

## Eritropoietina, ormone tuttofare

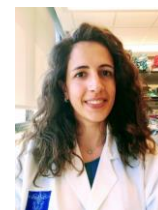
### In depth review

**Chiara Guglielmo<sup>1,2</sup>, Chiara Cantarelli<sup>1,3</sup>, Andrea Angeletti<sup>1,2</sup>, Paola Todeschini<sup>2</sup>, Paolo Cravedi<sup>1</sup>**

1 Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA

2 Dipartimento Unità Sperimentale di Medicina Specialistica, Diagnostica, Nefrologia, Dialisi e Trapianto Rei Ospedale Universitario S. Orsola, Bologna, Italy

3 Dipartimento di Medicina e Chirurgia (Università di Parma), UO Nefrologia (Azienda Ospedaliera-Università Parma), Parma, Italy



Chiara Guglielmo

#### Corrispondenza a:

Paolo Cravedi, MD, PhD

Icahn School of Medicine at Mount Sinai

1 Levy Place, 10029 New York, NY

Email: paolo.cravedi@mssm.edu

Phone: +1 212-241-3349

Fax: +1 212-987-0389

#### ABSTRACT

Nel corso degli ultimi due decenni è stato dimostrato che, oltre all'attività eritropoietica, l'eritropoietina (EPO) esercita numerose altre funzioni, tra cui quelle neuro-protettive, anti-apoptotiche, antiossidanti, angiogenetiche e immunomodulanti. L'azione dell'EPO si esplica attraverso l'interazione con due differenti forme del suo recettore (EPOR): una omodimerica, responsabile degli effetti eritropoietici, ed una eterodimerica, responsabile degli effetti non eritropoietici. La stimolazione di quest'ultimo recettore si è dimostrata anche efficace nel prolungare la sopravvivenza del trapianto d'organo, sia in modelli murini che nell'uomo.

Lo sviluppo di nuove molecole che agiscono selettivamente sull'EPOR eterodimerico, privo di attività eritropoietica, ha consentito di iniziare a valutare l'effetto di trattamenti a lungo termine, evitando di incorrere nelle possibili complicanze, di natura principalmente cardiovascolare, legate all'aumento dell'ematocrito.

**PAROLE CHIAVE:** eritropoietina, EPO, ARA290, EPOR

## Introduzione

All'inizio del XX secolo, due scienziati francesi osservarono che il plasma di conigli anemici era in grado di incrementare la produzione di globuli rossi quando iniettato in animali non anemici [1]. I ricercatori ipotizzarono che questa attività eritropoietica fosse causata da una singola proteina plasmatica, alla quale nel tempo vennero attribuiti vari nomi, tra cui "erythropoietic-stimulating factor" e, infine, "eritropoietina".

Solo negli anni '50 e '60, alcuni ricercatori americani dimostrarono in modo definitivo che l'eritropoietina (EPO) viene prodotta principalmente dai reni in risposta ad una ridotta concentrazione circolante di ossigeno e che è in grado di stimolare la produzione di globuli rossi [2].

Dati generati nel corso degli ultimi due decenni hanno dimostrato che, oltre all'attività eritropoietica, l'EPO svolge numerose altre funzioni, tra cui quelle neuro-protettive, anti-apoptotiche, antiossidanti, angiogenetiche [3, 4] e immunomodulanti [5].

## EPO ed eritropoiesi

Lo stimolo principale per la trascrizione del gene dell'EPO è l'ipossia tissutale, che può indurre un aumento fino a 1.000 volte dei livelli di EPO nel sangue [4]. L'ipossia, generalmente associata all'anemia, induce la trascrizione di HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ) nelle cellule interstiziali peri-tubulari renali, dove si lega alla subunità HIF-1 $\beta$ , costitutivamente espressa, e stimola la trascrizione di geni bersaglio, tra cui quello dell'EPO [2]. In seguito al legame con l'EPO, il recettore dell'eritropoietina (EPOR) forma un omodimero capace di attivare l'espressione di geni che promuovono la proliferazione cellulare e prevengono l'apoptosi. A livello midollare, l'EPO stimola la sopravvivenza e la proliferazione dei precursori eritroidi inducendo la loro differenziazione in eritrociti maturi [6, 7]. Il conseguente incremento dell'ematocrito aumenta la capacità di trasportare ossigeno nel sangue [6].

In seguito alla clonazione del gene dell'EPO [8, 9], realizzata nel 1985, è stato possibile sviluppare EPO ricombinante umana per scopi terapeutici. Le due principali indicazioni all'utilizzo dell'EPO autorizzate dalla Food and Drug Administration (FDA) sono l'anemia secondaria a insufficienza renale cronica (IRC) e l'anemia indotta da chemioterapia nei pazienti oncologici [10]. Le altre indicazioni terapeutiche attualmente approvate sono riassunte nella Tabella 1.

• Anemia in pazienti con insufficienza renale cronica
• Anemia in pazienti con infezione da HIV trattati con zidovudina
• Anemia indotta da chemioterapia antitumorale
• Anemia nei neonati pretermine
• Riduzione della necessità di trasfusioni di sangue allogenico in pazienti sottoposti a interventi chirurgici

