizar el objetivo de una adecuada oxigenación a nivel celular y aunque, una alta afinidad hemoglobina-oxígeno había sido postulada como ventaja en grandes alturas<sup>15</sup>, se pudo concluir que la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno no está alterada en los habitantes a grandes alturas y que probablemente sean otros los mecanismos fisiológicos adaptativos que aseguren una oxigenación apropiada.

## REFERENCIAS

1. Tashi T, Feng T, Koul P, et al. High altitude genetic adaptation in Tibetans: no role of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Blood cells, molecules & diseases*. 2014;53(0):27-29. doi:10.1016/j.bcmd.2014.02.003.
2. Morpurgo G, Arese P, Bosia A, et al. Sherpas living permanently at high altitude: a new pattern of adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;73(3):747-751. [PMC free article] [PubMed]
3. Hu H, Simonson TS, Glusman G, et al. Insights on the evolutionary history of Tibetans from whole-genome sequence data, [abstract]; Annual Meeting of the American Society of Human Genetics; October 25, 2013; Boston, MA. [Abstract # 2050F]
4. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(Suppl 1):8655-8660. [PMC free article] [PubMed]
5. Wagner P, Simonson T, Wei G, et al. High altitude physiology: lessons from Tibet. [Accessed November 30, 2013]; *Proc SPIE 8723, Sensing Technologies for Global Health, Military Medicine, and Environmental Monitoring III*. 2013 May 29;:87230S. <http://dx.doi.org/10.1117/12.2020038>.
6. Simonson TS, Yang Y, Huff CD, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science*. 2010;329(5987):72-75. [PubMed]
7. Lorenzo FR, Simonson TS, Yang Y, Ge R, Prchal JT. A novel PHD2 mutation associated with Tibetan genetic adaptation to high altitude hypoxia, [abstract] *Blood*. 2010;116(21) Abstract # 2602 and under review in *Nature Genetics*, 2013.
8. Moore LG. Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 2001;2(2):257-279. [PubMed]
9. Morpurgo G, Battaglia P, Bernini L, Paolucci AM, Modiano G. Higher Bohr effect in Indian natives of Peruvian highlands as compared with Europeans. *Nature*. 1970;227(5256):387-388. [PubMed]
10. Beall CM, Blangero J, Williams-Blangero S, Goldstein MC. Major gene for percent of oxygen saturation of arterial hemoglobin in Tibetan highlanders. *Am J Phys Anthropol*. 1994;95(3):271-276. [PubMed]
11. Yi X, Liang Y, Huerta-Sanchez E, et al. Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science*. 2010;329(5987):75-78. [PMC free article] [PubMed]
12. Lichtman MA, Murphy MS, Adamson JW. Detection of mutant hemoglobins with altered affinity for oxygen. A simplified technique. *Ann Intern Med*. 1976;84(5):517-520. [PubMed]
13. Risso A, Fabbro D, Damante G, Antonutto G. Expression of fetal hemoglobin in adult humans exposed to high altitude hypoxia. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48(3):147-153. [PubMed]
14. Salomon-Andonie J, Miasnikova G, Serqueeva A, Polyakova LA, Niu X, Nekhai S, Gordeuk VR. Effect of congenital upregulation of hypoxia inducible factors on percentage of fetal hemoglobin in the blood. [letter to the editor] *Blood*. 2013;122(17):3088-3089. [PMC free article] [PubMed]
15. Hebbel RP, Eaton JW, Kronenberg RS, Zanjani ED, Moore LG, Berger EM. Human Llamas: adaptation to altitude in subjects with high hemoglobin oxygen affinity. *J Clin. Invest*. 1978;62(3):593-600. [PMC free article] [PubMed]



