



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Control molecular de la eritropoyesis
Molecular control of erythropoiesis

Autor: Pablo Alija Piret

Directora: M. Dolores Delgado Villar

Santander, junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. ABREVIATURAS	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. HEMATOPOYESIS.....	6
4.1 LUGARES DE LA HEMATOPOYESIS	7
4.2 MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO	8
4.3 ORGANIZACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS.....	9
5. ERITROPOYESIS: ASPECTOS CELULARES	11
5.1 ERITROPOYESIS DURANTE EL DESARROLLO.....	11
5.2 PROGENITORES ERITROIDES.....	12
5.3 MADURACIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES	14
5.4 HEMOGLOBINA.....	15
6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXTRACELULARES	16
6.1 FACTORES DE CRECIMIENTO	16
6.2 SEÑALIZACIÓN POR ERITROPOYETINA	17
6.3 ERITROPOYESIS EN CONDICIONES BASALES	19
6.4 ERITROPOYESIS EN CONDICIONES DE ESTRÉS	20
7. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA ERITROPOYESIS.....	21
7.1 “CORE ERYTHROID NETWORK” (CEN).....	22
7.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN “MAESTROS”	24
7.3 REGULACIÓN DE LA ARN POLIMERASA II	24
7.4 <i>ENHANCERS</i> , CAMBIOS EPIGENÉTICOS y TADs	25
8. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ERITROIDES.....	28
8.1 GATA-1.....	28
8.2 GATA-2.....	29
8.3 GATA SWITCHING	30
8.4 TAL-1/SCL	32
8.5 KLF1	32
8.6 LDB1 y LMO2.....	35
8.7 c-MYB	36
8.8 FOG-1	38
9. PATOLOGÍA DE LA ERITROPOYESIS Y NUEVAS TERAPIAS.....	39
9.1 TALASEMIAS.....	39
9.1.1 Alfa talasemia	40
9.1.2 Beta talasemia	41
9.1.3 Nuevas terapias en talasemias	42
9.2 ANEMIA FALCIFORME.....	44
9.2.1 Nuevas terapias en anemia falciforme	45
9.3 POLICITEMIA VERA.....	46
9.3.1 Nuevas terapias en policitemia vera.....	47
10. CONCLUSIONES	49
11. BIBLIOGRAFÍA.....	50

1. RESUMEN

La eritropoyesis es el proceso de generación de eritrocitos, las células encargadas del transporte de oxígeno a los tejidos. Forma parte de la hematopoyesis, que genera las células sanguíneas con diferentes funciones: eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas. Todos estos linajes celulares derivan de una célula madre y la diferenciación hacia uno u otro linaje está finamente regulada a nivel molecular. La diferenciación eritroide se lleva a cabo de manera gradual, identificándose estadios celulares intermedios entre la célula madre y el eritrocito definitivo. Esta progresiva maduración está controlada a nivel molecular por factores de crecimiento y hormonas como la eritropoyetina, que activa diferentes vías de señalización que acaban activando factores de transcripción eritroides, tales como GATA-1, SCL o KLF-1. La eritropoyesis se regula también por mecanismos epigenéticos. La eritropoyesis está muy regulada, de manera que alteraciones en algún punto del proceso dan lugar a diferentes patologías tales como las talasemias, la anemia falciforme o la policitemia vera. Hasta hace poco tiempo, estas patologías eran tratadas de forma sintomática o con fármacos poco selectivos. Gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de las mismas, se han desarrollado terapias dirigidas mucho más eficaces para el tratamiento de estas enfermedades.

Palabras clave: Eritropoyesis, eritropoyetina, factores de transcripción eritroides, mecanismos epigenéticos, terapia dirigida.

ABSTRACT

Erythropoiesis is the process of generating erythrocytes, the cells responsible for transporting oxygen to tissues. It is part of hematopoiesis, which generates blood cells with different functions: erythrocytes, leukocytes, lymphocytes and platelets. All these cell lineages are derived from a stem cell and the differentiation towards one or the other lineage is tightly regulated at the molecular level. Erythroid differentiation is carried out gradually, and intermediate cell stages between the stem cell and the definitive erythrocyte can be identified. This progressive maturation is controlled at the molecular level by growth factors and hormones such as erythropoietin, which activates different signaling pathways that end up activating erythroid transcription factors, such as GATA-1, SCL or KLF-1. Erythropoiesis is also controlled by epigenetic mechanisms. Erythropoiesis is highly regulated, so that alterations at some point during the process give rise to different pathologies such as thalassemias, sickle-cell anemia or polycythemia vera. Until recently, these disorders were treated symptomatically or with non-selective drugs. Thanks to the knowledge of the molecular mechanisms involved in these pathologies, much more effective targeted therapies have been developed for the treatment of these diseases.

Key words: Erythropoiesis, erythropoietin, erythroid transcription factors, epigenetic mechanisms, targeted therapies.

2. ABREVIATURAS

3C:	Tecnología de captura de conformación del cromosoma
Alas2:	5'-aminolevulinato sintetasa
BCL-11A:	B-Cell Lymphoma/Leukemia 11A
BCL-xL:	B-Cell Lymphoma Extra Large
BFU-E:	Burst-forming Unit Erythrocyte
BMP4:	Bone Morphogenetic Protein 4
BRD2:	Bromodomain and Extraterminal Motif Protein 2
CAMs:	Cell Surface and Extracellular matrix ligands for adhesion molecules
CBP/p300:	CREB Binding Protein
CDK α :	Cycline Dependent Kinase α
CEN:	Core Erythroid Network
CFU:	Colony forming Unit
CFU-BASO:	Basophil
CFU-E:	Erythrocyte
CFU-EO:	Eosinophil
CFU-GEMM:	Granulocyte-Erythrocyte.Monocyte-Megakaryocyte
CFU-GM:	Granulocyte-Macrophage
CFU-L:	Lymphocyte
CFU-MEG:	Megakaryocyte
CLP:	Common lymphoid progenitor
CMP:	Common myeloid progenitor
CRISPR:	Clustered Regulatory Interspersed Short Palindromic Repeat
CTBP:	Targeting of C-Terminal Binding Protein
CTCF:	Factor de Unión a CCCTC
CTD:	C-Terminal Domain
DNMT1:	ADN Metiltransferasa 1
DSIF:	DRB Sensitivity Inducing Factor
EMP:	Erythroid Myeloid Progenitors
EPO:	Eritropoyetina
FOG1:	Friend Of GATA 1
G1HE:	GATA-1 Hematopoietic Enhancer
G2EHRD:	GATA-2 Early Hematopoietic Regulatory Domain
GATA-1:	GATA Binding Protein 1
GFI-1B:	Growth Factor Independent 1B
GMP:	Granulocyte-monocyte progenitors
Grb2:	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
HbA:	Hemoglobina Adulta
HBB:	Hemoglobin Subunit Beta
HBD:	Hemoglobin Subunit Delta
HBE1:	Hemoglobin Subunit Epsilon 1
HbF:	Hemoglobina fetal
HBG:	Hemoglobin Subunit Gamma
HbH:	Hemoglobina H
HDACs:	Histone Deacetilases
HIF:	Hypoxia Inducible Factor
HMIP-2:	HBS1L-MYB Intergenic Polymorphism Block 2
HRD:	Hematopoietic Regulatory Domain

IGF:	Insulin Growth Factor
JAK2:	Janus Kinasa 2
KLF1:	Krüppel-like Factor 1
LCR:	Locus Control Region
LDB1:	LIM Domain Binding Protein 1
LDH:	Lactato Deshidrogenasa
LMO2:	LIM Domain Only 2
LMPP:	Lymphoid-primed multipotent progenitor
lncARN:	long non coding ARN
LT-HSC:	Long-term Hematopoietic Stem Cells
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinases
MCH:	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCV:	Mean Corpuscular Volume
MEP	Progenitor eritro-mieloide
miARN:	micro ARN
MPP:	Multipotent progenitor
MYB:	v-myb: avian MYeloBlastosis viral oncogene
NELF:	Negative Elongation Factor
NFE2:	Nuclear Factor Erythroid 2
NuRD:	Nucleosome Remodeling Deacetylase
PI3K:	Phosphoinositol 3 kinase
PKB:	Protein Kinase B
PLC- γ :	Phospholipase gamma
Pol II:	RNA Polimerasa II
pRB:	Retinoblastoma Protein
p-TEFb:	Positive Transcription Elongation Factor B
Sca-1:	Stem Cell Antigen 1
SCF:	Stem Cell Factor
SHP-1:	Phosphotirosine Phosphatase
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism
SOS:	Son Of Sevenless
STAT-5:	Signal Transducer and Activator of Transcription 5
ST-HSC:	Short-term Hematopoietic Stem Cells
TAD:	Topologically Associated Domain
TAL-1:	T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia 1
TGF-alfa:	Transforming Growth Factor Alfa
TGF-beta:	Transforming Growth Factor Beta
TIF-1:	Transcription Intermediary Factor
TSS:	Transcription Starting Site

3. INTRODUCCIÓN

La eritropoyesis es el proceso de generación de eritrocitos, las células encargadas del transporte de oxígeno a los tejidos. Forma parte de la hematopoyesis, proceso mediante el que se generan todas las células sanguíneas con diferentes funciones: eritrocitos, leucocitos, linfocitos y plaquetas. Todos estos linajes celulares derivan en última instancia de una célula madre, por lo que la diferenciación hacia uno u otro linaje está finamente regulada a nivel celular y molecular mediante factores de crecimiento, factores de transcripción y otros mecanismos.

En este trabajo se revisará el funcionamiento y mecanismos implicados en el control molecular de la eritropoyesis. Comenzaremos describiendo a grandes rasgos el proceso de la hematopoyesis, los lugares en los que tiene lugar a lo largo del tiempo y las células implicadas en el mismo, así como su organización a partir de las células madre hasta las células maduras definitivas. A continuación, entraremos a detallar la eritropoyesis desde un punto de vista celular, deteniéndonos a analizar diferentes aspectos de la misma: sus diferentes fases a lo largo del desarrollo; las diferentes células que participan en el proceso, describiendo sus características morfológicas y funcionales más importantes; el proceso de maduración desde la célula madre hasta el eritrocito maduro y finalmente, haremos una breve introducción acerca de la hemoglobina, la molécula encargada de transportar el oxígeno en el eritrocito.

La regulación de la diferenciación de las células del linaje eritroide corre a cargo de varios factores de crecimiento, siendo Stem Cell Factor (SCF) y eritropoyetina (EPO) los más importantes. Al unirse a su receptor, la EPO activa varias rutas de señalización intracelular que, en última instancia, y gracias a la interacción con ciertos factores de transcripción, estimulan la expresión de genes relacionados con la eritropoyesis.

Los factores de transcripción esenciales para la eritropoyesis son GATA-1, SCL, TAL1, LMO2, LDB1, KLF-1 y GFI-1B, aunque participan muchos más. Estos factores se organizan en un complejo denominado CEN (“Core Erythroid Network”), cuyo funcionamiento está finamente regulado por SCF y EPO entre otros, para asegurar un adecuado desarrollo de los eritrocitos. Además, el proceso de transcripción está regulado a un nivel superior, en el que participan las secuencias amplificadoras o *enhancer*, los cambios epigenéticos y dominios asociados topológicamente (TADs). En el siguiente apartado estudiaremos en detalle los factores de transcripción anteriormente mencionados, desde un punto de vista tanto estructural como funcional, y prestando especial atención a las relaciones que se forman entre ellos, como el citado CEN.

Finalmente, concluiremos el trabajo con una breve exposición de algunas patologías de la eritropoyesis, y algunas nuevas terapias que están ya comercializadas o en proceso de investigación, dirigidas específicamente a estas patologías eritropoyéticas, gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes que generan la enfermedad.

4. HEMATOPOYESIS

La sangre es uno de los tejidos más regenerativos de nuestro organismo, pues produce unos diez billones de células nuevas cada día para mantener los niveles de células sanguíneas constantes. La hematopoyesis se organiza como una jerarquía celular derivada de un precursor común, la célula madre hematopoyética (Doulatov *et al*, 2012).

La producción de células sanguíneas durante la vida del organismo tiene lugar en el tejido hematopoyético. Éste requiere un elevado nivel de reemplazamiento celular, debido al limitado período vital de las diferentes células sanguíneas. Los eritrocitos sobreviven una media de 120 días, mientras que los granulocitos solamente lo hacen unas pocas horas; esto significa que para mantener los niveles de células sanguíneas constantes, se deben producir cada día 10^{13} células nuevas (Hoffbrand *et al*, 2014).

En la médula ósea, que es el principal lugar hematopoyético en humanos adultos, se encuentran células en diferentes etapas de desarrollo (Figura 1). Las células menos abundantes e indistinguibles morfológicamente son las células madre. Éstas se diferencian a progenitores multipotentes que, a su vez, darán lugar a precursores comprometidos a un linaje. A medida que observamos etapas más tempranas del desarrollo, las células son morfológicamente menos diferenciadas y menores en número. Es posible reconocer células en estadíos de maduración intermedios tales como mieloblastos, mielocitos, metamielocitos, etc. Finalmente, en las etapas más avanzadas, se pueden reconocer células maduras pertenecientes a los principales linajes hematopoyéticos (eritrocitos, granulocitos, monocitos/macrófagos, megacariocitos, eosinófilos, basófilos, y linfocitos T y B).

Las células madre van a dar lugar a todos los linajes celulares gracias al proceso de la división celular. La célula madre se divide dando lugar a otra célula madre (para mantener la reserva de células madre) y a una célula diferenciada que será el progenitor de cada uno de los linajes celulares.

Además del propio tejido hematopoyético, la médula ósea contiene células madre mesenquimales, responsables de la formación del microambiente hematopoyético, el cual no ofrece simplemente un apoyo mecánico al parénquima, sino que es considerado un componente esencial en el funcionamiento a largo plazo de la médula ósea (Hoffbrand *et al*, 2014).