**Tabella 1: Indicazioni approvate dalla Food and Drug Administration (FDA) all'uso di eritropoietina**

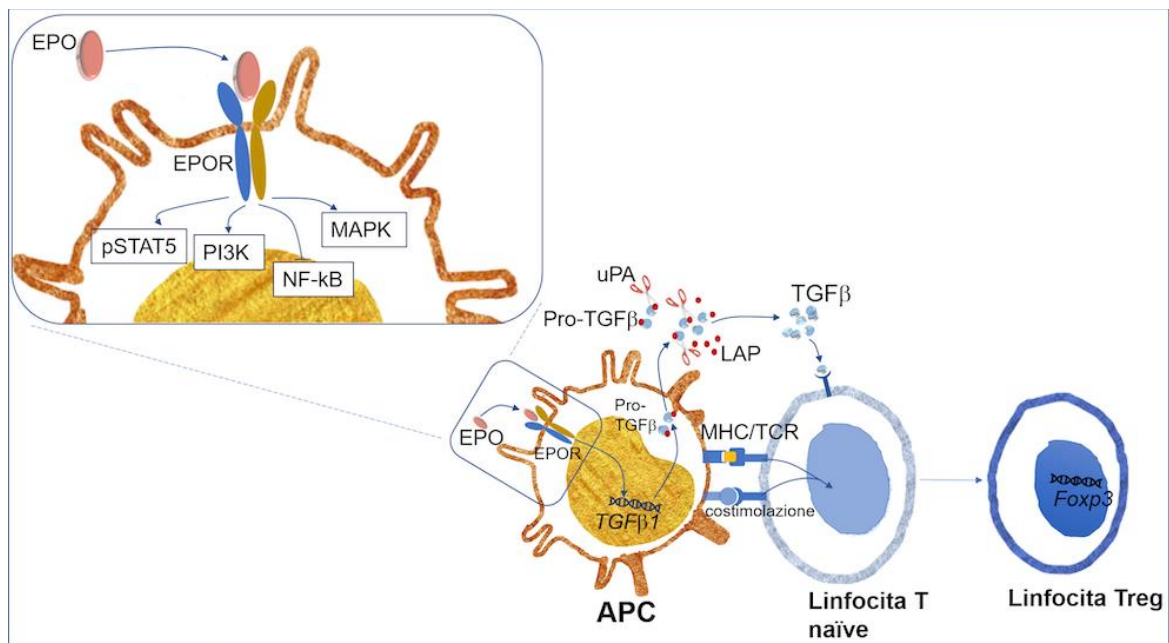
## Funzioni non eritropoietiche dell'EPO

Sebbene il nome originale faccia riferimento principalmente alla sua funzione eritropoietica, l'EPO esercita anche importanti effetti non eritropoietici come citochina e fattore di crescita in grado di agire su numerose popolazioni cellulari, incluse quelle del sistema immune.

Esistono due forme dell'EPOR, una omodimerica, responsabile degli effetti eritropoietici, ed una eterodimerica, composta da una catena di EPOR e da una catena del  $\beta$ -common receptor ( $\beta$ cR, CD131, colony-stimulating factor 2 receptor- $\beta$ ) [11]. Questo secondo recettore è responsabile degli effetti non eritropoietici dell'EPO a livello di numerosi organi tra cui il cuore, il sistema nervoso, l'intestino, l'utero, il rene e le isole pancreatiche [12]. L'attivazione dell'eterodimero EPOR/CD131 richiede concentrazioni di EPO molto più elevate rispetto a quelle necessarie per l'attivazione dell'EPOR omodimerico [13] e determina la trasduzione di segnali in parte condivisi con l'EPOR omodimerico. In particolare, entrambi inducono l'attivazione di PI3K e MAPK, la fosforilazione di STAT5 e la regolazione dell'attività di legame dei membri della famiglia NF- $\kappa$ B [13].

### Effetti immunomodulatori dell'EPO

L'EPOR è espresso sulle cellule immunitarie, compresi i monociti, le cellule T e B [14] (Figura 1). Report dei primi anni 2000 indicano che l'EPO riduce la severità della malattia in modelli animali di artrite, di colite e di encefalomielite autoimmune (EAE) [15–17], attraverso meccanismi che ne implicano l'azione su cellule dell'immunità innata [16, 18] e adattativa [15, 19].



**Fig. 1:** L'EPO promuove l'induzione di cellule T regolatrici (Treg) aumentando la produzione di TGF $\beta$  nelle cellule presentanti l'antigene (APC). In queste cellule, il signaling attraverso l'EPOR eterodimerico aumenta la trascrizione di pro-TGF $\beta$ . uPA (urokinase-type plasminogen activator) scinde LAP (latency-associated peptide) dal pro-TGF- $\beta$  per attivarlo e promuovere la conversione delle cellule T CD4<sup>+</sup> naïve in Treg.