## Capítulo X

### **BOLIVIAN AYMARA NATIVES WITH CHRONIC MOUNTAIN SICKNESS HAVE AUTONOMOUS BFU-E GROWTH**

Ricardo Amaru, Ariel Amaru, Hortensia Miguez, Torres Gina, Josue Mamani, Oscar Vera,  
Heriberto Cuevas, Josef T. Prchal, and Jaroslav F Prchal.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.  
Publicado en la revista Blood, American Society of Hematology.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## BACKGROUND

Erythrocytosis / polycythemia is divided into primary and secondary. Primary polycythemia can be either acquired; i.e. polycythemia vera (PV) due to somatic JAK2 mutation, or congenital due to germ-line DNA changes (erythropoietin (EPO) receptor and VHL mutations in Chuvash polycythemia). These mutations are expressed within erythroid progenitors, drive increased erythropoiesis and are detected by hypersensitive or autonomous EPO BFU-E responses. In contrast, secondary erythrocytosis (SE), such as seen with cardiopulmonary pathologies, is driven by the circulating EPO.

Chronic mountain sickness (CMS) is characterized by high altitude pathological erythrocytosis and by cognitive and neurological impairments. CMS is found in subjects living in high altitude (2500 meters and higher). In La Paz, Bolivia, (3600m) there is 7% incidence of CMS erythrocytosis.

Some human populations (Tibetans, Andean Quechuas and Aymaras, and Ethiopians) are adapted to very high altitudes and their adapted phenotypes and, in some instances, evolutionarily selected haplotypes, have been reported. Whole genome was evaluated in Andeans and two

genes, SENP1 and ANP32D were found to be evolutionarily selected and correlated with presence or absence of erythrocytosis. The genes down-regulation in hypoxia had survival benefit in *Drosophila* ortholog (1). SENP1 desumoylate GATA-1 and other regulatory proteins and is critical for definitive erythropoiesis (2,3).

Here we evaluated native Aymara La Paz dwellers with three types of polycythemia: CMS, SE secondary to cardiopulmonary disease, and PV, by clinical studies and by in vitro evaluation of erythroid progenitors, and compared them to non-polycythemic subjects.

## PATIENTS AND METHODS

Complete blood count was performed by automatic hematologic counter (Micro 60, USA). Serum EPO was measured by Elisa (R&D System, USA) and JAK2<sup>V617F</sup> mutation analysis by PCR assay. Erythroid progenitors were isolated by density gradient centrifugation and cultured in methylcellulose medium with and without EPO (Stem Cell technologies, Canada) at 37° C and 5 % CO<sub>2</sub>. BFU-E colonies reading was carried out according to standardized criteria at 7 and 14 days.

## Results

|                                 | Normal Control<br>(n=10) | CMS<br>(n=15) | Secondary<br>Erythrocytosis<br>(n=10) | Polycythemia<br>Vera<br>(n=5) |
|---------------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Gender M/F                   | 10/0                     | 15/0          | 10/0                                  | 3/2                           |
| Age (range)                     | 42 (40-47)               | 48 (29-58)    | 53 (34-72)                            | 67 (42-74)                    |
| Hb g/dl (SD)                    | 16.2 (+ 0.9)             | 20.3 (+ 0.9)  | 22.8 (+ 1.4)                          | 20.0 (+ 2.5)                  |
| Ret % (SD)                      | 1.3 (+ 0.1)              | 2.9 (+ 1.3)   | 3.6 (+ 1.2)                           | 2.1 (+ 0.3)                   |
| WBC /ul (SD)                    | 6300 (+ 1600)            | 7200 (+ 1900) | 6600 (+ 1700)                         | 16600 (+ 4800)                |
| PLT 10 <sup>3</sup> ul (SD)     | 273 (+ 80)               | 229 (+ 58)    | 193 (+ 54)                            | 604 (+ 177)                   |
| sEPO mUI/ml (SD)                | 10.0 (+ 3.9)             | 10.5 (+ 2.2)  | 82.9 (+ 30.4)                         | 3.0 (+ 1.2)                   |
| JAK2 <sup>V617F</sup> , No. (%) | 0 (0)                    | 0 (0)         | 0 (0)                                 | 100                           |
| Apoptosis                       | Normal                   | Delayed       | Normal                                | Delayed                       |
| BFU-E: EEC                      | 0 (0-0)                  | 10 (2-25)     | 0 (0-0)                               | 45 (25-70)                    |