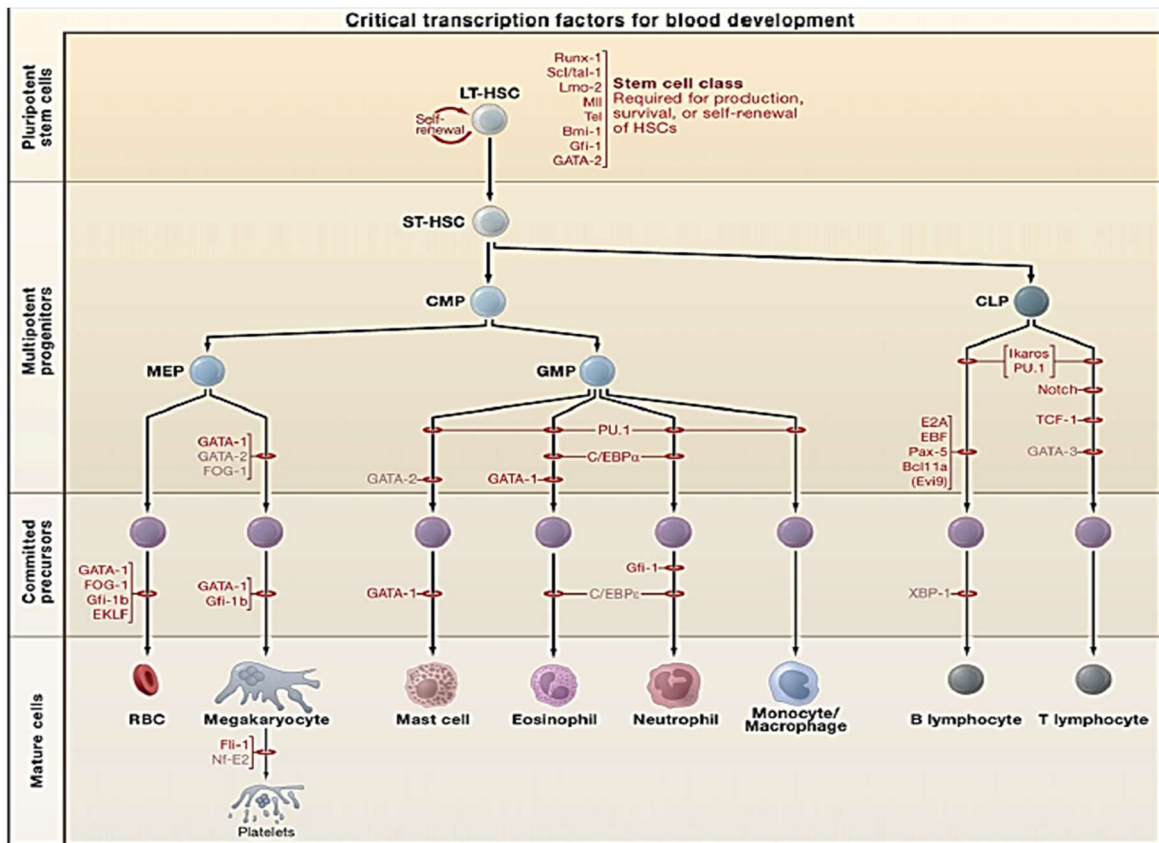


Figura 1. Visión general de la hematopoyesis. En la figura podemos reconocer las diferentes etapas de maduración hematopoyética de los diferentes linajes celulares. En concreto, para la estirpe eritroide identificamos la LT-HSC como célula madre pluripotente; a continuación, ST-HSC, CMP y MEP son los progenitores multipotentes; BFU-E y CFU-E serían los primeros precursores comprometidos en el linaje eritroide (no aparecen en la figura); y finalmente, las células maduras son los eritrocitos o RBC. La figura también muestra los principales factores de transcripción implicados en el control de la diferenciación hematopoyética. LT-HSC: Long-term Hematopoietic Stem Cells (Células madre hematopoyéticas de largo plazo); ST-HSC: Short-term Hematopoietic Stem Cells (Células madre hematopoyéticas de corto plazo); CMP: Common Myeloid Progenitor (Progenitor mieloide común); MEP: Megakaryocyte-erythroid Progenitor (Progenitor megacariocítico-eritroide); BFU-E: Burst-forming Unit Erythrocyte (Unidades formadoras primitivas eritrocíticas); CFU-E: Colony-forming Unit Erythrocyte (Unidad formadora de colonias eritrocíticas); RBC: Red Blood Cells (Eritrocitos maduros) (Orkin & Zon, 2008).

4.1 LUGARES DE LA HEMATOPOYESIS

Durante el desarrollo embrionario, los sitios de la hematopoyesis van cambiando desde el embrión hasta el adulto, reconociéndose tres etapas: 1) mesoblástica, 2) hepática y 3) medular (Figura 2).

Fase mesoblástica: Durante muchos años se pensó que toda la hematopoyesis se originaba en los islotes sanguíneos del mesodermo extraembrionario del saco vitelino. Sin embargo, se demostró que solo los eritroblastos se desarrollan en el saco vitelino, mientras que las células madre hematopoyéticas surgen de una fuente intraembrionaria cerca de la aorta (Rodak, 2004).

Así pues, existe una cierta controversia acerca de la ontogenia de las células madre hematopoyéticas, pero independientemente de que se originen en el saco vitelino o en la región aorta-gonadal-mesonefros éstas células

colonizarán el hígado fetal en torno a la semana 4-5 de gestación, donde se expandirán y madurarán, y colonizarán a su vez el bazo y la médula ósea (Ciriza *et al*, 2013). Ésta es la llamada fase hepática de la hematopoyesis.

En torno al quinto mes de gestación comienza la fase medular de la hematopoyesis, convirtiéndose la médula, a partir del sexto mes, en el principal lugar de la hematopoyesis (Rodak, 2004). En el momento del nacimiento, la actividad hematopoyética está distribuida a través del esqueleto humano, pero a medida que el organismo crece, los principales sitios de la hematopoyesis se ven reducidos a esternón y pelvis, y en menor medida a costillas, cráneo y vértebras. Además, un pequeño número de células madre están presentes en la circulación de adultos normales (Rodak, 2004).

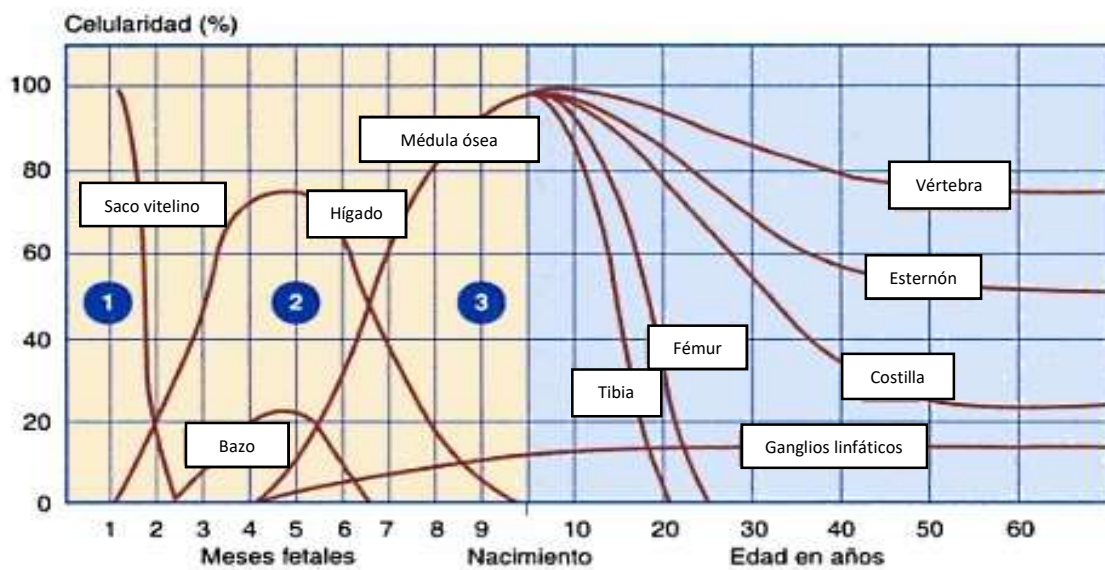


Figura 2. Lugares y fases de la hematopoyesis a lo largo del desarrollo (Rodak, 2004)

4.2 MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO Y MOVIMIENTO DE CÉLULAS MADRE

La migración de la hematopoyesis de un lugar a otro sugiere la existencia de unas condiciones específicas que determinan la secuencia de colonización (Hoffbrand *et al*, 2014).

El microambiente en la médula ósea cumple un papel importante en la diferenciación y proliferación de las células madre hematopoyéticas. Las necesidades satisfechas por el microambiente son:

1. Atmósfera con predominio de CO₂.
2. Superficie húmeda y adherente a la cual fijarse (formada por células del estroma, y osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, miocitos, células endoteliales, células dendríticas y macrófagos).
3. Una población normal de células de la médula roja necesaria para la interacción celular.

Este ambiente proporciona sostén, factores de crecimiento, citocinas y moléculas de matriz extracelular que ayudan en la regulación de la hematopoyesis (Rodak, 2004).

La capacidad de las células madre de moverse por el organismo y buscar lugares apropiados para la hematopoyesis está demostrada por el “homing” de células madre trasplantadas hacia la médula ósea, y la movilización de células madre hacia la circulación sanguínea inducida por citocinas y quimioterapia (Hoffbrand *et al*, 2014).

Son los gradientes de quimiocinas a través de la barrera endotelial los que inducen a las células madre a migrar de un sitio a otro. Una vez que las células madre han llegado a la médula ósea, las células estromales producen una serie de sitios de reconocimiento en su superficie para las células madre, como las CAMs (Cell Surface and extracelular matrix ligands for adhesion molecules). Por su parte, las células madre y progenitoras expresan diferentes clases de moléculas de adhesión, como selectinas e integrinas (Hoffbrand *et al*, 2014).

La movilización celular hacia la corriente sanguínea, también está mediada por citocinas, que en este caso incrementan la expresión de metaloproteinasas, liberan SCF e inducen a las células madre a migrar a través de la barrera endotelial.

4.3 ORGANIZACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es un proceso jerárquico en el que células madre multipotentes dan lugar a células progenitoras específicas de linaje, que se dividirán para generar las células sanguíneas maduras (Figura 1).

4.3.1 Células madre

Morfológicamente, estas células son indiferenciadas y se parecen a pequeños linfocitos. Una gran parte de ellas se mantienen quiescentes, en fase G₀ del ciclo celular, gracias a la acción del TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), expresado por las células estromales, el cual impide la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular.

Inmunofenotípicamente, las células madre se caracterizan por expresar marcadores CD34 y Thy-1; y por la ausencia de otros como CD33, CD38, o marcadores específicos de linaje. El marcador mejor conocido es el CD34, presente también en las células progenitoras, cuya función está relacionada con los procesos de adhesión y señalización celular.

La división de las células madre tiene la particularidad de la autorrenovación, lo que quiere decir que aproximadamente la mitad de las células hijas no se diferencia, sino que persiste como célula madre, manteniendo una reserva de las mismas (Figura 3). Existen varios modelos de división de las células madre:

1. División celular asimétrica: cada célula madre da lugar a otra célula madre, y a una célula diferenciada.

2. División celular simétrica: Un grupo de células madre produce únicamente células madre al dividirse, y otro grupo de células madre da lugar a células diferenciadas.

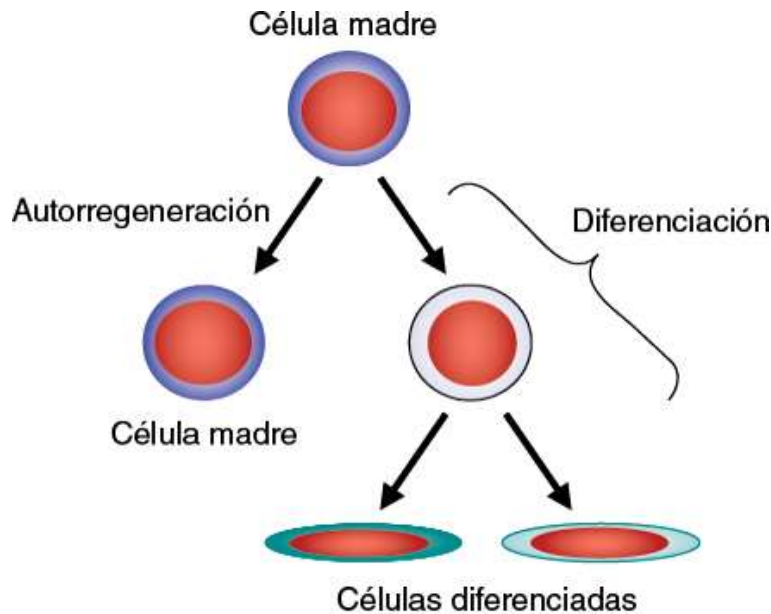


Figura 3. Proceso de autorregeneración y diferenciación en las células madre (Longo *et al*, 2012)

Así pues, la mitad de las células hijas se diferenciarán cada vez más para dar lugar a los diferentes tipos de células sanguíneas. El mecanismo mediante el cual estas células siguen una determinada vía o linaje celular es un mecanismo molecular basado en el control transcripcional de genes específicos de linaje (Hoffbrand *et al*, 2014).

4.3.2 Células progenitoras

Las células progenitoras son descendientes de las células madre. A medida que avanza el proceso de diferenciación hematopoyético, la capacidad de autorrenovación disminuye y aumenta la de diferenciación, aunque no se sabe con certeza cuál es la etapa concreta en la que se pierde definitivamente esta capacidad de autorrenovación, tan característica de las células madre (Hoffbrand *et al*, 2014).

Las características morfológicas generales de la maduración celular son una reducción global del tamaño celular y una disminución de la relación entre núcleo y citoplasma, así como otros cambios más específicos como pérdida del nucléolo, condensación de cromatina, posible aparición de gránulos en el citoplasma, etc (Rodak, 2004).

Según la nomenclatura sugerida por Till y McCulloch (Till & McCulloch, 1961), las células progenitoras se denominan CFU (Colony-Forming Units). Las más precoces son CFU-L, que dará lugar a toda la línea linfóide, y CFU-GEMM, que dará lugar a eritrocitos, granulocitos, megacariocitos y monocitos. Siguiendo la línea mieloide, encontramos luego CFU-GM, CFU-MEG, CEF-EO, CEF-BASO y BFU-E/CFU-E.

Estas células progenitoras cada vez son más restrictivas en cuanto al tipo celular final que pueden producir.

4.3.3 Células sanguíneas maduras

Durante el proceso de diferenciación, las células conservan cierta capacidad de división celular, que finalmente pierden debido a diversas causas: pérdida del núcleo (eritrocitos), fragmentación (plaquetas), o distorsión nuclear (polimorfonucleares granulocíticos). Sin embargo, los linfocitos maduros poseen un núcleo monomórfico y mantienen la capacidad de división. La hematopoyesis produce unos 10 tipos celulares distintos; los productos finales del proceso de hematopoyesis son células con funciones altamente específicas en el organismo (Hoffbrand *et al*, 2014).

5. ERITROPOYESIS: ASPECTOS CELULARES

5.1 ERITROPOYESIS DURANTE EL DESARROLLO

Durante el desarrollo embrionario, la eritropoyesis en los mamíferos se produce en 3 olas o períodos distintos (Figura 4) (Nandakumar *et al*, 2016).