### EPO e immunità innata

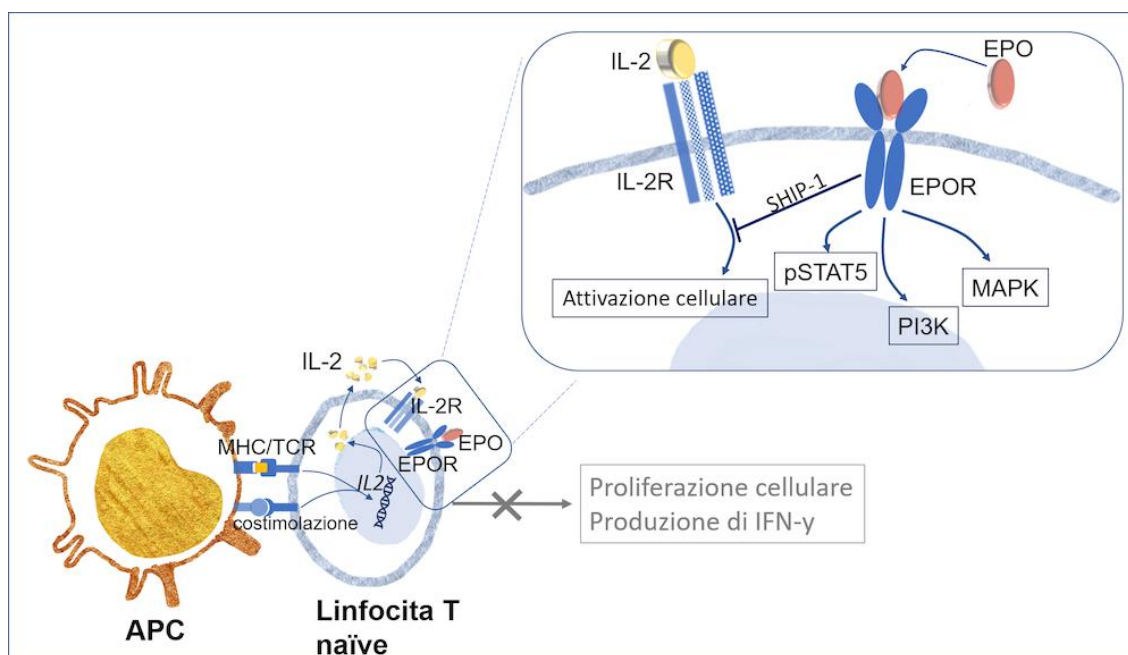
L'EPOR eterodimerico è espresso sulle membrane dei monociti e dei macrofagi e dati *in vitro* mostrano che l'EPO inibisce la produzione di mediatori infiammatori dei macrofagi murini [16] e umani [20]. In un modello murino di infezione sistemica da *Salmonella typhimurium*, gli animali trattati con EPO sviluppavano una carica batterica più elevata e una ridotta espressione di mediatori dell'infiammazione (interleuchina-6, tumor necrosis factor e nitric oxide synthase 2) rispetto ai controlli [16]. Studi *in vitro* hanno poi dimostrato che questo effetto è mediato da un'azione diretta dell'EPO sui monociti attraverso l'EPOR [16].

I macrofagi possono produrre e rilasciare l'EPO in risposta al segnale "find-me" sfingosina 1-fosfato (S1P) emesso dalle cellule che vanno incontro ad apoptosi. Attraverso una segnalazione autocrina, il legame tra l'EPO e l'EPOR espresso dai macrofagi ne stimola la proliferazione e la capacità di clearance delle cellule apoptotiche. La mancata espressione dell'EPOR sui macrofagi determina una loro alterata capacità di fagocitare le cellule apoptotiche, e i topi che non esprimono selettivamente l'EPOR su tali cellule sviluppano sintomi simili al lupus. Il trattamento con EPO nei topi geneticamente predisposti allo sviluppo del lupus, invece, è in grado di rallentare la progressione della malattia [18].

Oltre agli effetti antinfiammatori fin qui citati, è stato dimostrato che, in alcuni contesti, l'EPO può stimolare la risposta immunitaria. In particolare, dati mostrano che l'EPO induce l'espressione delle molecole costimolatrici CD80 e CD86 e di HLA-DR nelle cellule dendritiche (DC) del sangue periferico e nelle DC derivate dai monociti (MoDC) [21]. L'EPO è anche in grado di promuovere la maturazione di MoDC immature [21].

### EPO e immunità adattativa

Nel 2014, il nostro gruppo ha dimostrato che l'EPO inibisce direttamente la proliferazione delle cellule T convenzionali (Tconv), sia naïve che memoria, attraverso il signaling dell'EPOR omodimerico (Figura 2) [19].



**Fig. 2: L'EPO, tramite l'EPOR omodimerico, induce l'attivazione di SHIP-1 (SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase 1) che, attraverso un meccanismo di cross-talk, inibisce il signaling a valle dell'IL-2Rβ. Poiché le cellule T convenzionali (Tconv) dipendono per la loro proliferazione dal signaling di IL-2Rβ, l'interazione EPO/EPOR ne inibisce l'attivazione.**

Se non stimolate, le cellule T umane e murine esprimono bassi livelli di EPOR omodimerico sulla loro superficie, che possono aumentare rapidamente in seguito all'attivazione del recettore delle cellule T (TCR). A seguito dell'attivazione del TCR e delle molecole costimolatrici, la cellula T inizia a produrre interleuchina 2 (IL-2) che, con un'azione autocrina, ne alimenta la proliferazione. L'interazione EPO/EPOR inibisce i segnali IL-2-dipendenti trasmessi attraverso la catena  $\beta$  del recettore dell'IL-2 (IL-2R), impedendo in tal modo la produzione di interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), l'attivazione e la proliferazione delle cellule T.

Anche la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule T regolatrici (Treg), un subset di cellule T implicato nel mantenimento della tolleranza nei confronti del self e degli alloantigeni, dipendono dalla via di segnalazione a valle dell'IL-2R. Tuttavia, a differenza delle cellule Tconv, in cui il signaling è mediato da IL-2R $\beta$ , target dell'EPO, le cellule Treg dipendono dal signaling mediato da IL-2R $\gamma$ ; quindi, pur esprimendo l'EPOR come le cellule Tconv, le Treg non vengono inibite dall'EPO. Dati *in vitro* e *in vivo* nei topi dimostrano che l'EPO promuove la conversione di cellule T CD4<sup>+</sup> naïve in Treg attraverso la stimolazione della produzione locale di TGF $\beta$  da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC). La produzione di TGF $\beta$  indotta dall'EPO richiede la presenza dell'EPOR eterodimerico sulle APC [14] (si veda Figura 1). In uno studio di coorte prospettico, l'impiego di EPO per il trattamento dell'anemia si associava ad aumentati livelli di Treg circolanti in pazienti con insufficienza renale cronica, suggerendo che gli effetti rilevati *in vitro* e *in vivo* nei topi si applicano anche all'uomo [14].