**Conclusions**

- a) Endogenous erythroid colony (EEC) are present in Aymaras with CMS, indicating primary polycythemia.
- b) Endogenous EECs are higher in PV than in CMS.
- c) CMS subjects have normal serum EPO levels.
- d) The role of SENP1, and hypoxia-regulated RUNX1 and NF-E2 (4) that promote erythropoiesis, is being interrogated in native erythroid cells.
- e) It remains to be determined if the autonomous BFU-E growth is specific for Aymara's CMS or present in CMS individuals of other ethnicities.

**References:**

- 1. Yu L et al. J Exp Med., 2010, 207:1183.
- 2. Sharma D et al. Cell Report, 2013, 3:1640.
- 3. Zhou D et al. Am J Hum Genet. 2013, 93:452.
- 4. Kapralova K et al. Blood. 2014,123:391

## Capítulo XI

### **SUCCESSFUL TREATMENT OF HU-REFRACTORY POLYCYTHEMIA VERA WITH ATORVASTATIN AND LOW DOSE HYDROXYUREA Results from a Pilot Study in Bolivia**

Ricardo Amaru, Ariel Amaru, Hortensia Miguez, Gina Torres, Josue Mamani, Maria Aguilar, and Heriberto Cuevas.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.  
Publicado en la revista Blood, American Society of Hematology.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## BACKGROUND

Polycythemia Vera (PV) is a clonal myeloproliferative neoplasm, characterized by the JAK2<sup>V617F</sup> mutation.

The main goal of current therapies for PV is to prevent thrombotic events and delay transformation to Myelofibrosis (MF) or Acute Myeloid Leukemia (AML). Treatment for PV to keep an hematocrit (Hct) level <45 %, has been associated with a reduction in cardiovascular deaths and thrombotic events (Marchioli, R et al. NEJM 2013). Currently, low-risk PV patients (<60 years and no previous thrombotic events) are treated with aspirin and phlebotomy while high-risk patients require additional cytoreductive therapy, usually with Hydroxyurea (HU). Resistance to HU is associated with an increased risk of transformation and reduced survival. This is why for HU-refractory patients, second line treatments with interferon alpha, anagrelide or even ruxolitinib are recommended. In Latin America, because of high cost and drugs availability, this last group reflects difficulties to be treated. Because statins have been reported to modulate the erythroid clonogenic activity of normal BM erythroid colonies we performed a pilot study to investigate in vitro and in vivo the biologic and clinical activity of atorvastatin in PV patients.

## Patients and Methods

Ten high risk PV patients with a median age of 64.3 years (range 58-73) entered into this study. The diagnosis of PV was done according to the 2008 World Health Organization diagnostic criteria and patients were stratified according to an algorithm proposal provided by Griesshammer et al. (Ann Hematol, 2015). The definition of HU resistance (Barosi, G et al.: BJH 2009) was applicable to five patients (median age 63.9 years) failing to achieve a satisfactory hematologic response upon treatment with more than 2 g of HU, 100 mg of Aspirin and phlebotomies. The assessment of the JAK2V617F mutation was performed as previously described (Guerini et al.: Leukemia 2009). Colony assay, proliferation and apoptosis tests were performed with or without Simvastatin (3.5 uM), as previously described (Amaru, A, Experimental Hematology

2012), on cell lines (UKE1 and K562) and bone marrow mononuclear cells obtained from PV patients and healthy donors. Patients with HU refractory PV (n=5) and high risk PV with hypercholesterolemia (n=5) were eligible to receive Atorvastatin (20 mg/day) added on the top of the ongoing treatment with phlebotomies, Aspirin (100 mg/day) and cytoreductive HU therapy (500 mg/day). All treated patients were high altitude residents (> 3.600 m.a.s.l.) of La Paz (Bolivia) where the normal Hct level of healthy subjects is 48-57% for men and 44-54% for women. This pilot study was approved by the Review Board of the Hospital and the University of San Andres, La Paz.