La primera ola tiene lugar en el saco vitelino, con el desarrollo de los primeros progenitores comprometidos con el linaje eritroide, los eritroblastos primitivos (Barminko *et al*, 2016). Estas células primitivas se caracterizan por la expresión de genes de globinas embrionarias. Además, aunque en un principio se suponía que los eritroblastos primitivos no eran capaces de enuclearse, se ha comprobado que finalmente estas células pierden el núcleo tanto en ratones como en humanos (Nandakumar *et al*, 2016). La estrecha relación espacial y temporal entre eritroblastos primitivos y células endoteliales en el saco vitelino hizo surgir la hipótesis hace casi 100 años de que ambos surgían del progenitor común denominado hemangioblasto (Barminko *et al*, 2016).

La segunda ola eritropoyética se caracteriza por la formación de progenitores eritro-mieloides (EMP) en el saco vitelino sobre el día embrionario 8.25 en ratones. Éstos pueden generar colonias eritroides similares a aquellas derivadas de la médula ósea adulta, y muestran la capacidad de producir otros linajes mieloides, además del eritroide (Nandakumar *et al*, 2016). En el día embrionario 10.5, los EMP colonizan el hígado fetal para dar lugar a los eritroblastos definitivos, caracterizados por expresar genes de globinas adultas (Nandakumar *et al*, 2016; Barminko *et al*, 2016).

Finalmente, la tercera ola consiste en la producción de células madre hematopoyéticas a partir del endotelio hemogénico, presente en la región aorta-gónada-mesonefros, y en arterias de las regiones umbilical, vitelina, craneal y placentaria. Este proceso tiene lugar aproximadamente el día embrionario 10.5. Estas células migran al hígado fetal antes de colonizar su destino final, la médula ósea. Tradicionalmente se pensaba que la migración hacia la médula ósea ocurría cerca del nacimiento, pero se ha observado que esta colonización medular puede verse casi al mismo tiempo que la invasión hepática fetal, en torno al día embrionario 15 en ratones. El estudio de la eritropoyesis primitiva en humanos es difícil, ya que surge hacia los días 16-17 del desarrollo, demasiado

temprano para ser accesible para su estudio (Nandakumar *et al*, 2016; Barminko *et al*, 2016).

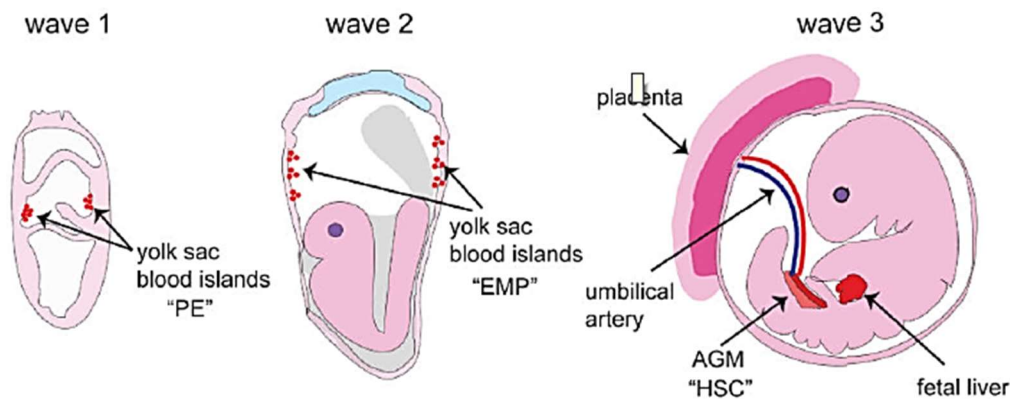


Figura 4. Representación de las tres olas del desarrollo de la eritropoyesis en mamíferos. La primera ola se caracteriza por el surgimiento de los proeritroblastos primitivos que expresan las globinas embrionarias en el saco vitelino. En la segunda ola, el MEP (Myeloid-Erythroid Progenitor) surge del saco vitelino y migra al hígado fetal, produciendo los eritroblastos definitivos, expresando predominantemente globinas adultas. Finalmente, en la tercera ola, la HSC (Hematopoietic Stem Cell) emerge del endotelio hemogénico en el mesonefros aorto-gonadal, y migra al hígado fetal y eventualmente a la médula ósea adulta, produciendo los eritroblastos definitivos (Nandakumar *et al*, 2016).

5.2 PROGENITORES ERITROIDES

Las células madre hematopoyéticas pertenecen a un grupo celular caracterizado por carecer de marcadores de superficie específicos, y por expresar Sca-1 y c-Kit (LSK) (Barminko *et al*, 2016). Se pueden diferenciar dos tipos de células madre hematopoyéticas en función del tiempo que necesitan para dar lugar a una recuperación hematopoyética completa después de su trasplante en huéspedes irradiados. De esta forma distinguimos las células madre hematopoyéticas de corto plazo (ST-HSC) y las de largo plazo (LT-HSC) (Barminko *et al*, 2016).

La producción de progenitores eritro-mieloides a partir de células madre se ha explicado hasta la actualidad a través del modelo clásico, pero recientemente ha surgido un nuevo modelo alternativo (Figura 5). El modelo clásico se basa en la existencia de una célula denominada progenitor multipotente (MPP), que pertenece también a la población LSK. Esta célula da lugar al progenitor linfoide común (CLP) y al progenitor mieloide común (CMP), el cual dará lugar, a su vez, al progenitor eritro-mieloide (MEP) (Barminko *et al*, 2016). En este modelo clásico, la eritropoyesis se basa en la diferenciación progresiva de progenitores hematopoyéticos cada vez más restringidos hacia el linaje eritroide (Dulmovits *et al*, 2017).

En el modelo alternativo, el CMP surge directamente de la célula madre (ST-HSC). Además, en este modelo se observa otro tipo celular, el progenitor multipotente linfoide dirigido (LMPP). Esta célula surge de la ST-HSC y da lugar al CLP y al GMP (Barminko *et al*, 2016).

Hematopoietic Hierachy

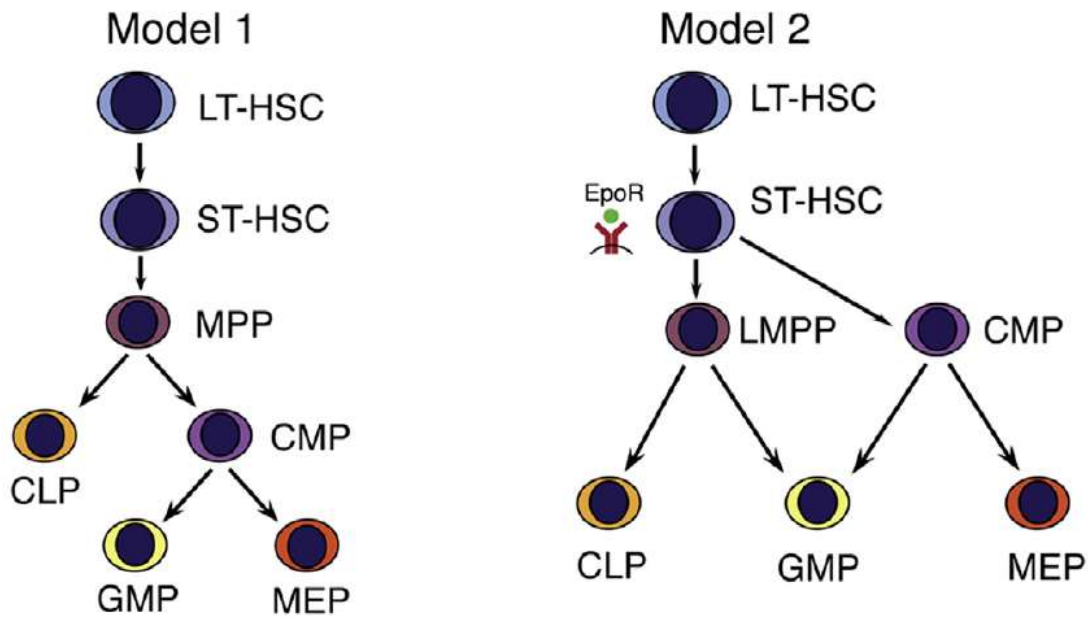


Figura 5. Modelo de jerarquía celular hematopoyética. En el modelo 1, la jerarquía se divide a nivel de la MPP, que da lugar a CLP y CMP. A su vez el CMP da lugar al MEP. En el modelo 2, el CMP (y por tanto el MEP) se forma directamente a partir del ST-HSC. Otra diferencia es la existencia del LMPP, que produce GMP y CLP. En este caso, el GMP procede tanto de los LMPP como de los CMP. LT-HSC: Long-term Hematopoietic Stem Cell; ST-HSC: Short-term Hematopoietic Stem Cell; MPP: Multipotent Progenitor; CLP: Common Lymphoid Progenitor; CMP: Common Myeloid Progenitor; GMP: Granulocyte Monocyte Progenitor; MEP: Myeloid Erythroid Progenitor (Barminko *et al*, 2016).

La caracterización inmunofenotípica de los MEP carece de consenso actualmente. Así, por ejemplo, se pueden caracterizar como $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{mid}} \text{CD45RA}^- \text{FLT3}^- \text{MPL}^+ \text{CD36}^- \text{CD41}^-$ (Sanada *et al*, 2016). Sin embargo, existen otras estrategias para la selección inmunofenotípica de estas células, lo cual revela su gran heterogeneidad.

Los primeros progenitores eritroides específicos son las células BFU-E (Burst-Forming Unit erythroid) y las células CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid) (Figura 6). Se llaman así por su capacidad para formar colonias en medios semisólidos. El BFU-E es el más precoz, y puede formar colonias mayores que el CFU-E (Nandakumar *et al*, 2016).

Los BFU-E responden a diversas señales: EPO (eritropoyetina), SCF (Stem cell factor), IGF1 (Insulin growth factor 1), corticosteroides, IL-3 e IL-6 (Interleukina 3 y 6) (Barminko *et al*, 2016). La identidad inmunofenotípica de estas células en los humanos corresponde al siguiente patrón: $\text{IL-3R}^- \text{GPA}^- \text{CD34}^+ \text{CD36}^-$ (Dulmovits *et al*, 2017).

Por su parte, los CFU-E dependen de la EPO para su supervivencia, también responden al SCF, pero no a los corticosteroides (Barminko *et al*, 2016). Respecto a su inmunofenotipo, los CFU-E se caracterizan por: $\text{IL-3R}^- \text{GPA}^- \text{CD34}^- \text{CD36}^+$ (Dulmovits *et al*, 2017).

5.3 MADURACIÓN DE CÉLULAS ERITROIDES

La diferenciación eritroide terminal tiene lugar en los denominados islotes eritroblásticos, que consisten en un macrófago central rodeado de hasta 30 células eritroides en distintos estadios de maduración.

Los progenitores eritroides (BFU-E y CFU-E) actúan como nexo entre la célula madre hematopoyética y las células más maduras, generando programas moleculares que controlan la función de los eritroblastos terminales. Los eritroblastos terminales están en gran medida preprogramados, y a medida que las células entran en las últimas etapas de diferenciación eritroide, van disminuyendo su capacidad de proliferación y autorrenovación (Dulmovits *et al*, 2017).

La transición de CFU-E a proeritroblasto se acompaña de la pérdida de expresión de c-KIT y la ganancia de Ter119. Una vez que el CFU-E se compromete con la diferenciación, prolifera rápidamente y es fuertemente dependiente de EPO, lo que inicia la expresión de genes eritroides específicos que protegen contra la apoptosis (Barminko *et al*, 2016).

El precursor eritroide que se puede identificar más precozmente morfológicamente es el proeritroblasto, que se diferenciará posteriormente a eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo y eritroblasto ortocromático, que finalmente, al enuclearse, dará lugar al reticulocito (Figura 6). Estos precursores muestran una reducción progresiva de tamaño celular y nuclear, al mismo tiempo que sufren una gran acumulación de hemoglobina (Nandakumar *et al*, 2016).

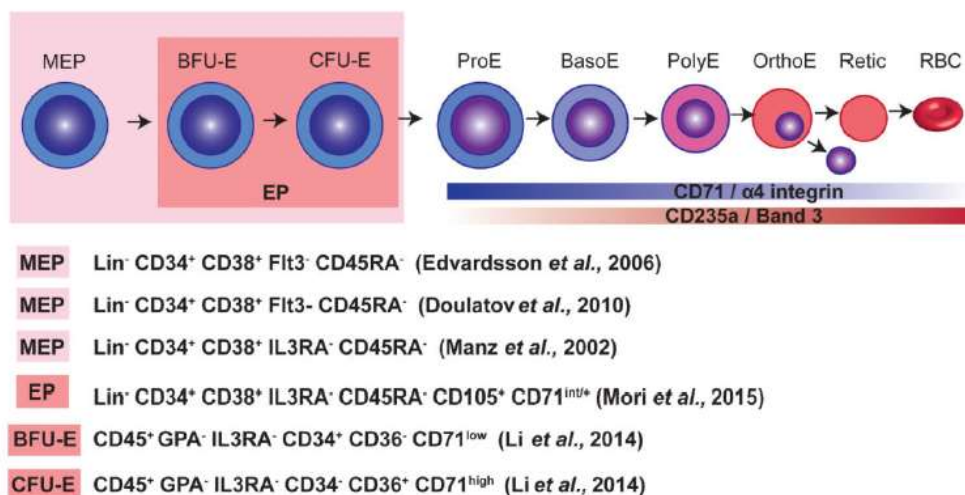


Figura 6. Etapas madurativas desde el MEP (progenitor eritro-mieloide) hasta la célula sanguínea madura. Se muestran las estrategias inmunofenotípicas usadas para aislar estas células (Nandakumar *et al*, 2016).

El proeritroblasto sufre tres mitosis, generando secuencialmente 2 eritroblastos basófilos, 4 policromatófilos, 8 ortocromáticos y 16 reticulocitos. Los eritrocitos completamente diferenciados contienen una red citoesquelética muy especializada que está unida a la membrana plasmática. Esta red permite al

eritrocito soportar grandes deformaciones sin perder su integridad estructural, y le confiere su forma de disco oval bicóncavo. Los principales componentes de la misma son la espectrina, actina, proteína 4.1R, adducina, dematina, tropomiosina y tropomodulina (Barminko *et al*, 2016). Mutaciones que alteren esta red, directa o indirectamente, pueden causar anemia, un ejemplo sería la anemia falciforme (Ver apartado 9.2).

5.4 HEMOGLOBINA

La principal función de la célula eritroide es la producción de hemoglobina, la molécula responsable del transporte de oxígeno por la sangre en el interior de los eritrocitos. La hemoglobina es un tetrámero formado por 2 globinas tipo alfa y 2 globinas tipo beta con un anillo porfirínico que contiene hierro, denominado grupo hemo, unido a cada subunidad.

Existen 3 tipos de hemoglobinas a lo largo del desarrollo: la hemoglobina embrionaria, la fetal y la adulta. La expresión secuencial de ellas a lo largo de la vida tiene lugar a través de los denominados “haemoglobin switches”, que consisten básicamente en cambios en la expresión de los genes de las beta-globinas (Nandakumar *et al*, 2016; Hoffbrand *et al*, 2014).