Utilizzando modelli *in vitro* ed *in vivo* abbiamo dimostrato che il legame dell'EPO all'EPOR sulle cellule T CD4<sup>+</sup> inibisce direttamente anche l'induzione delle cellule T helper 17 (T<sub>H</sub>17) e promuove la loro trans-differenziazione in cellule Treg [22].

### L'EPO nel trapianto d'organo

Grazie ai suoi effetti eritropoietici, protettivi ed immunomodulatori, l'EPO rappresenta una potenziale opzione terapeutica per migliorare gli outcome del trapianto d'organo.

Nel 2012, Cassis *et al.* hanno dimostrato che il trattamento con EPO in un modello di rigetto cronico di trapianto renale nei ratti è in grado di correggere completamente l'anemia post-trapianto e di prevenire la disfunzione progressiva del graft e la sua fibrosi [23]. Al contrario, la normalizzazione dei livelli di emoglobina post-trapianto tramite trasfusioni di sangue non ha comportato alcun effetto sui danni cronici dell'allotrapianto, indicando che tale effetto protettivo dell'EPO è indipendente dalla correzione dell'anemia. In questo studio, l'azione nefroprotettiva dell'EPO è stata attribuita ad una aumentata espressione del fattore anti-apoptotico Bcl-2 nel graft. Tuttavia, il fatto che il trattamento con EPO fosse inoltre associato ad un ridotto infiltrato di cellule infiammatorie suggerisce che siano coinvolti anche effetti immunomodulatori. Coerentemente con questa ipotesi, abbiamo dimostrato che la somministrazione di EPO prolunga in modo significativo la sopravvivenza del graft in un modello murino di trapianto cardiaco, un effetto associato ad una riduzione delle cellule Tconv alloreattive e ad un aumento delle cellule Treg [14].

Essendo prodotta principalmente dal rene, è possibile che l'EPO sia responsabile delle proprietà pro-tollerogeniche di quest'organo, fornendo una potenziale spiegazione per i tassi più bassi di rigetto acuto nei riceventi di trapianto di rene rispetto ai riceventi di cuore o polmoni [24] (questi organi producono solo minime quantità di EPO [25]) e per i migliori outcome nei riceventi di trapianti combinati di rene e cuore rispetto ai riceventi di trapianto cardiaco isolato [26]. L'immunoregolazione EPO-dipendente potrebbe essere responsabile, inoltre, della tolleranza spontanea che, talvolta, sviluppano i riceventi di trapianto renale, non descritta, invece, nei riceventi di trapianto cardiaco [27].

Un ulteriore dato a supporto della relazione inversa tra livelli di produzione di EPO e immunogenicità dell'organo, è rappresentato dal fatto che il fegato, di cui sono noti gli effetti pro-tollerogenici, è la seconda principale fonte di EPO [28].

In considerazione degli effetti nefroprotettivi e immunomodulatori dell'EPO, 104 riceventi di trapianto renale ad alto rischio di ritardata ripresa funzionale sono stati randomizzati a ricevere

quattro somministrazioni di EPO durante le prime due settimane post-trapianto, oppure nessun trattamento. La terapia con EPO è stata ben tollerata, ma i due gruppi non hanno mostrato differenze significative nell'incidenza di ritardata ripresa funzionale, di rigetto acuto o nella funzionalità del graft a tre mesi dal trapianto [29]. In un altro studio, invece, la terapia con EPO prima del trapianto si è dimostrata in grado di ridurre gli episodi di rigetto acuto tardivo e di migliorare la sopravvivenza dell'organo a 5 anni, rispetto ai pazienti che venivano trasfusi o che non ricevevano alcun trattamento [30]. Gli effetti immunomodulanti dell'EPO sono stati anche confermati da altri studi randomizzati, in cui il trattamento con alte dosi versus dosi standard di EPO riduceva significativamente il declino della funzionalità del trapianto [31] e ne aumentava la sopravvivenza a 2 anni [32].

Le discrepanze emerse rispetto all'impatto della terapia con EPO sugli esiti del trapianto [29, 31, 32] possono dipendere dal dosaggio, dalla durata del trattamento e dalle caratteristiche del paziente e giustificano ulteriori studi per definire strategie terapeutiche ottimali.

### Funzioni dell'EPO in altri organi

L'EPO svolge funzioni protettive in molti tessuti [12] (Figura 3), ad esempio favorendo la neoangiogenesi, ed esercitando un effetto anti-apoptotico e antinfiammatorio [33]. Questi effetti non ematopoietici sono per lo più mediati dall'EPOR eterodimerico [34].