## RESULTS

In a preliminary set of in vitro proliferation cell assays, simvastatin (3.5 uM), added for 5 days, induced a 33% inhibition of cell proliferation of UKE-1 (JAK2V617F mutated) as compared to 5 % of K562 (BCR/ABL positive). A comparable result was obtained in a 7-day clonogenic cell assay where the colony inhibition was 50 % for UKE-1 and 10 % for K562. On the basis of these results similar experiments were also performed using BM mononuclear cells derived from PV patients and healthy donors. In these experiments performed with the addition of simvastatin, it induced a 41% of inhibition in BFU-E colonies of PV patients and a 25% of inhibition in healthy donors. Furthermore, BFU-E colonies inhibited by simvastatin presented a decrease in hemoglobinization and the size of colonies.

HU refractory PV patients and High-risk PV patients with hypercholesterolemia treated with the addition of Atorvastatin, Aspirin, cytoreductive HU and phlebotomies; after a follow-up of 2.6 years (1-7 years), induced a decrease of WBC from 16.500 to 9.270/ul, Hct 61.1 to 52.3% and PLT 457.900,000 to 324.7000/ul. The number of required phlebotomies is reduced in comparison to the required at starting treatment. None of the patients presented thrombotic or cardiopulmonary event. One patient died within two years of starting treatment, due to complications of diabetes mellitus.

## CONCLUSIONS

In vitro and in vivo, statins showed some evidence of inhibitory activity of the hematopoiesis of PV patients. These preliminary results might indicate the opportunity to further investigate the potential clinical value of these molecules in the treatment of PV.

Disclosures Off Label Use: Atorvastatin was used for its antiproliferative activity on myeloid progenitor cells shown by in vitro experiments.

## Capítulo XII

### **HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS FROM PATIENTS WITH CHRONIC MOUNTAIN SICKNESS LACK THE JAK2<sup>V617F</sup> MUTATION, SHOW HYPERSENSITIVITY TO ERYTHROPOIETIN AND ARE INHIBITED BY STATINS**

Ricardo Amaru, Hortencia Miguez, Rosario Peñaloza, Gina Torres, Tiziano Barbui, Josee Golay and  
Alessandro Rambaldi.

Unidad de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.  
Publicado en la revista Blood, American Society of Hematology.

Corrección y estilo:

*Tania Daniela Patón Mamani*

Diseño y Diagramación:

*Jhonny Alfredo Ticona Limachi*



## BACKGROUND

Chronic Mountain Sickness (CMS) is a clinical entity that occurs in native or long-life residents above 2500 meters of altitude. The disease is characterized by massive erythrocytosis, hyperviscosity syndrome (headache, dyspnea and cyanosis) severe hypoxemia and cardiopulmonary symptoms. The etiology is unknown and no association has been found with Erythropoietin (EPO), Epo receptor (EpoR), Hypoxia Inducible Factor 1a (HIF-1a), von Hippel Lindau (VHL), as well as PHD1, PHD2, PHD3 or PTEN genes. Therapy relies on phlebotomy and oxygen support. Acetazolamide, Medroxyprogesterone and Enalapril have also been tested, but their use has not been largely implemented. Since HMG-CoA inhibitors such as farnesyltransferase inhibitors (Larghero, Blood 2005) may inhibit the in vitro autonomous erythropoiesis of polycythemia vera patients, we studied in CMS the therapeutic potential of statins that have similar pharmacologic activity.