Hay 5 genes que codifican para las beta-globinas: embrionarios (*HBE1*), fetales (*HBG1*, *HBG2*), y adultos (*HBD* y *HBB*). Inicialmente hay un cambio de la expresión predominante de globinas embrionarias (*HBE1*) a la expresión de globinas fetales (*HBG1*, *HBG2*) que coincide con el comienzo de la eritropoyesis definitiva. Luego, después del nacimiento también se produce un cambio de la expresión de globinas fetales a la expresión de globinas adultas (Figura 7). En cuanto a las alfa globinas, existen 3 genes principales: *HBZ*, *HBA1* y *HBA2*. La globina embrionaria *HBZ* se expresa de forma prácticamente exclusiva en células eritroides primitivas, mientras que las globinas adultas (*HBA1*, *HBA2*) se expresan en todas las etapas de la eritropoyesis (Nandakumar *et al*, 2016).

En cuanto a la regulación molecular de este proceso, el regulador transcripcional *BCL11A* fue identificado como un regulador clave en el cambio de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta. Se sabe que *BCL11A* se une al promotor del gen de la beta-globina, aunque es desconocido el mecanismo exacto mediante el cual se produce el silenciamiento de la expresión de HbF (Hoffbrand *et al*, 2014). El factor de transcripción *MYB* también ha sido identificado como regulador de los niveles de HbF, ya que la disminución de este factor se relaciona con la inducción de la producción de HbF, aunque su mecanismo de acción es aún desconocido (Nandakumar *et al*, 2016). Numerosos estudios se han centrado en entender las bases moleculares del cambio de hemoglobina fetal a adulta, dada su importancia terapéutica. Hay evidencia clínica de que la producción elevada de HbF reduce la severidad de ciertas patologías eritropoyéticas como la beta-talasemia y la anemia falciforme (Ver apartado 9).

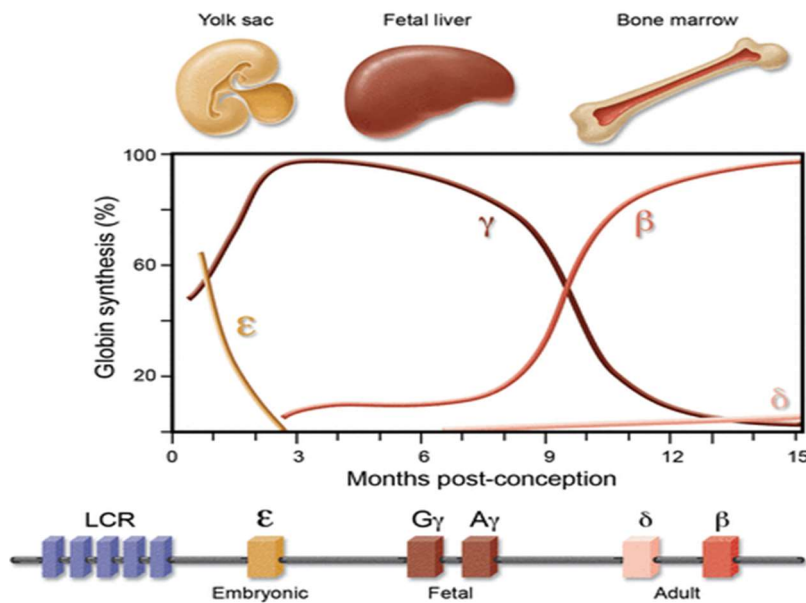


Figura 7. Los genes de las beta globinas están codificados en una agrupación genética y bajo un estricto control de la regulación. Hay 2 cambios en la expresión genética de esta agrupación, de embrionaria a fetal durante el primer trimestre de gestación, y de fetal a adulta en torno al nacimiento (Bauer et al, 2012).

6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EXTRACELULARES

6.1 FACTORES DE CRECIMIENTO

La eritropoyesis está regulada a varios niveles que incluyen factores extracelulares (ej. factores de crecimiento) e intracelulares (ej. factores de transcripción). En este apartado revisaremos las principales vías de señalización extracelular con especial foco en la eritropoyetina y en la regulación de la eritropoyesis en condiciones basales y de estrés.

Existen diferentes tipos de factores de crecimiento que regulan el desarrollo de los progenitores eritroides, actuando frecuentemente de forma sinérgica. Los más importantes son SCF (Stem Cell Factor), que es el ligando del receptor c-KIT, y EPO (eritropoyetina). Además de ellos, participan otros factores como TGF-alfa, IGF1, o IL-3. Sin embargo, únicamente SCF y EPO son los factores necesarios para el desarrollo de los progenitores eritroides en mamíferos. Esto se puede comprobar en aquellos ratones que carecen de receptor de EPO, o cuyo receptor de SCF está mutado, los cuales exhiben anemias severas y defectos variables en los progenitores eritroides. Sin embargo, la eritropoyesis permanece inalterada en la ausencia de otros factores como la IL-3 (Dulmovits et al, 2017).

La eritropoyetina (EPO) es el principal regulador de la eritropoyesis. EPO estimula la eritropoyesis, promoviendo la supervivencia, proliferación y diferenciación terminal de los CFU-E y eritroblastos más maduros. Esta hormona es sintetizada fundamentalmente a nivel del riñón, para ejercer su efecto de forma endocrina sobre las células eritroides en desarrollo en la médula ósea. EPO se une a su receptor, el cual activa la Janus-Kinasa 2 (JAK2), que a su vez

activa al factor de transcripción STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5). Éste, junto a otros factores de transcripción, TAL1, GATA1 o KLF1 (denominados reguladores maestros, ver apartado 7), se une a promotores de genes específicos para dirigir la diferenciación eritroide a través de programas de expresión genética que culminan en la expresión de genes de globinas y enucleación de las células eritroides (Perreault & Venters, 2018).

SCF se une al receptor c-KIT, que es un receptor con actividad tirosín-kinasa. SCF puede actuar de forma sinérgica con EPO promoviendo la eritropoyesis. Además, SCF puede indirectamente fosforilar el receptor de EPO a través del receptor c-KIT (Nandakumar *et al*, 2016).

TGF- β ejerce un papel inductor de la diferenciación celular durante la eritropoyesis precoz. La expresión de CD105 (endoglina) en progenitores eritroides humanos, acelera su diferenciación en presencia de TGF- β . Gracias al conocimiento del papel que realiza la superfamilia TGF- β en la eritropoyesis, se están investigando intervenciones terapéuticas dirigidas específicamente frente a estas moléculas, para tratar ciertos casos de anemia (ver apartado 9) (Dulmovits *et al*, 2017; Zivot *et al*, 2018).

6.2 SEÑALIZACIÓN POR ERITROPOYETINA

La señalización por eritropoyetina se inicia con la unión de ésta a sus receptores de alta afinidad. El receptor de EPO (EPO-R) se expresa en la superficie de células eritroides desde la etapa de BFU-E hasta los eritroblastos ortocromáticos, alcanzando un pico de aproximadamente 1000 receptores por célula. Este receptor pertenece a la superfamilia tipo 1 de receptores de citocinas transmembrana de paso único (Ingley *et al*, 2004).

A través de su unión al receptor, EPO activa tres rutas de señalización intracelular: la vía de JAK-STAT, la vía del fosfatidilinositol-3-kinasa, y la vía de las MAP-quinasas (Figura 8). La activación de STAT5 por EPO es necesaria y suficiente para la eritropoyesis, aunque sigue siendo un reto el entender cómo la señalización por STAT5 y la unión a la cromatina provocan cambios en los patrones de expresión eritroides (Perreault & Venters, 2018). Estudios recientes identificaron los lugares de unión de STAT5 sobre la cromatina (Perreault & Venters, 2018). STAT5 ocupaba más de 300 localizaciones genómicas, concretamente regiones promotoras distales, co-ocupadas por otros factores de transcripción como GATA-1 o KLF1. Estas regiones tendían a estar relacionadas con genes relacionados con el linaje eritroide; así pues esto sugiere una integración entre la señalización EPO-JAK-STAT y los reguladores maestros eritroides (GATA-1, KLF1 y TAL1) (Perreault & Venters, 2018).

El dominio citoplasmático del receptor de EPO no posee actividad kinasa intrínseca, pero contiene 2 motivos llamados Box-1 y Box-2, los cuales se unen a la tirosín-kinasa JAK2. Esta kinasa se activa por transfosforilación después de la dimerización del receptor. Una vez activada, JAK2 puede fosforilar los 8 residuos de tirosina situados en el dominio citoplasmático del receptor, creando lugares de unión para las moléculas portadoras de dominios SH2 (Ingley *et al*, 2004). De los 10 miembros de la familia STAT, que actúan como factores de transcripción activados por dimerización tras la fosforilación de las tirosinas, las isoformas STAT5a y STAT5b son activadas en la cascada del receptor de EPO.

Uno de los genes diana de STAT5 es la molécula antiapoptótica BCL-xL (Ingley *et al*, 2004). Tras estimulación con EPO, STAT5 se encontró unido a numerosas regiones reguladoras de genes eritroides co-ocupados con GATA-1 y KLF-1 (Perreault & Venters, 2018) (ver apartado 7).

La vía Ras/Raf/MAP kinasa es también estimulada por el receptor de EPO, inicialmente por la asociación de las moléculas adaptadoras Shc y Grb2. Grb2 se une a un residuo específico de tirosina fosforilada del receptor y se asocia con el factor de intercambio de GTP, SOS, para activar los demás miembros de esta vía Ras/Raf/MAP kinasa (Figura 8). La iniciación de esta vía conduce finalmente a la activación de los factores de transcripción c-fos y c-jun, entre otros factores (Ingley *et al*, 2004).

Finalmente, la estimulación del receptor de EPO conduce a la activación también de las vías PI3/kinasa y PLC- γ , las cuales generan fosfolípidos de señalización y movilización de depósitos de calcio. A través de la vía PI3/kinasa se estimula la vía PKB/Akt, que a su vez da lugar a señales antiapoptóticas y proliferativas. Además de éstas, existen numerosas otras vías de señalización relacionadas con EPO, produciendo una compleja red de cascadas de señalización intracelular (Ingley *et al*, 2004; Valent *et al*, 2018).

Una importante característica de la señalización mediada por EPO es la naturaleza transitoria de su activación, ilustrando la importancia de la regulación negativa del receptor. La defosforilación del receptor se lleva a cabo por la fosfatasa SHP-1, que se une a través de su dominio SH2 a las tirosinas fosforiladas. SHP-1 también participa en la desactivación de JAK2. Otro mecanismo de desactivación está mediado por las proteínas de la familia SOCS: SOCS1, CIS y SOCS3 son activadas por los factores de transcripción STAT tras la estimulación por EPO. Estas proteínas inhiben directamente JAK2 a través de su unión al dominio kinasa, iniciando la degradación proteasomal mediada por ubiquitina. En último lugar, la inactivación de la kinasa Lyn (perteneciente a la familia Src) ocurre por acción de la fosfatasa transmembrana CD45 (Ingley *et al*, 2004).

En resumen, recientemente se ha avanzado mucho en el conocimiento de cómo EPO promueve la eritropoyesis, incluyendo la identificación de sus genes diana, lo que puede ser muy relevante para el tratamiento de trastornos eritropoyéticos con EPO (Perreault & Venters, 2018; Valent *et al*, 2018).

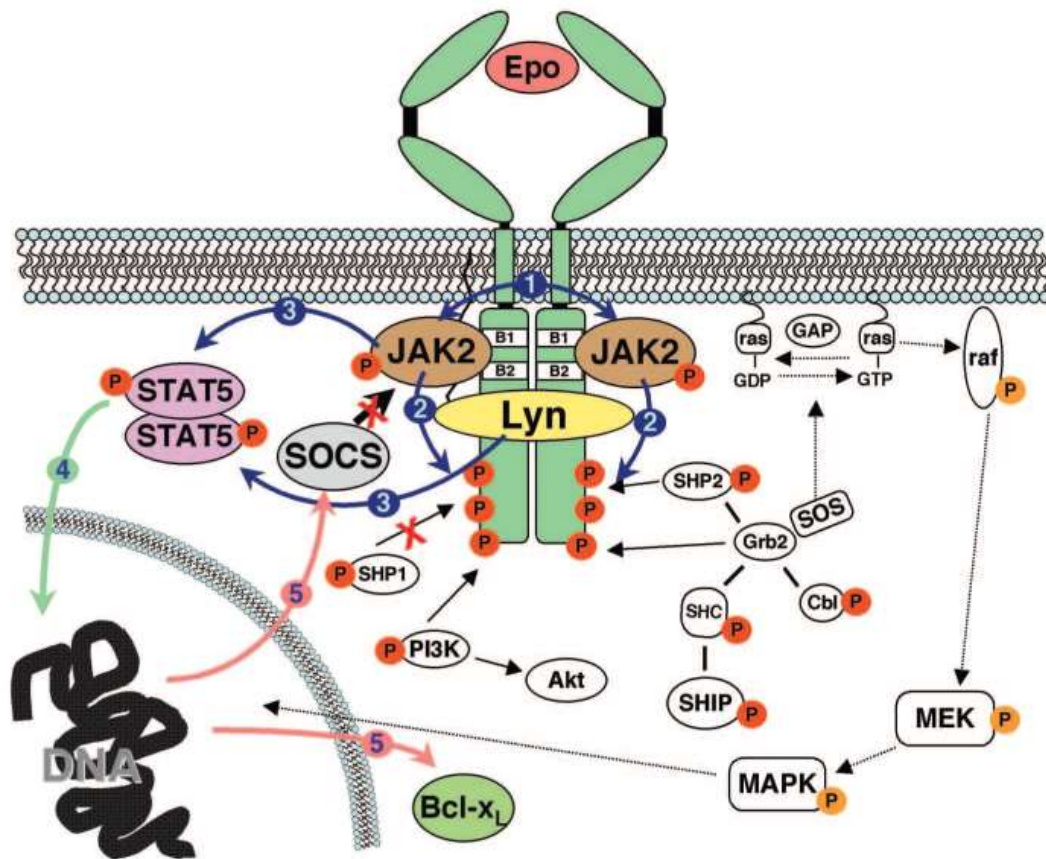


Figura 8. Cascada de señalización desde el receptor de EPO. Activación de la kinasa JAK2 por transfosforilación recíproca (1), seguida de la fosforilación del EPO-R por la propia kinasa JAK2 (2). La kinasa JAK2 activada y la kinasa secundaria Lyn cooperan en la fosforilación de STAT5 (3), que se transporta al núcleo (4) e induce la transcripción de la molécula antiapoptótica Bcl-X_L y de la familia de inhibidores SOCS (5). La fosfatasa SHP-1 también es reclutada por el EPO-R para inactivar el receptor por defosforilación. Otras vías activadas por EPO-R incluyen la vía ras/raf/MAP kinasa, y la vía PI3 kinasa/Akt (Ingley et al, 2004).