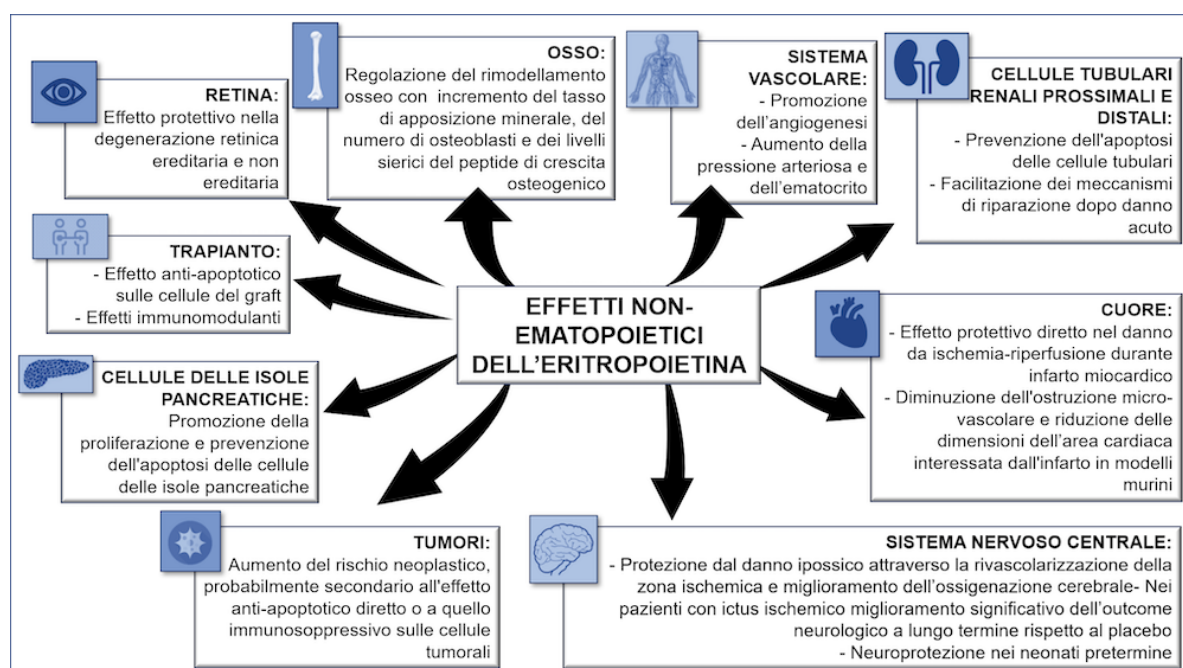


Fig. 3: Effetti non ematopoietici dell'EPO

### Cuore

La terapia con EPO è stata associata ad un maggiore rischio di sviluppare ipertensione ed eventi cardiovascolari, in larga parte conseguenti all'aumento dell'ematocrito [35]. Tuttavia, dati provenienti da diversi gruppi di ricercatori convergono nell'evidenziare anche un effetto protettivo diretto dell'EPO nel danno da ischemia-riperfusion acuto durante infarto miocardico. Esperimenti *in vitro* indicano che l'EPO esercita un'azione protettiva sulle cellule cardiache e studi *in vivo* nei ratti mostrano che la somministrazione di EPO dimezza la perdita di cardiomiociti nell'infarto del miocardio, un effetto sufficiente a normalizzare la funzione emodinamica entro una settimana dalla ri-perfusione [36].

Sulla base di questi dati sperimentali, uno studio clinico ha valutato gli effetti di un trattamento di breve durata su 529 pazienti con infarto miocardico: non si è osservato un effetto significativo dell'EPO sull'end-point primario (funzione ventricolare a 6 settimane dall'evento acuto), ma le analisi secondarie hanno dimostrato che il trattamento con EPO era sicuro e si associava a una riduzione delle dimensioni dell'area colpita dall'infarto, dell'incidenza delle ostruzioni microvascolari e degli eventi avversi cardiovascolari a breve termine [37].

### Rene

Interagendo con l'EPOR espresso dalle cellule tubulari renali sia prossimali che distali, l'EPO ne previene l'apoptosi e ne facilita la ripresa funzionale dopo un danno [38]. Nel modello di danno renale acuto nei ratti indotto da cisplatino, il trattamento con EPO ricombinante accelera il recupero della funzione renale [39]. Allo stesso modo, nei ratti con ostruzione ureterale unilaterale, sia l'EPO che un suo derivato con azione non eritropoietica (che agisce selettivamente attraverso l'EPOR eterodimerico) diminuiscono l'apoptosi delle cellule tubulari e la fibrosi interstiziale [40].

Nonostante questi incoraggianti dati sperimentali, una meta-analisi di 7 studi clinici non ha rilevato un beneficio significativo del trattamento con EPO nell'incidenza di danno renale acuto nell'uomo [41].

### Sistema nervoso e retina

Diversi tipi di cellule del sistema nervoso esprimono l'EPOR, comprese le cellule progenitrici neurali (NPC), gli astrociti, i neuroni e gli oligodendrociti. Nei ratti, l'esposizione delle NPC all'EPO promuove la loro proliferazione e differenziazione in astrociti o oligodendrociti, un effetto associato all'attivazione dell'extracellular signal-regulated kinase-1 (ERK1) e nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [42]. Le cellule cerebrali producono EPO in risposta all'ipossiemia. L'EPO prodotta localmente o somministrata per via sistemica favorisce la rivascolarizzazione della zona ischemica [43], migliorando l'erogazione di ossigeno al cervello nei ratti.

Una meta-analisi di studi clinici pubblicati in cui EPO veniva impiegata in pazienti con ictus ischemico non ha dimostrato effetti significativi a 90 giorni dall'evento acuto [44], mentre uno studio randomizzato ha riscontrato un miglioramento significativo del deficit neurologico a lungo termine associato alla terapia con l'EPO rispetto al placebo [45].

Studi recenti indicano che l'EPO migliora le funzioni cognitive in modelli murini di morbo di Alzheimer, riducendo la produzione di TNF- $\alpha$  e di interleuchine indotta dall'amiloide e contrastando così l'infiammazione che contribuisce alla progressione della malattia [46].

L'azione dell'EPO è stata ampiamente studiata anche nella prevenzione delle lesioni cerebrali e delle conseguenti disabilità dello sviluppo neurologico nei neonati pretermine [47]. I meccanismi responsabili dell'effetto neuro-protettivo dell'EPO in questo contesto includono la prevenzione dell'apoptosi cellulare e dell'infiammazione, l'attività antiossidante, la promozione della rigenerazione neurale e del normale sviluppo neurologico e la riparazione delle lesioni ischemiche cerebrali. Con il crescente numero di neonati prematuri, l'EPO ricombinante viene sempre più spesso utilizzata come alternativa alle trasfusioni di sangue per i suoi effetti neuroprotettivi [47].