## PATIENTS AND METHODS

Normal controls (NC, n= 10) and patients were native Bolivians from the city of La Paz, Bolivia (3600-4000 mt altitude). The diagnosis of CMS (n=15) was made according to the consensus statement on this disease (Leon-Velarde, 2005). The diagnosis of Polycythemia Vera (PV, n= 5) or secondary erythrocytosis (SE, n= 10) was done according to WHO criteria or established clinical guidelines. Serum Erythropoietin (sEpo) was assessed by chemiluminescent assay. Burst forming units-erythroid (BFU-E) assay was performed by plating 105 BM mononuclear cells in methylcellulose with or without recombinant human rhEpo (2IU/ml) and Simvastatin (20 mM). Evaluation of apoptosis by Annexin V/7-AAD and JAK2V617F mutational analyses were performed as described (Guerini et al, Leukemia 2008).

## RESULTS

CMS patients (median age 48 years, range 29-58) had median values of hemoglobin and hematocrit (Hb 20.3 gr/dl, range: 19.1-22 and Hct, 62%) significantly higher than observed in NC (Hb 16.2 gr/dl, range 14.8-16.5 and Htc 52%), respectively ( $p < 0.001$ ) and significantly lower than SE patients (Hb: 22.8 gr/dl, range 20.2-25 and Htc: 71%), ( $p < 0.001$ ). Hb and Hct were not different in CMS

and PV patients ( $p = 0.875$ ). In CMS sEpo values (median 22 mIU/mL, range: 16.1-45.1) were significantly higher compared to NC (median 10.7 mIU/mL, range 7-18.8) ( $p < 0.001$ ) and lower compared to SE patients (median 82.9 mIU/mL, range 44.8-135) ( $p < 0.001$ ); as expected, PV patients showed very low sEpo levels (median 3 mIU/ml, range 2.5-5.2). The JAK2V617F mutation analysis proved negative in all NC, CMS and SE patients and positive in PV. In the absence of exogenous rhEpo, a median of 0, 10, 0, 45 BFU-E colonies were obtained from NC, CMS, SE and PV patients. When rhEpo was added, 21, 40, 47 and 130 BFU-E were counted, respectively; this difference was significant when comparing NC and PV to CMS ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$  respectively), but not in the case of SE vs. CMS ( $p = 0.227$ ). Interestingly, in PV and CMS patients, BFU-E colonies remain remarkably viable between day 14-21 while viability declined rapidly in NC and SE colonies after day 14. The prolonged viability and higher sensitivity to rhEpo of BFU-E obtained from CMS and PV erythroid progenitors was also confirmed by plating BM mononuclear cells with suboptimal doses of rhEpo (0.03 to 1 IU/ml). Moreover, when simvastatin (20  $\mu$ M) was added in vitro to rhEpo driven BFU-E colonies, it induced a median inhibition of 29% in NC as compared to 37, 56 and 44 in CMS, SE and PV ( $p < 0.013$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ , respectively). Finally, 11 CMS patients who had a concomitant hypercholesterolemia (median cholesterol level 238 mg/dl, range 206- 310) had the opportunity to be treated with statins (atorvastatin, 20-40 mg/day). Before starting treatment with atorvastatin, all patients, who had median Hb and Htc values of 19.9 gr/dl and 63 % respectively, performed phlebotomy. After a median follow up of 18 months with atorvastatin, the median Hb and Htc values were 17.1 gr/dl and 54.6 %, respectively. The need of phlebotomy was apparently reduced, from 4-6 sessions/year to 1.

## CONCLUSIONS

Our results underline that a) hematopoietic progenitor cells from CMS patients may promote an autonomous erythroid colony growth and show hypersensitivity to hrEpo b) statins may induce in vitro a significant inhibition of this accelerated erythropoiesis so that they could play a therapeutic role in the treatment of this and other chronic myeloproliferative disorders.