6.3 ERITROPOYESIS EN CONDICIONES BASALES

El mecanismo que regula la eritropoyesis durante condiciones estables es la producción de eritropoyetina. Esta hormona es sintetizada fundamentalmente en el riñón por los fibroblastos peritubulares. El locus del gen *EPO* tiene un promotor que es activado por los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIFs). El lugar de unión de HIF en el gen *EPO* permite su regulación transcripcional en respuesta a los niveles locales de oxígeno en sangre periférica. HIF2 es el principal factor de transcripción responsable del incremento en la expresión de *EPO*. Si el hematocrito disminuye, el riñón comienza a detectar bajos niveles de oxígeno y a producir HIF2, que incrementa la transcripción de *EPO*. Una vez que el hematocrito y la hemoglobina son restaurados, HIF2 se desactiva y la producción de EPO vuelve a sus valores normales (Barminko et al, 2016).

Bajo condiciones de reposo, la producción de eritrocitos es controlada en la etapa de CFU-E. El incremento en los niveles de EPO estimula un aumento

agudo de la transcripción del factor BCL-xL, con actividad antiapoptótica, conduciendo a un inmediato incremento en la cantidad de eritrocitos, normalizando los niveles de hemoglobina (Barminko *et al*, 2016).

Dado que los niveles normales de EPO son muy bajos, la producción de eritrocitos a partir de CFU-E puede ser aumentada más de un orden de magnitud por una elevada producción de EPO o por la inyección de EPO recombinante (Hattangadi *et al*, 2011).

6.4 ERITROPOYESIS EN CONDICIONES DE ESTRÉS

Cada célula CFU-E en la médula ósea puede sufrir entre 3 y 5 divisiones celulares bajo una estimulación máxima por EPO, por lo que el número de células CFU-E limita la producción máxima de eritrocitos EPO-dependientes. La eritropoyesis bajo condiciones estables no es suficiente para corregir el déficit de eritrocitos en condiciones de estrés, tales como la recuperación tras la irradiación de la médula ósea o la anemia crónica (Hattangadi *et al*, 2011).

En esta situación, son los BFU-E los que sufren una proliferación incrementada, antes de convertirse en CFU-E, para proporcionar la sobreproducción necesaria de eritrocitos (Barminko *et al*, 2016). Además de la EPO, son necesarias otras moléculas para producir una adecuada cantidad de eritrocitos en condiciones de estrés, principalmente glucocorticoides, BMP4 y SCF.

En primer lugar, en condiciones de estrés, la eritropoyesis se traslada desde la médula ósea al bazo, lugar donde las BFU-E tienen mayor capacidad de autorregeneración, debido al especial microambiente que allí se localiza (Hattangadi *et al*, 2011).

La producción de glucocorticoides por las glándulas suprarrenales se incrementa en situaciones de estrés, como sepsis o traumas severos. La acción de estas hormonas prepara al organismo para enfrentarse a estas condiciones extremas, elevando la presión arterial o los niveles de glucosa, por ejemplo. Además, los glucocorticoides actúan a nivel de la eritropoyesis induciendo la expresión de MYB, KIT y LMO2, e inhibiendo la expresión de GATA-1 (Hattangadi *et al*, 2011). Los glucocorticoides inducen una autorrenovación limitada de los BFU-E, pero no de los CFU-E o los proeritroblastos. Así, los glucocorticoides protegen a los BFU-E de la extenuación, al mismo tiempo que incrementan por 10 veces el número de CFU-E formados a partir de cada BFU-E (Hattangadi *et al*, 2011). De manera global, los efectos de los glucocorticoides incluyen el mantenimiento de los precursores eritropoyéticos más precoces, incrementan la producción de CFU-E, y estimulan la diferenciación terminal, promoviendo un aumento en la generación de eritrocitos rápido y mantenido en el tiempo (Hattangadi *et al*, 2011).

SCF participa tanto en la eritropoyesis en condiciones estables como en la eritropoyesis bajo estrés. La importancia de este factor se puede observar en la recuperación de la anemia inducida experimentalmente por fenilhidrazina, la cual resultaba gravemente impedida ante la administración de anticuerpos anti-c-KIT, el receptor de SCF (Barminko *et al*, 2016). La unión de SCF a su receptor c-KIT induce la activación de la vía de señalización PI3K, implicada en la

proliferación celular. Además, también previene la diferenciación de BFU-E induciendo la expresión de MYC, que inhibe la diferenciación terminal eritroide (Hattangadi *et al*, 2011).

Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) también está implicado en la eritropoyesis bajo estrés. Un ratón que expresa una proteína mutante SMAD5 (*flexed-tail mouse*), la cual inhibe la señalización por BMP4, desarrolla durante dos semanas después del nacimiento una anemia transitoria (Barminko *et al*, 2016). Esto demuestra que, aunque la señalización de BMP4 a través de SMAD 5 no es necesaria para el mantenimiento de la eritropoyesis fetal o adulta, es esencial para la eritropoyesis bajo estrés. En esta situación, la hipoxia induce la producción de BMP4 en las células estromales esplénicas (Barminko *et al*, 2016; Hattangadi *et al*, 2011). BMP4, en última instancia, activa el factor de transcripción SMAD5, así como SCL y GATA-2, promoviendo la autorregeneración de las BFU-E más que su diferenciación (Hattangadi *et al*, 2011).

7. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA ERITROPOYESIS

La regulación de la expresión génica es un importante mecanismo de control de la diferenciación eritroide. En este apartado se describen los principales procesos generales de control (el “Core Erythroid Network” de factores de transcripción y los cambios epigenéticos) para posteriormente, en el apartado 8, explicar en detalle los principales factores de transcripción eritroides.

En las células eritroides, STAT5 y otros reguladores transcripcionales EPO-dependientes, interactúan con un pequeño número de reguladores transcripcionales específicos de linaje eritroide, como GATA-1, SCL/TAL1, LMO2, LDB1, KLF1 y GFI-1B, esenciales para la eritropoyesis (Hattangadi *et al*, 2011) (Figura 9). Estos reguladores se encuentran organizados en diversas combinaciones de complejos multiproteicos. Existen también otros reguladores transcripcionales, como BCL11A, que actúan únicamente en la transición entre las γ -globinas fetales y las β -globinas adultas. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales los distintos complejos interactúan para reprimir o activar la expresión de determinados genes no se conocen en detalle (Hattangadi *et al*, 2011; Perreault & Venters, 2018).

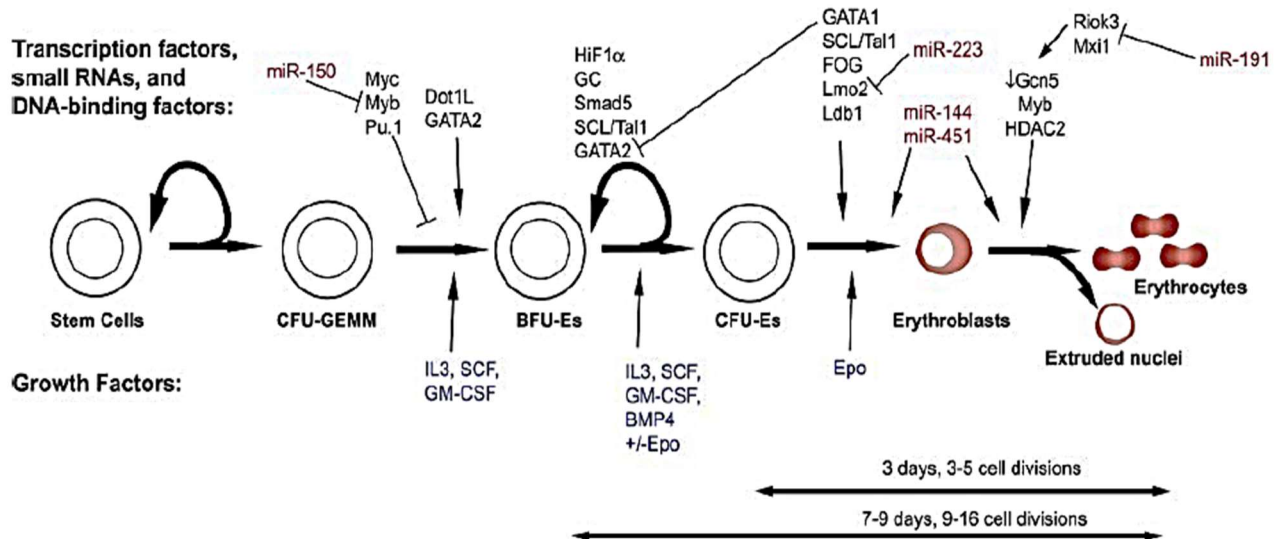


Figura 9. Visión general de la eritropoyesis: regulación a múltiples niveles por diversas proteínas y miARNs. La formación de eritrocitos a partir de células madre hematopoyéticas es regulada por señalización a través de factores externos (azul), como citocinas y factores de crecimiento, así como factores intracelulares, como factores de transcripción (negro) y miARNs (rojo) (Hattangadi *et al*, 2011).

7.1 “CORE ERYTHROID NETWORK” (CEN)

El compromiso de las células progenitoras multipotentes hacia el linaje eritroide y su consiguiente diferenciación a eritrocitos maduros está, en última instancia, controlado por los factores de transcripción maestros. Estos reguladores se unen a secuencias *enhancer* y organizan programas de expresión génica que culminan en la expresión masiva de los genes de las globinas y la enucleación de los eritrocitos (Perreault & Venters, 2018). En este sentido, es de gran importancia la existencia de una Red Eritroide Central (CEN por sus siglas en inglés) de factores de transcripción para el adecuado desarrollo de los eritrocitos (Figura 10). Este CEN está formado por factores de transcripción de unión al ADN: GATA-1, TAL1, y KLF1, y por factores de transcripción que no se unen al ADN: LDB1 y LMO2. La importancia de estos factores es tal, que se ha observado que ratones que carecen de alguno de ellos, exhiben graves defectos en la eritropoyesis y generalmente no sobreviven a la gestación. En humanos, mutaciones en los factores GATA-1 o KLF1 resultan en múltiples fenotipos anémicos (Nandakumar *et al*, 2016). Además, en eritroblastos estos factores co-ocupan elementos reguladores próximos a genes eritroides clave. Defectos en uno o más de estos factores de transcripción a menudo desestabilizan la unión de otros factores en estos elementos co-ocupados (Nandakumar *et al*, 2016).

Fuera del CEN, hay otros factores de transcripción que desempeñan funciones importantes, a veces incluso cooperando con los factores del CEN. Por ejemplo, BCL11A interactúa con GATA-1 siendo el regulador clave de la transición de la hemoglobina fetal a la adulta, tal como se señaló en el apartado 5. Otros factores con papeles nuevos y en constante evolución son ZFPM1/FOG1, NFE2, GFI1B, ETO2, TAF10, MYB y ZNF148/ZBP89 (Nandakumar *et al*, 2016).

El papel de los ARNs no codificantes (incluyendo microARNs y lncARNs) en la eritropoyesis es cada vez más apreciado. miR-451A fue identificado como un microARN que era drásticamente activado durante la maduración eritroide (Figura 9), y su papel en la regulación fina de la eritropoyesis ha sido comprobado por diversos estudios. Por su parte, miR-24 se une a ALK4 para reprimir la traducción, provocando defectos de maduración. miR-15a actúa a través de MYB para restringir la formación de colonias y regular los niveles de hemoglobina fetal. Respecto a los lncARNs, recientemente cientos de ellos han mostrado tener patrones dinámicos de expresión durante la eritropoyesis, y muchos de ellos son regulados por el CEN (Figura 10). La desactivación de múltiples lncARNs en cultivos celulares primarios parecía inhibir la maduración eritroide, sugiriendo que algunos lncARNs pueden actuar como reguladores clave de la eritropoyesis. Sin embargo, la expresión de lncARNs es diferente en humanos y ratones, por lo que este campo de estudio probablemente sufrirá un considerable refinamiento en los próximos años (Nandakumar *et al*, 2016).

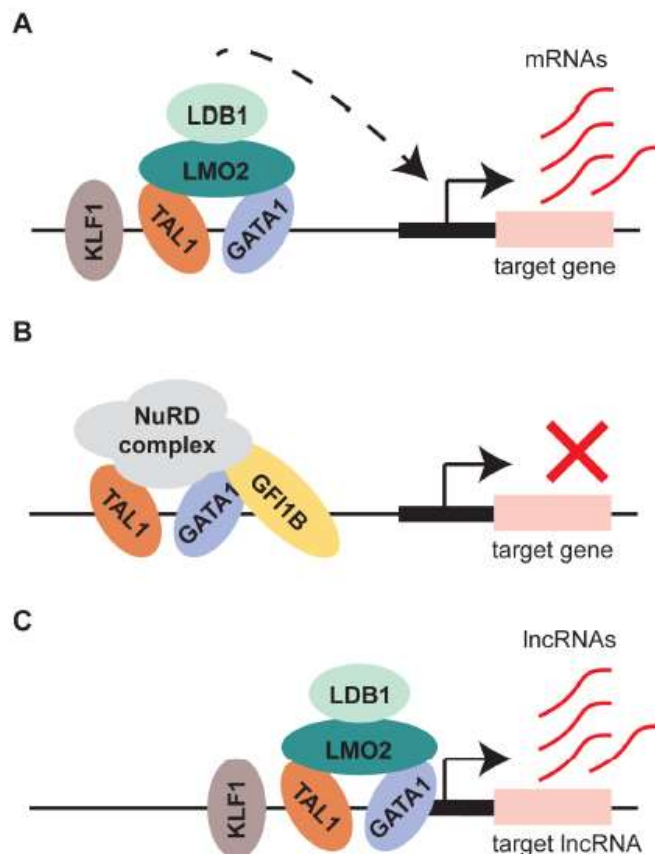


Figura 10. A) El "Core Erythroid Network" (CEN) de factores de transcripción está formada por los factores de unión al ADN GATA-1, TAL1 y KLF1, y por los factores LDB1 y LMO2. El CEN hace bucles de ADN desde enhancers a promotores para activar la expresión de genes diana. B) Los factores del CEN a menudo interactúan con factores adicionales en ciertos elementos reguladores. Por ejemplo, GATA-1 y TAL1 interactúan con GF11B y NuRD provocando represión génica. C) ARNs largos no codificantes (lncARNs), que son transcritos durante la eritropoyesis, son también regulados por el CEN (Nandakumar *et al*, 2016).

7.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN “MAESTROS”

Se mencionan a continuación los principales factores de transcripción eritroides implicados en el CEN. En el siguiente apartado se profundizará en su estructura y funciones.