Anche la retina, un tessuto fortemente attivo dal punto di vista metabolico ed estremamente sensibile alle riduzioni della tensione di ossigeno e ai traumi, esprime l'EPOR e produce EPO [48]. Numerosi studi hanno dimostrato effetti protettivi dell'EPO nelle degenerazioni retiniche

ereditarie o acquisite [49]. Questo fenomeno, indipendente dall'eritropoiesi, è molto probabilmente mediato dall'EPOR eterodimerico [49].

### Pancreas e osso

L'EPO esercita un effetto protettivo sulle isole pancreatiche in diversi modelli animali: può promuovere la proliferazione e prevenire l'apoptosi delle cellule nelle isole pancreatiche suine [50], mentre nei topi diabetici l'EPO è in grado di ridurre il danno delle  $\beta$ -cellule tramite effetti anti-apoptotici, antinfiammatori e angiogenetici, e di migliorare il metabolismo glucidico [51].

L'EPO può anche influenzare l'omeostasi ossea. Una delle prime associazioni tra EPO e formazione ossea è stata osservata nei ratti resi anemici mediante sanguinamento controllato. In questi animali, la sintesi di EPO secondaria all'anemizzazione promuove l'attivazione sia del midollo osseo che dell'osso per sé, con un incremento del tasso di apposizione minerale, del numero di osteoblasti e dei livelli sierici del peptide di crescita osteogenico [52].

In modelli murini di riparazione di fratture del femore il trattamento con l'EPO migliora il volume e le proprietà biomeccaniche dell'osso [53]. Anche gli osteoblasti producono EPO come meccanismo di regolazione locale dell'eritropoiesi e del rimodellamento osseo [53].

Complessivamente, questi dati indicano che numerosi tipi cellulari esprimono EPOR e che l'EPO svolge molteplici effetti non eritropoietici.

### **Nuovi agonisti dell'EPOR eterodimerico**

L'EPO si lega all'EPOR eterodimerico con un'affinità 1.000 volte inferiore rispetto a quella che ha per il recettore omodimerico. Per questo motivo sono necessarie dosi molto elevate di EPO ricombinante per indurre risposte non eritropoietiche protettive sui tessuti, con conseguente rischio di effetti collaterali come la policitemia [54]. ARA290, (Cibinetide, Araim Pharmaceuticals, Inc., New York, USA), è un agonista selettivo dell'EPOR eterodimerico [54]. Studi *in vitro* e *in vivo* sui roditori hanno dimostrato che il trattamento con ARA290 protegge i cardiomiociti dall'apoptosi e migliora l'outcome nell'insufficienza cardiaca [55]. In un modello suino di danno da ischemia-riperfusion renale, la somministrazione di ARA290 si associava ad una riduzione dei livelli di creatinemia e delle lesioni istologiche renali [56]. ARA290 svolge, inoltre, un ruolo neuroprotettivo in vari modelli animali, ad esempio di ictus ischemico [54], di edema retinico indotto dal diabete [57] e di trauma dei nervi periferici [54].

Nell'ambito di studi clinici, ARA290 migliora il profilo metabolico e la neuropatia in pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 [58]; in soggetti con disfunzione neuropatica autonoma e anomalie sensoriali associate a sarcoidosi o a diabete mellito, riduce il dolore, aumenta la sensibilità cutanea e l'abilità fisica valutata tramite il 6-minute walk test [58–60]. L'effetto di questo peptide sulla rigenerazione vascolare mediata dall'EPOR eterodimerico è stato studiato anche nei casi di ischemia retinica, in cui può ridurre l'infiammazione e risultare un utile complemento alla terapia cellulare [61].



## Conclusioni

Scoperta inizialmente per i suoi effetti eritropoietici, l'EPO ha migliorato la qualità della vita e ha ridotto la morbilità e la mortalità dei pazienti con anemia associata a insufficienza renale cronica terminale o neoplasie ematologiche. Nel corso degli anni, questa glicoproteina ha guadagnato ulteriore attenzione per i suoi effetti non eritropoietici, tra cui quelli anti-apoptotici. Pertanto, le aree di studio più promettenti sembrano essere le condizioni acute come il danno da ischemia-riperfusion e le lesioni traumatiche, con l'obiettivo di proteggere le cellule situate nella zona ipoperfusa perifericamente al tessuto danneggiato.

Gli effetti non eritropoietici dell'EPO includono anche attività di immunomodulazione, in grado di prolungare la sopravvivenza del trapianto d'organo sia nei topi che nell'uomo. Essendo il sistema immunitario coinvolto anche nel danno da ischemia-riperfusion e nella riparazione e rigenerazione dei tessuti, è possibile che gli effetti immunomodulatori dell'EPO siano, almeno in parte, responsabili anche dei suoi effetti protettivi nei tessuti.

Lo sviluppo di nuove molecole che hanno come target l'EPOR eterodimerico, privo di attività eritropoietica, sta permettendo di valutare l'effetto di trattamenti a lungo termine, prevenendo le possibili complicanze legate all'aumento dell'ematocrito.

I dati disponibili supportano anche l'idea che la sintesi di EPO da parte del rene si sia evoluta come meccanismo di tolleranza immunitaria periferica in grado di proteggere l'organo stesso da risposte infiammatorie contro il microbioma urinario, l'alta concentrazione di antigeni ambientali e il sodio [62–65].