GATA-1 ha sido ampliamente estudiado, fue descubierto como el primer factor que se unía a la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G), a través de 2 dedos de zinc característicos (ver apartado 8). La mayor parte de la unión de GATA-1 tiene lugar sobre elementos reguladores distales, y solo una pequeña parte (aproximadamente entre el 10-15%) sobre las regiones promotoras proximales. Estos lugares de unión de GATA-1 estaban enriquecidos en la histona H3 monometilada en lisina 4 (H3K4me1), una marca de histonas localizada predominantemente en elementos *enhancers* distales, proporcionando aún más pruebas acerca de la acción de GATA-1 sobre *enhancers* distales (Hattangadi *et al*, 2011). El análisis de los motivos de los genes activados reveló secuencias consenso para SCL/TAL1 próximas a los lugares de unión de GATA-1, lo que sugiere que la activación de GATA-1 ocurre en concierto con el corregulador SCL/TAL1. En las células eritroides, SCL/TAL1 forma un complejo con la proteína E2A, y también con los factores con dominio LIM, LMO2 y LDB1. Este complejo activador, junto con GATA-1, se une a regiones compuestas GATA-1/E-box separados aproximadamente entre 9 y 11 nucleótidos. Los componentes de los complejos represores GATA-1 son mucho menos claros y probablemente incluyen FOG1, el represor GFI-1B y/o los modificadores de cromatina EZH2 y EED (Hattangadi *et al*, 2011).

KLF1 (previamente denominado EKLF) es un factor de transcripción “dedo de zinc” que reconoce un subconjunto de motivos CACC y su expresión es marcadamente restringida a la línea eritroide. Del mismo modo que el complejo de activación GATA-1, la mayoría de los sitios de unión de este factor al ADN están a más de 10 kb de cualquier gen conocido. Comparando los sitios de unión de GATA-1 y de KLF1, se descubrió que casi la mitad de los sitios de KLF1 se localizan dentro de un intervalo de 1 kb de los sitios de GATA-1, y unos pocos de estos lugares de unión de KLF1 contienen la secuencia consenso SCL/TAL1, o bien se superponen con sitios co-ocupados por SCL/TAL1-GATA-1. Esto sugiere que GATA-1 y KLF1 pueden activar genes actuando en un complejo diferente a aquel que contiene TAL1 (Hattangadi *et al*, 2011).

Otros factores de transcripción han surgido como determinantes críticos de la eritropoyesis. De forma parecida a SCL/TAL1, LYL-1 es un factor de transcripción que contiene un motivo hélice-lazo-hélice. El defecto de este factor en las células hematopoyéticas provoca alteraciones en la eritropoyesis, debido a una mayor tasa de apoptosis, asociada a menores niveles de BCL-xL (Hattangadi *et al*, 2011).

7.3 REGULACIÓN DE LA ARN POLIMERASA II

Se ha descrito la regulación de la pausa de la ARN Polimerasa II (Pol II) como mecanismo regulador durante la diferenciación eritroide. Pol II frecuentemente se detiene en las regiones promotoras poco después de iniciarse la transcripción. En algunas células, la Pol II realiza esta pausa hasta en el 90%

de los genes expresados, apoyando la teoría de que la regulación de la Pol II es un paso clave en la expresión génica. El reclutamiento de p-TEFb (positive transcription elongation factor b) promueve la elongación mediante la fosforilación de la Pol II en su dominio C-terminal (CTD). Un ejemplo de esta regulación se ha descrito en la transcripción de los genes de globinas, controlados por el LCR (Locus Control Region). La delección de LCR reduce la fosforilación de la Pol II y la subsiguiente elongación, disminuyendo un 90% la transcripción de las globinas. Otro ejemplo es TIF-1, que regula la decisión de las células madre hematopoyéticas hacia la línea eritroide o mieloide, mediante el control de los niveles de GATA-1 y PU.1. En ausencia de TIF-1, el reclutamiento de p-TEFb disminuye, lo cual reduce la fosforilación del CTD y la elongación de la Pol II (ver Figura 12) (Hattangadi *et al*, 2011).

7.4 ENHANCERS, CAMBIOS EPIGENÉTICOS y TADs

Los factores de transcripción dirigen la transcripción a través de su unión a sus respectivas secuencias dentro de *enhancers* específicos y a través del reclutamiento de correguladores y la ARN polimerasa II hacia las secuencias promotoras para iniciar la transcripción. Así, los factores de transcripción se unen a regiones *enhancers* para dar lugar a patrones de expresión génicas específicos según el tipo celular.

Aunque los *enhancers* esenciales para las células eritroides han sido ya identificados, aún permanece indefinido el proceso por el que la EPO influencia las secuencias amplificadoras. Igualmente, el mecanismo por el cual la EPO altera la dinámica de las modificaciones en las histonas es actualmente desconocido (Perreault & Venters, 2018). A pesar de los profundos cambios transcripcionales que tienen lugar durante la eritropoyesis, se ha observado que grandes zonas de cromatina permanecen prácticamente inalterables durante la diferenciación inducida por GATA-1. Esto sugiere que las secuencias *enhancers* están ya establecidas en precursores eritroides, aunque no se sabe el momento preciso en que esto ocurre.

La determinación del epigenoma en un determinado tipo celular incluye coordinar las actividades de los factores de transcripción, junto con los modificadores del nucleosoma y los complejos remodeladores de la cromatina. En concreto, las secuencias *enhancers* están definidas por la monometilación de histona3 lisina 4 (H3K4me1) y por la acetilación de histona3 lisina27 (H3K27ac). Esta característica distingue a las secuencias amplificadoras de las promotoras, las cuales están marcadas por la trimetilación de histona3 lisina4 (H3K4me3) (Perreault & Venters, 2018).

Los factores de transcripción eritroides también facilitan contactos de cromatina de larga distancia entre regiones *enhancers* y regiones promotoras (Figura 11). Estas interacciones *enhancer*-promotor pueden ser identificadas a diversas resoluciones. Las tecnologías de captura de conformación del cromosoma (3C) identifican contactos cromatínicos *in vivo* usando un ensayo de ligamiento y proximidad de ADN. A partir de la técnica 3C se han desarrollado otros métodos de ensayo de contacto cromatínico como 4C, 5C, Hi-C, ChIA-PET. Concretamente, Hi-C se ha usado para caracterizar dominios asociados topológicamente (TADs) a lo largo del genoma que tienden a estar flanqueados por el factor de unión a CCCTC (CTCF) (Perreault & Venters, 2018).

Además del CTCF y las cohesinas, hay otros factores importantes para el establecimiento y mantenimiento de estos contactos cromatínicos de larga distancia, como BRD2 (Bromodomain and Extraterminal Motif Protein 2). Este factor es necesario para la expresión de algunos genes activados por GATA-1 durante la eritropoyesis, pero BRD2 no se colocaliza con GATA-1, lo que indica que ambos factores parecen promover la eritropoyesis a través de diferentes mecanismos. El análisis global de interacciones ADN-proteínas muestra que BRD2 y CTCF tienden a localizarse juntos a lo largo del genoma, y que la ocupación de BRD2 es dependiente de CTCF. En conclusión, CTCF recluta a BRD2 como un cofactor necesario para mantener la integridad de los límites arquitecturales y transcripcionales (Perreault & Venters, 2018).

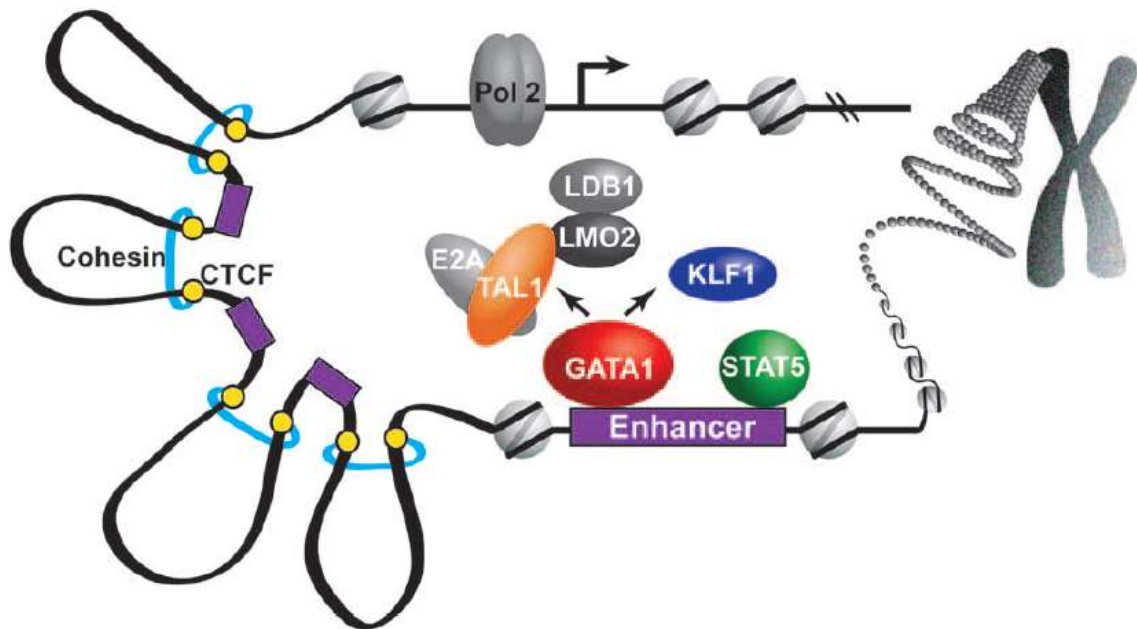


Figura 11. Modelo ilustrativo acerca de cómo los factores de transcripción, enhancers, y los bucles de cromatina trabajan juntos para reclutar la ARN Polimerasa II hacia las secuencias promotoras de genes eritroides. Los factores de transcripción maestros (GATA-1, KLF1 y TAL1) se unen fundamentalmente a las secuencias enhancers junto con proteínas accesorias (E2A, LDB1, LMO2), formando complejos multiproteicos. E2A se une al factor TAL1, formando un heterodímero para unirse al ADN. LMO2 va uniendo LDB1 a los factores de transcripción, facilitando el ensamblaje de mayor complejidad, e interacciones de bucles de cromatina gracias a la homodimerización de LDB1. La vía de señalización dependiente de EPO activa STAT5, que se integra con los reguladores maestros, ocupando cientos de secuencias enhancers unidas ya a GATA-1. Los factores de transcripción y los enhancers interactúan dentro de los límites de los dominios cromatínicos topológicamente asociados (TADs), los cuales se mantienen estructuralmente juntos gracias a CTCF, cohesinas y otros factores como BRD2 (Perreault & Venters, 2018).

A nivel local, las modificaciones post-traduccionales de las histonas son cruciales en la regulación de la expresión génica en células eritroides (Figura 12). Por ejemplo, la modificación H3K4me3 en los sitios de iniciación de la transcripción, se asocia frecuentemente a la activación génica y al inicio de la transcripción por la ARN Polimerasa II. Sin embargo, la modificación H3K4 a

menudo convive con la modificación H3K27me3, asociada con la represión génica. Estas regiones de cromatina marcadas por ambas modificaciones son denominadas “dominios bivalentes”. Muchos se encuentran en células madre embrionarias en genes codificantes para factores de transcripción clave, así como en células madre hematopoyéticas que se diferencian a progenitores eritroides (Hattangadi *et al*, 2011).

Además de H3K4me3 y H3K27me3, puede haber otras modificaciones de histonas que marcan genes *poised*, transcripcionalmente preparados en precursores eritroides. H3K4me3 y H3K4me2 existen simultáneamente en la mayoría de los genes, pero las células hematopoyéticas multipotenciales contienen un conjunto de genes marcados solo por H3K4me2. La marca H3K4me2 se pierde rápidamente en los genes no eritroides durante la diferenciación eritroide, acompañada por la represión de estos genes. Por otro lado, la ganancia de H3K4me3 se correlaciona con la activación transcripcional durante la diferenciación eritroide. De esta manera, parece que la única presencia de H3K4me2 en genes no eritroides, puede regular su represión durante el desarrollo eritroide (Hattangadi *et al*, 2011).

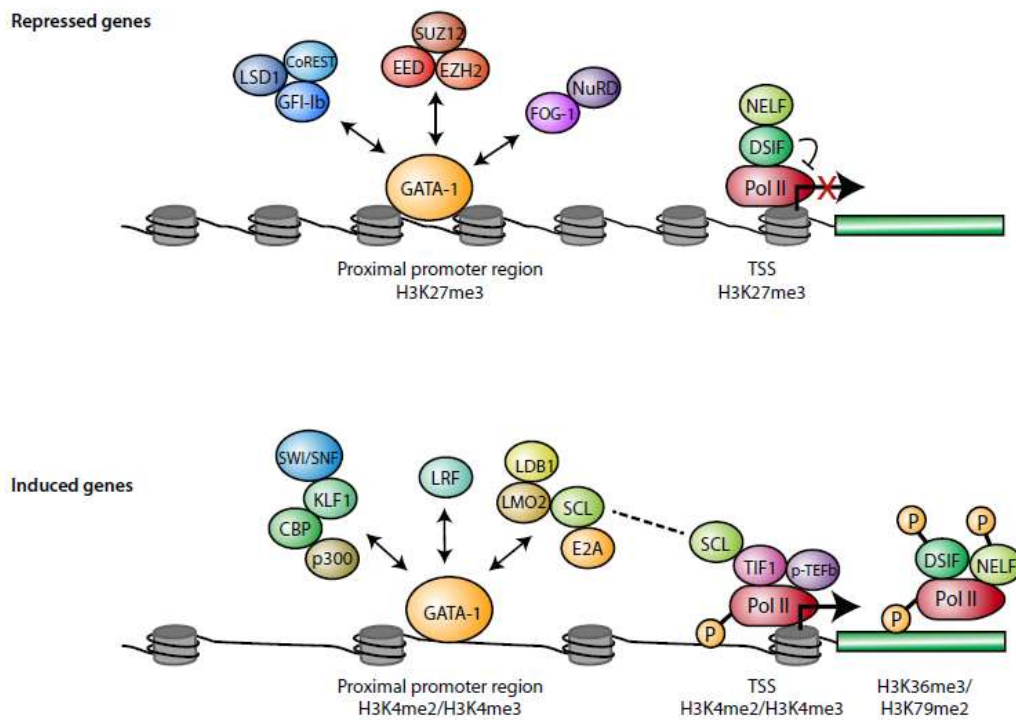


Figura 12. Factores de transcripción, ARN Polimerasa II y modificaciones de las histonas asociadas con la transcripción y represión génica en células eritroides. En los genes activados (panel inferior) durante la diferenciación eritroide, las proteínas de activación asociadas a GATA-1 se sitúan en diferentes complejos (flechas dobles), y se unen tanto a regiones reguladoras distales como a regiones promotoras cerca de los sitios de inicio de la transcripción (TSS). H3K4me2 y H3K4me3 son abundantes en algunos de estas regiones de unión. TIF-1 y el complejo SCL reclutan p-TEFb para promover la elongación de la ARN Polimerasa II, a través de la fosforilación de la Pol II, DSIF y NELF. SCL podría ser el enlace entre el complejo GATA-1 y la maquinaria de elongación de Pol II. Las marcas H3K79me2 y H3K36me3 a menudo se encuentran de forma abundante en la porción transcrita del gen. Respecto a los genes reprimidos (panel superior), los complejos represores de GATA-1 son menos claros y podrían existir en diferentes formas (flechas dobles). La marca represora H3K27me3 se encuentra enriquecida cerca del TSS. La Pol II se encuentra detenida o incluso no unida en las cercanías del TSS. En ausencia de TIF-1, el reclutamiento de p-TEFb está disminuido, y DSIF y NELF inhiben la fosforilación y elongación de Pol II (Hattangadi *et al*, 2011).

8. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ERITROIDES

8.1 GATA-1

El factor de transcripción con doble dedo de zinc, GATA-1 (Figura 13), fue purificado y clonado después del descubrimiento de la secuencia motivo (A/T)GATA(A/G) (Motivo GATA) dentro de las regiones reguladoras transcripcionales de la mayoría de genes específicos eritroides (Kim & Bresnick, 2007). Este miembro de la familia de los factores de transcripción GATA se expresa en los linajes celulares eritroide, megacariocítico, eosinófilo y mastocítico. El bloqueo específico de GATA-1 en ratones aporta pruebas acerca de su importante función en la estimulación de la eritropoyesis, y la supervivencia de los precursores eritroides mediada por GATA-1 se consigue mediante la inducción de la expresión de BCL-xL (Kim & Bresnick, 2007). Sin embargo, células madre embrionarias carentes del factor GATA-1, pueden desarrollarse hacia otros linajes celulares. La expresión forzada de GATA-1 en una línea celular mielóide precoz, promueve la diferenciación hacia el linaje megacariocítico, lo cual sugiere que GATA-1 puede afectar tanto a la selección de linaje como a la maduración eritroide tardía (Perry & Soreq, 2002).

El dedo de zinc C-terminal de GATA-1 reconoce motivos GATA, mientras que el dedo de zinc N-terminal estabiliza la unión al ADN sobre determinados motivos. El dedo N-terminal se une también directamente a FOG-1 y a TRAP220. GATA-1 también se une a CBP/p300 y a varios factores de transcripción, incluyendo PU.1, Sp1 y EKLF (Figura 13) (Kim & Bresnick, 2007).

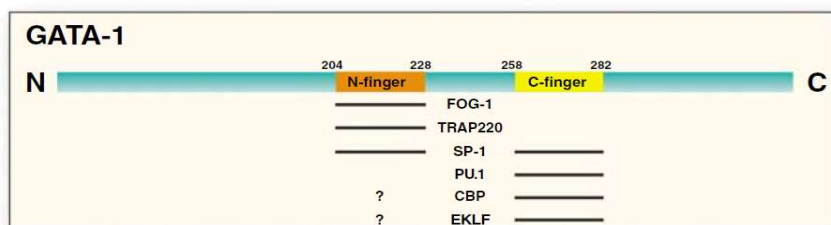


Figura 13. Organización estructural de GATA-1. Los dos dedos de zinc aparecen representados como barras de colores. El dedo de zinc amino-terminal se une a FOG-1, TRAP220 y a Sp1, mientras que el dedo de zinc carboxi-terminal se une a PU.1, CBP/p300 y a EKLF (Kim & Bresnick, 2007).

El gen *GATA-1* se localiza en el cromosoma Xp11.23. En las células eritroides primitivas, la expresión de *GATA-1* está controlada por un amplificador 5', mientras que en las células eritroides definitivas, su expresión requiere un elemento adicional, localizado en el primer intrón. Conjuntamente, estos elementos forman el dominio regulador hematopoyético (HRD) del locus de *GATA-1* (Perry & Soreq, 2002). G1HRD no recompone completamente la expresión genética de *GATA-1*, especialmente en los progenitores eritroides más precoces. Sin embargo, la expresión genética de *GATA-1* bajo la influencia reguladora de G1HRD permite mantener la hematopoyesis embrionaria y adulta en ratones deficientes en *GATA-1*, a un nivel que permite evitar la muerte embrionaria de estos ratones (Kaneko *et al*, 2010). Estas observaciones sugieren que los elementos reguladores fundamentales para la expresión de *GATA-1* se encuentran todos dentro del G1HRD.

G1HRD contiene cuatro elementos reguladores discretos (Figura 14): un amplificador hematopoyético GATA-1 (G1HE), un doble motivo GATA, un elemento CACCC y un intrón. Tanto el sitio GATA localizado en la región G1HE, como el doble motivo GATA situado en la región promotora han demostrado ser importantes para la expresión genética de GATA-1 (Kaneko *et al*, 2010).

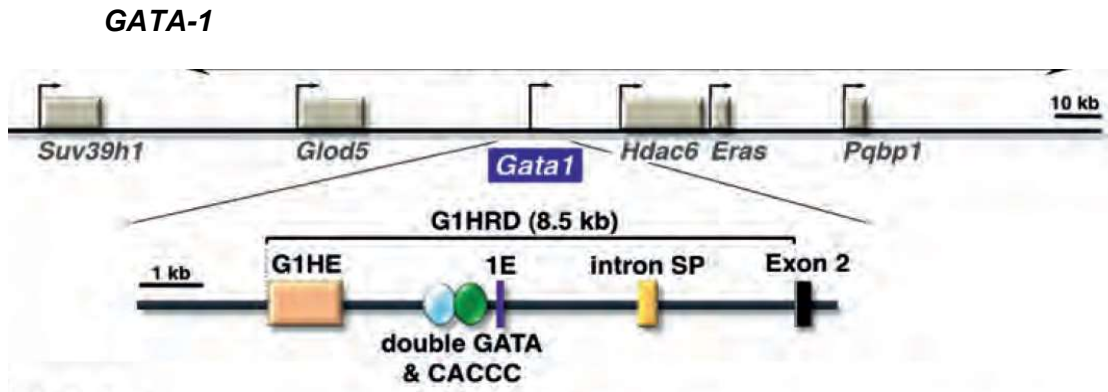


Figura 14. Los cuatro elementos reguladores discretos (G1HE, el doble motivo GATA, el elemento CACCC y el intrón SP), importantes para la expresión genética de GATA-1, están localizados en el G1HRD (GATA-1 hematopoietic regulatory domain). La expresión genética de GATA-1 bajo la regulación de G1HRD es suficiente para rescatar los defectos en ratones carentes de GATA-1. Sin embargo G1HRD carece de la capacidad de dirigir la expresión de GATA-1 en progenitores eritroides precoces (Kaneko *et al*, 2010).

8.2 GATA-2

El factor de transcripción GATA-2 se expresa abundantemente en células madre hematopoyéticas, progenitores hematopoyéticos multipotentes, precursores eritroides, megacariocitos, eosinófilos y mastocitos (Perry & Soreq, 2002; Fujiwara, 2017). Su expresión en los precursores eritroides promueve la proliferación y bloquea la diferenciación eritroide. La expresión de GATA-2 precede la expresión de GATA-1, y debe disminuir a medida que la expresión de GATA-1 se va incrementando para permitir la diferenciación eritroide (Perry & Soreq, 2002; Fujiwara, 2017). El bloqueo selectivo de GATA-2 en ratones es letal en embriones debido al fallo de la hematopoyesis definitiva, mientras que ratones con una delección heterocigótica de GATA-2, aunque son viables, muestran células madre hematopoyéticas con una longevidad afectada. Por otro lado, además de su papel en las células hematopoyéticas, GATA-2 es requerido específicamente para la diferenciación de las células madre mesenquimales (Fujiwara, 2017).

El gen GATA-2 contiene 2 primeros exones no traducidos (Figura 15). El primer exón proximal (exón IG) se utiliza en varios tejidos, mientras que el primer exón distal (exón IS) es utilizado únicamente en los tejidos hematopoyético y nervioso. Al igual que en el gen GATA-1, existen regiones reguladoras de la expresión de GATA-2 en el exón IS, denominadas G2EHRD (GATA-2 Early Hematopoietic Regulatory Domain). La región G2EHRD contiene 5 motivos GATA funcionales, pero ninguno de ellos es indispensable para la actividad de G2EHRD en la aorta dorsal, donde los progenitores hematopoyéticos definitivos se acumulan (Kaneko *et al*, 2010).

Además de la región G2EHRD, existen otras regiones reguladoras de la expresión de GATA-2 distribuidas a lo largo del gen, las cuales poseen motivos

GATA. En los progenitores eritroides precoces, GATA-2 se une a los motivos GATA en estas regiones reguladoras. Tras la inducción de la expresión de GATA-1, GATA-1 ocupa estos sitios. Por tanto, el gen *GATA-2* está regulado por GATA-1 y por GATA-2, a través de su unión a los motivos GATA (Kaneko *et al*, 2010).

GATA-2

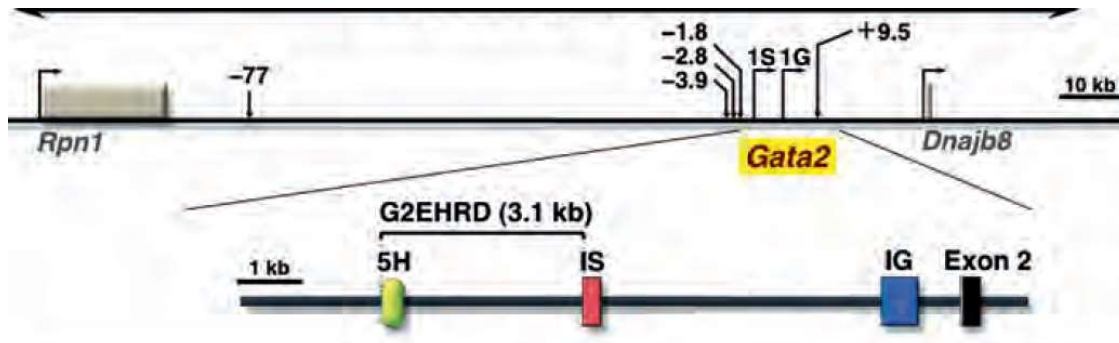


Figura 15. G2EHRD reproduce la expresión de GATA-2 en células hematopoyéticas definitivas durante el inicio de la gestación. Hay cinco motivos GATA acumulados en esta región G2EHRD (denominados 5H en la figura), y ninguno de ellos es indispensable. Los motivos GATA relacionados con el GATA switching están indicados con flechas descendentes. (Kaneko *et al*, 2010).

8.3 GATA SWITCHING

A lo largo del proceso de diferenciación eritroide, GATA-1 lleva a cabo cambios drásticos en la expresión de una serie de genes. La expresión de GATA-1 se inicia en la etapa de CMP (Common Myeloid Progenitor), al inicio del linaje eritroide. Progresivamente, la expresión de GATA-1 se incrementa y llega a su máximo cuando los progenitores eritroides dan lugar a los proeritroblastos. Cuando los proeritroblastos entran en la fase de diferenciación eritroide terminal, GATA-1 directamente activa una serie de genes vinculados a la línea eritroide, como el gen de la β -globina, *Alas2* (5'-aminolevulinato sintetasa) y el propio gen *GATA-1*; y también reprime la expresión de genes esenciales para la proliferación de los progenitores, en las etapas precoces de la hematopoyesis: *GATA-2*, *c-KIT*, *MYB* y *MYC*. A partir de la etapa de los eritroblastos tardíos, los niveles de GATA-1 comienzan a decaer. Esta serie de cambios en los niveles de GATA-1 es esencial para la correcta eritropoyesis. De hecho, la sobreexpresión de GATA-1 durante la etapa final de la diferenciación eritroide conduce a una maduración eritroide defectuosa, indicando que la actividad aberrante de GATA-1 inhibe la diferenciación eritroide (Moriguchi & Yamamoto, 2014).

Las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras expresan GATA-2 de forma abundante. El gen *GATA-2* es activado en *trans* gracias a la unión del propio GATA-2 a los motivos GATA distribuidos por el gen. GATA-2 también participa en la activación de la expresión del gen *GATA-1* en la fase inicial de la diferenciación eritroide/megacariocítica. Durante la diferenciación terminal de los eritroblastos, la expresión del gen *GATA-1* se maximiza por un bucle autorregulador mediado por GATA-1 en los motivos GATA situados en la región G1HRD. De esta forma, los mayores niveles de GATA-1 sustituyen a GATA-2 en los diferentes lugares de unión a GATA en el gen *GATA-2*, suprimiendo su expresión (Figura 16) (Moriguchi & Yamamoto, 2014).

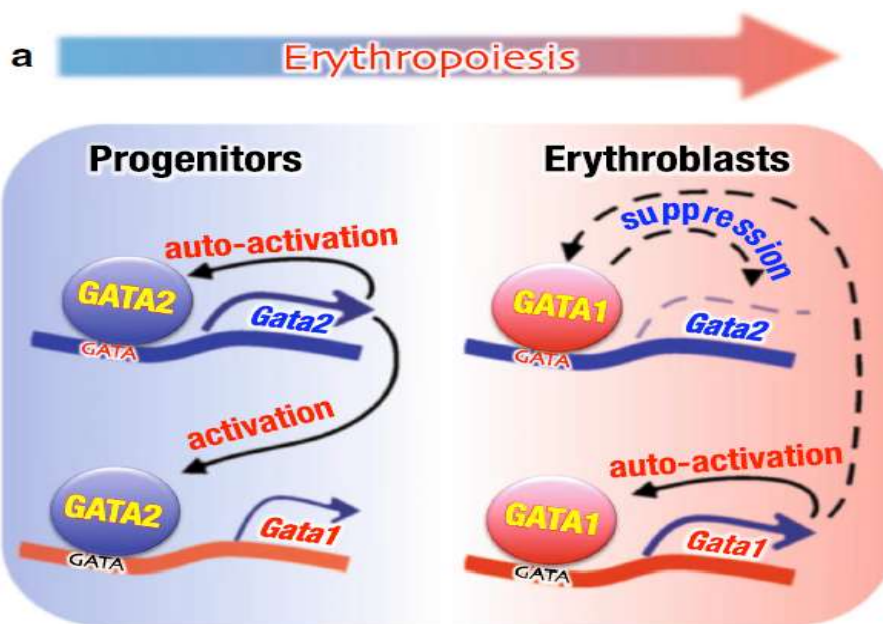


Figura 16. GATA factor switching. GATA-2 auto-activa la expresión del gen GATA-2 y activa la expresión de GATA-1 en progenitores hematopoyéticos (izquierda). En la diferenciación eritroblástica, GATA-1 auto-activa la expresión del gen GATA-1 y suprime la expresión del gen GATA-2 (derecha) (Moriguchi & Yamamoto, 2014).