## BIBLIOGRAFIA

1. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activite hemopoietique des differents organeau au cours de la regeneration du sang. CR Searces Acad Sci 1906; 143:432-5.
2. Bunn HF. Erythropoietin. Cold Spring Harb Perspect Med 2013; 3(3):a011619.
3. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 2004; 25:577-83.
4. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA 2005, 293:90-5.
5. Cantarelli C, Angeletti A, Cravedi P. Erythropoietin, a multifaceted protein with innate and adaptive immune modulatory activity. Am J Transplant 2019; 19(9):2407-14. <https://doi.org/10.1111/ajt.15369>
6. Malik J, Kim AR, Tyre KA, et al. Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts. Haematologica 2013; 98:1778.
7. Broudy VC, Lin N, Brice M, et al. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. Blood 1991; 77(12):2583-90.
8. Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82(22):7580-4.
9. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1995; 313(6005):806-10.
10. US Food & Drug Administration. Information on Erythropoiesis-Stimulating Agents (ESA) Epoetin alfa (marketed as Procrit, Epogen), Darbepoetin alfa (marketed as Aranesp). <https://www.fda.gov/drugs/postmarket-drug-safety-information-patients-and-providers/information-erythropoiesis-stimulating-agents-esa-epoetin-alfa-marketed-procrit-epogen-darbepoetin>
11. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105(31):10925-30.
12. Chateauvieux S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. Biochem Pharmacol 2011; 82(10):1291-303.
13. Broxmeyer HE. Erythropoietin: multiple targets, actions, and modifying influences for biological and clinical consideration. J Exp Med 2013; 210(2):205-8.
14. Purroy C, Fairchild RL, Tanaka T, Baldwin WM, Manrique J, Madsen JC et al. Erythropoietin Receptor-Mediated Molecular Crosstalk Promotes T Cell Immunoregulation and Transplant Survival. J Am Soc Nephrol 2017; 28(8):2377-92.
15. Yuan R, Maeda Y, Li W, Lu W, Cook S, Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. PLoS One 2008; 3(4):e1924.
16. Nairz M, Schroll A, Moschen AR, Sonnweber T, Theurl M, Theurl I, et al. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. Immunity 2011; 34(1):61-74.
17. Cuzzocrea S, Mazzone E, di Paola R, Genovese T, Patel NS, Britti D, et al. Erythropoietin reduces the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. Arthritis Rheum 2005; 52(3):940-50.
18. Luo B, Gan W, Liu Z, Shen Z, Wang J, Shi R et al. Erythropoietin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. Immunity 2016; 44(2):287-302.
19. Cravedi P, Manrique J, Hanlon KE, Reid-Adam J, Brody J, Prathungsuk P, et al. Immunosuppressive effects of erythropoietin on human alloreactive T cells. J Am Soc Nephrol 2014; 25(9):2003-15.
20. Monguió-Tortajada M, Franquesa M, Sarrias M-R, Borràs FE. Low doses of LPS exacerbate the inflammatory response and trigger death on TLR3-primed human monocytes. Cell Death and Disease 2018; 9:499. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0520-2>
21. Prutchi Sagiv S, Lifshitz L, Orkin R, Mittelman M, Neumann D. Erythropoietin effects on dendritic cells: potential mediators in its function as an immunomodulator? Exp Hematol 2008; 36(12):1682-90. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.07.010>
22. Donadei C, Angeletti A, Cantarelli C, D'Agati V, et al. Erythropoietin inhibits SGK1-dependent Th17 cell induction and Th17 cell-dependent kidney disease. JCI Insight 2019; 4(10):e127428.
23. Cassis P, Gallon L, Benigni A, Mister M, Pezzotta A, Solini S, et al. Erythropoietin, but not the correction of anemia alone, protects from chronic kidney allograft injury. Kidney Int 2012; 81(9):903-18.
24. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Lamb KE, Gustafson SK, Samana CJ et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: kidney. Am J Transplant 2013; 13(S1):11-46.
25. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. J Physiol 2011; 589(6):1251-8.
26. Gill J, Shah T, Hristea I, Chavalitdhamrong D, Anastasi B, Takemoto SK, et al. Outcomes of simultaneous heart-kidney transplant in the US: a retrospective analysis using OPTN/UNOS data. Am J Transplant 2009; 9(4):844-52.
27. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest 2010; 120(6):1836-47.
28. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, et al. Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. Am J Kidney Dis 1991; 18(4 S1):14-9.
29. Martinez F, Kamar N, Pallet N, Lang P, Durrbach A, Lebranchu Y, et al. High dose epoetin beta in the first weeks following renal transplantation and delayed graft function: Results of the Neo-PDGF Study. Am J Transplant 2010; 10(7):1695-1700.

30. Lietz K, Lao M, Paczek L, Gorski A, Gaciong Z. The impact of pre-transplant erythropoietin therapy on late outcomes of renal transplantation. *Ann Transplant* 2003; 8:17-24.
31. Tsujita M, Kosugi T, Goto N, Futamura K, Nishihira M, Okada M, et al. The effect of maintaining high hemoglobin levels on long-term kidney function in kidney transplant recipients: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2018; 34(8):1409-16. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy365>
32. Choukroun G, Kamar N, Dussol B, Etienne I, Cassuto-Viguier E, Toupance O, et al. Correction of postkidney transplant anemia reduces progression of allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(2):360-8.
33. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(41):14907-12.
34. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* 1997; 90(5):1867-73.
35. Vaziri ND. Mechanism of erythropoietin-induced hypertension. *Am J Kidney Dis* 1999; 33(5):821-8.
36. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(8):4802-6.
37. Fokkema ML, Kleijn L, van der Meer P, Belonje AM, Achterhof SK, Hillege HL, et al. Long term effects of epoetin alfa in patients with ST- elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013; 27(5):433-9.
38. Zhang J, Zou YR, Zhong X, Deng HD, Pu L, Peng K, et al. Erythropoietin pretreatment ameliorates renal ischaemia-reperfusion injury by activating PI3K/Akt signalling. *Nephrology (Carlton)* 2015; 20(4):266-72.
39. Vaziri ND, Zhou XJ, Liao SY. Erythropoietin enhances recovery from cisplatin- induced acute renal failure. *Am J Physiol* 1994; 266(3 Pt 2):F360-366.
40. Kitamura H, Isaka Y, Takabatake Y, Imamura R, Suzuki C, Takahara S, et al. Nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects against tubulointerstitial injury in a unilateral ureteral obstruction model. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23(5):1521-8.
41. Elliott S, Tomita D, Endre Z. Erythropoiesis stimulating agents and reno- protection: a meta-analysis. *BMC Nephrol* 2017; 18(1):14.
42. Iwai M, Stetler RA, Xing J, Hu X, Gao Y, Zhang W, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury. *Stroke* 2010; 41(5):1032-7.
43. Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schrattenholz A, Sandberg M, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem* 2004; 91(4):900-10.
44. Yao XY, Wang DP, Li HY, Shen HT, Shu Z, Chen G. Erythropoietin treatment in patients with acute ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Current Drug Delivery* 2017; 14(6), 853-86.
45. Tsai TH, Lu CH, Wallace CG, Chang WN, Chen SF, Huang CR, et al. Erratum to: Erythropoietin improves long-term neurological outcome in acute ischemic stroke patients: a randomized, prospective, placebo-controlled clinical trial. *Crit Care* 2016; 20:78.
46. Sun J, Martin JM, Vanderpoel V, Sumbria RK. The Promises and Challenges of Erythropoietin for Treatment of Alzheimer's Disease. *Neuromolecular Med* 2019; 21(1):12-24. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08524-y>
47. Song J, Sun H, Xu F, Kang W, Gao L, Guo J, et al. Recombinant human erythropoietin improves neurological outcomes in very preterm infants. *Ann Neurol* 2016; 80(1):24-34.
48. Luo W, Hu L, Wang F. The protective effect of erythropoietin on the retina. *Ophthalmic Res* 2015; 53(2):74-81.
49. Colella P, Iodice C, Di Vicino U, Annunziata I, Surace EM, Auricchio A. Non-erythropoietic erythropoietin derivatives protect from light-induced and genetic photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* 2011; 20(11):2251-62.
50. He H, Wu T, Xiong J, Chen K, Mo Z. Effect of erythropoietin on the proliferation and apoptosis of neonatal porcine islet cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2010; 35(11):1115-22.
51. Choi D, Schroer SA, Lu SY, Wang L, Wu X, Liu Y, et al. Erythropoietin protects against diabetes through direct effects on pancreatic beta cells. *J Exp Med* 2010; 207(13):2831-42.
52. Lucas TS, Bab IA, Lian JB, Stein GS, Jazrawi L, Majeska RJ, et al. Stimulation of systemic bone formation induced by experimental blood loss. *Clin Orthop Relat Res* 1997; 340:267-75.
53. Rankin EB, Wu C, Khatri R, Wilson TL, Andersen R, Araldi E, et al. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. *Cell* 2012; 149(1):63-74.
54. Brines M, Patel NS, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(31): 10925-30.
55. Ueba H, Brines M, Yamin M, Umemoto T, Ako J, Momomura S, Cerami A, Kawakami M. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32):14357-1.
56. Van Rijt WG, Nieuwenhuijs-Moeke GJ, van Goor H, Jespersen B, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HG. ARA290, a non-erythropoietic EPO derivative, attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *J Transl Med* 2013; 11:9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-9>
57. Bitto A, Irrera N, Pizzino G, Pallio G, Mannino F, Vaccaro M, Arcoraci V, et al. Activation of the EPOR-β common

- receptor complex by cibinetide ameliorates impaired wound healing in mice with genetic diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2018; 1864(2):632-9.
58. Brines M, Dunne AN, van Velzen M, Proto PL, Ostenson CG, et al. ARA 290, a nonerythropoietic peptide engineered from erythropoietin, improves metabolic control and neuropathic symptoms in patients with type 2 diabetes. *Mol Med* 2014; 20:658-66. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00215>
59. Dahan A, Dunne A, Swartjes M, Proto PL, Heij L, Vogels O, et al. ARA 290 improves symptoms in patients with sarcoidosis-associated small nerve fiber loss and increases corneal nerve fiber density. *Mol Med* 2013; 19:334-45.
60. Heij L, Niesters M, Swartjes M, Hoitsma E, Drent M, Dunne A, et al. Safety and efficacy of ARA 290 in sarcoidosis patients with symptoms of small fiber neuropathy: a randomized, double-blind pilot study. *Mol Med* 2012; 18:1430-6.
61. O'Leary OE, Canning P, Reid E, Bertelli PM, McKeown S, Brines M, et al. The vasoreparative potential of endothelial colony-forming cells in the ischemic retina is enhanced by cibinetide, a non-hematopoietic erythropoietin mimetic, *Experimental Eye Research* 2019; 182:144-55. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.03.001>
62. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204(8):1775-85.
63. Rani A, Ranjan R, McGee HS, Andropolis KE, Panchal DV, et al. Urinary microbiome of kidney transplant patients reveals dysbiosis with potential for antibiotic resistance. *Transl Res* 2017; 181:59-70.
64. Ling Z, Liu F, Shao L, Cheng Y, Li L. Dysbiosis of the urinary microbiota associated with urine levels of proinflammatory chemokine interleukin-8 in female type 2 diabetic patients. *Front Immunol* 2017; 8:1032.
65. Liu F, Liu F, Ling Z, Xiao Y, Lv L, Yang Q, Wang B, Lu H, Zheng L, Jiang P, Wang W, Li L. Dysbiosis of urinary microbiota is positively correlated with type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget* 2017; 8(3):3798-810.