Aún es necesario aclarar el mecanismo por el cual GATA-1 reprime la expresión de GATA-2, lo cual es interesante si consideramos que GATA-1 es un factor de transcripción activador para el gen GATA-1, y que GATA-2 es también activador para los genes GATA-1 y GATA-2. Cuando los motivos GATA son ocupados por GATA-2, la proteína de unión a CREB (CBP) con actividad histona acetiltransferasa, es reclutada hacia las cercanías del gen GATA-2. Las histonas son acetiladas en tres de cada cinco motivos GATA, lo que representa un estado transcripcional activo. Por el contrario, después del GATA switching, la CBP es desplazada. Estas observaciones indican que el complejo epigenético reclutado por GATA-1 es diferente del reclutado por GATA-2. Sin embargo, en el gen GATA-2, la acetilación de las histonas en los motivos GATA no es modificada tras el GATA switching, ni tras la ocupación de tales motivos por el factor GATA-1. Por tanto, el GATA switching parece involucrar una serie de complejos mecanismos reguladores sobre el gen GATA-2 (Kaneko *et al*, 2010).

GATA-1 necesita al factor FOG-1 para la formación del bucle de cromatina. FOG-1 es una proteína con un dedo multizinc que interactúa con GATA-1 y GATA-2 y modula su actividad en la hematopoyesis (ver apartado 8.8). Se ha observado que el GATA factor switching en los motivos GATA del gen GATA-2, no ocurre en ausencia del factor FOG-1. FOG-1 reprime la expresión de los genes diana de GATA-1 mediante el reclutamiento de los correpresores CTBP y NURD, aunque el complejo GATA-1-FOG-1 se comporta como activador en ausencia de estos correpresores (Kaneko *et al*, 2010).

8.4 TAL-1/SCL

Coincidiendo con la identificación de GATA-1, investigaciones encaminadas a determinar los mecanismos subyacentes de la leucemia linfoblástica aguda de células T, permitieron descubrir un factor de transcripción. Este factor, llamado SCL (Stem Cell Leukemia) o TAL-1 (T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia-1), funciona en varias etapas de la eritropoyesis (Kim & Bresnick, 2007).

SCL/TAL-1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia de factores hélice-lazo-hélice, que se une a cortas secuencias consenso de ADN (CANNTG), llamadas E-box. La expresión de SCL es similar a la de GATA-1, ya que aparece en células eritroides, megacariocitos y mastocitos (Tsiftoglou *et al*, 2009). SCL es necesario para la especificación de todos los linajes celulares, y los ratones carentes de este factor mueren aproximadamente en el día embrionario 9.5. A pesar de la importancia de este factor en la generación de células madre hematopoyéticas, no es requerido para la supervivencia de células madre hematopoyéticas, su capacidad de multipotencia, o repoblación a largo plazo. Sin embargo, la ausencia de SCL inhibe de forma importante la diferenciación megacariocítica y eritroide (Dore & Crispino, 2011).

SCL dimeriza con otras proteínas E (por ejemplo, E47/E2A) y se une a los citados motivos E-box. Además de ello, SCL puede formar parte de un complejo multiproteico con otros factores como LMO2, E47/E2A, LDB1 Y GATA-1. Este complejo SCL se une al ADN sobre motivos compuestos, consistentes en un motivo GATA y un motivo E-box vecino (Kim & Bresnick, 2007). Estos motivos están presentes en muchos genes eritroides, así como en los elementos reguladores de los genes de factores de transcripción claves, como los propios genes *SCL/TAL-1* y *GATA-1* o el gen *KLF1/EKLF*. El componente LDB1 del complejo SCL interactúa con otras proteínas de unión al ADN que parecen tener una función reguladora sobre el complejo SCL. ETO-2 y la quinasa dependiente de ciclinas CDK9 también interactúan con LDB1 (Kim & Bresnick, 2007). En general, SCL, LMO2 y LDB1 se comportan como un complejo fundamentalmente activador, mientras que ETO2 actúa como correpressor (Dore & Crispino, 2011). Parece que la unión al ADN de SCL no es indispensable para las funciones de especificación de las células madre hematopoyéticas, pero esta unión sí es necesaria para las funciones relacionadas con la maduración eritroide (Dore & Crispino, 2011).

8.5 KLF1

Erythroid Krüppel-like Factor (KLF1/EKLF) es un miembro de la familia KLF, que comprende 17 factores de transcripción, los cuales participan en diferentes procesos biológicos. Los factores de la familia KLF se caracterizan por un dominio de unión al ADN altamente conservado, perteneciente a la clase de los dedos de zinc C2H2 (Siatecka & Bieker, 2011). Este factor es esencial para la eritropoyesis. Su expresión se restringe a los órganos hematopoyéticos a lo largo de todas las etapas del desarrollo, iniciándose su expresión en el saco vitelino en el día embrionario 7.5, más tarde en el hígado fetal, y finalmente en la médula ósea adulta y la pulpa roja del bazo; en las poblaciones eritroides tanto primitivas como definitivas (Siatecka & Bieker, 2011).

Estructuralmente, KLF1 consta de tres dedos de zinc tipo C2H2 en el extremo C-terminal, que se unen a secuencias de ADN llamadas CACC-boxes (Figura 17). El extremo N-terminal por su parte, le confiere las propiedades de un activador transcripcional, aunque se ha observado también una cierta (aunque mucho menor) actividad represora génica de este factor (Tallack & Perkins, 2010).

La ablación genética de KLF1 conduce a una anemia letal *in útero* que recuerda a la de la beta-talasemia. Sin embargo, en este caso el fenotipo es más severo, y además la corrección del desequilibrio de las cadenas de hemoglobina es incapaz de prevenir la letalidad embrionaria, lo que sugiere la participación de este factor en más procesos biológicos (Tallack & Perkins, 2010).

KLF1 no está presente en las células madre hematopoyéticas, y es apenas detectable en progenitores mieloides multipotentes. Sin embargo, a partir del MEP (progenitor eritroide-megacariocítico), la expresión de KLF1 se incrementa a medida que las células maduran hacia el linaje eritroide, mientras que su expresión disminuye a medida que estas células se diferencian hacia megacariocitos (Siatecka & Bieker, 2011). En este sentido, es importante la interacción de KLF1 con el factor megacariocítico FLI-1. El dominio de unión al ADN de KLF1 reprime la expresión de genes megacariocíticos mediados por FLI-1; mientras que este último es capaz de reprimir a su vez genes diana de KLF1. De este modo, en el MEP, el incremento en los niveles de uno u otro factor determinará el linaje de la futura célula (eritrocito o megacariocito), de forma similar al equilibrio que existe entre PU.1 y GATA-1 en progenitores mieloides precoces (Dore & Crispino, 2011).

Los eritrocitos circulantes primitivos de embriones *KLF1*^{-/-} se describen como “ondulados y arrugados”, fenotipo explicado parcialmente por la pérdida de expresión de *Dematina/Epb4.9*, esta proteína es importante para proporcionar integridad y estabilidad a la membrana de los eritrocitos (Siatecka & Bieker, 2011; Tallack & Perkins, 2010). Por su parte, los eritrocitos definitivos *KLF1*^{-/-} acumulan demasiado daño a nivel de la membrana y el citoesqueleto como para sobrevivir *in vivo*. Otros componentes de la membrana y el citoesqueleto celular son genes diana de KLF1, como antígenos de grupo sanguíneo, transportadores, espectrin, o glicoforinas; todos ellos se ven afectados en ausencia de este factor de transcripción (Figura 17) (Tallack & Perkins, 2010).

Se propuso un papel regulador de KLF1 sobre el ciclo celular a partir de experimentos con células progenitoras eritroides modificadas. Los progenitores eritroides de embriones *KLF1*^{-/-} eran inmortalizados y se les introducía el gen *KLF1* mediante retrovirus, de manera que estas células eran capaces de producir una proteína KLF1 sintética. La reactivación de KLF1 en estas células condujo a un cese de la proliferación, y a un aumento de la diferenciación celular, incluyendo la síntesis de hemoglobina (Tallack & Perkins, 2010). Dos de los genes diana de KLF1 son *p18^{INK4c}* y *p21^{WAF/CIP1}*. Los productos proteicos de estos genes funcionan como inhibidores de kinasas dependientes de ciclina, y actúan retrasando la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular, y la entrada a la fase S, ralentizando la proliferación celular para permitir la diferenciación (Tallack & Perkins, 2010).

Paradójicamente, KLF1 ha demostrado activar la expresión de los genes *E2F2* y *E2F4*, que actúan promoviendo la proliferación celular. E2F2 es un factor de transcripción que controla la entrada celular en la fase S y la síntesis de ADN. E2F2 permite la progresión de los progenitores eritroides precoces, como BFU-E y CFU-E, a la fase S del ciclo celular, antes de la diferenciación final. La insuficiente expresión de E2F2 puede explicar, al menos en parte, la falta de eritrocitos diferenciados en células carentes del factor KLF1 (Figura 17) (Siatecka & Bieker, 2011; Tallack & Perkins, 2010).

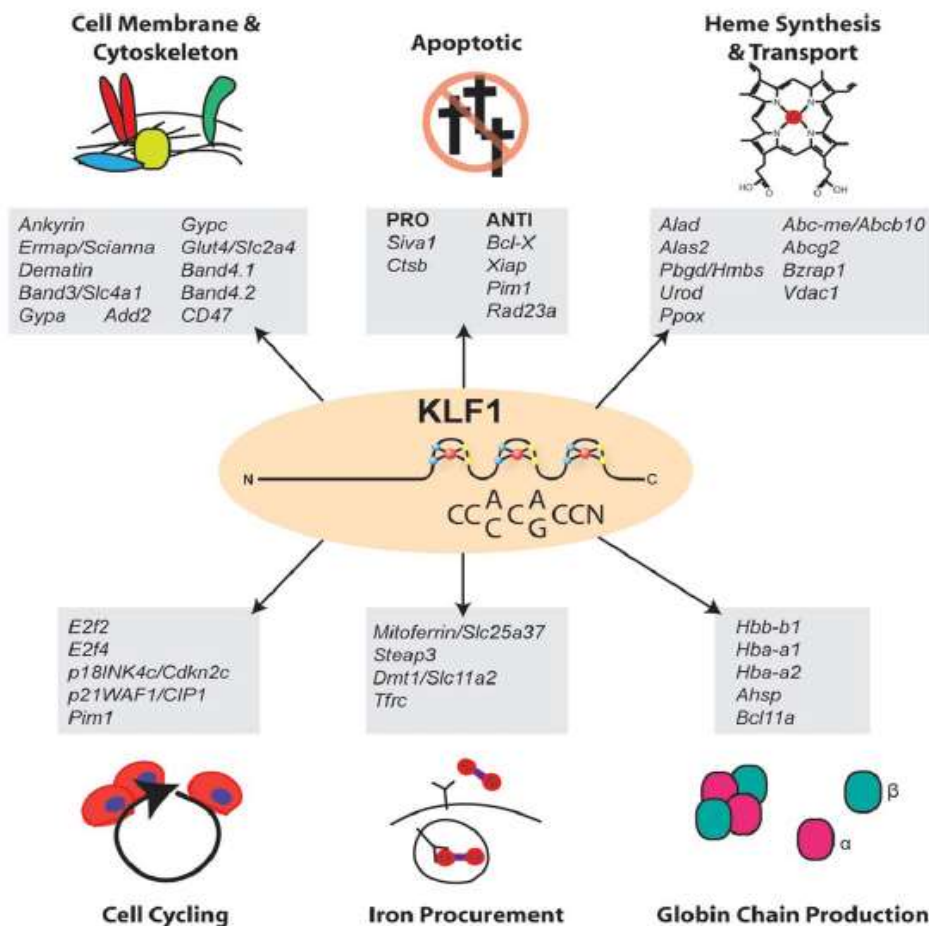


Figura 17. KLF1 actúa como un regulador global de la producción e integridad eritroide. KLF1 es un factor de transcripción que contiene tres dominios de unión a ADN en su extremo C-terminal, los cuales se unen a los motivos CACC-box. KLF1 activa una gran variedad de genes implicados en rutas clave de diferentes procesos, como el mantenimiento de la membrana plasmática, la apoptosis, la síntesis del grupo hemo, la regulación del ciclo celular, el aprovisionamiento de hierro, o la producción de globinas (Tallack & Perkins, 2010).

KLF1 juega un papel fundamental en la transición de hemoglobina fetal a hemoglobina adulta, a través de un mecanismo directo, activando la expresión del gen de la β -globina; y a través de un mecanismo indirecto, mediante el factor BCL11A, represor de la expresión del gen de la γ -globina (Siatecka & Bieker, 2011; Tallack & Perkins, 2010). Está descrito un caso familiar de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal debida a haploinsuficiencia de KLF1, en el cual no hay una completa activación de BCL11A y, por tanto, no se produce la transición a la hemoglobina adulta (Siatecka & Bieker, 2011).

La molécula de hemoglobina requiere un grupo hemo con hierro para ser completamente funcional. La producción del mismo incluye la síntesis del grupo hemo y el aprovisionamiento de hierro. KLF1 coordina estos procesos regulando la expresión de la mayoría de las enzimas necesarias para convertir succinil-CoA y glicina en hemo, además de regular la expresión del transportador de transferrina y otras proteínas necesarias para la captación de hierro por las células eritroides. KLF1 también regula la exportación del grupo hemo con el átomo de hierro desde la mitocondria al citoplasma, así como el ensamblaje del grupo hemo con las globinas para formar la molécula definitiva de hemoglobina (Tallack & Perkins, 2010).

En resumen, KLF1 es un regulador global de la eritropoyesis, actuando a distintos niveles sobre la producción e integridad de las células eritroides.

8.6 LDB1 y LMO2

LDB1 es un componente del complejo activador GATA/SCL, que ha sido identificado como necesario para la formación del bucle de cromatina en el locus *HBB* en líneas celulares murinas. Los ratones que no poseen este factor no producen eritrocitos y mueren de diversas anomalías morfológicas y de anemia aproximadamente el día embrionario 9.5 (Dore & Crispino, 2011). Se ha comprobado la necesidad de este factor durante el desarrollo eritroide y megacariocítico, tanto en la etapa embrionaria como en la adulta; LDB1 también forma parte de la red de activación transcripcional de GATA-1. Su unión al ADN la realiza fundamentalmente como parte de un complejo activador (complejo GATA-1/SCL), y también participa en la formación de bucles e interacciones de larga distancia entre el locus *HBB* y otros genes dentro del cromosoma 7. Sin embargo, el propósito de tales interacciones no se conoce aún (Dore & Crispino, 2011).

LMO2, también conocido como RBTN2 o TTG2, es una proteína con dos dominios LIM similares a los dominios de unión al ADN de los factores GATA. Localizado en el brazo corto del cromosoma 11, el gen *LMO2* está implicado en la traslocación t(11;14) de leucemias linfoblásticas agudas propias de la infancia (Perry & Soreq, 2002). El fenotipo consecuencia de la pérdida de función de *LMO2* es idéntico al de la pérdida de *SCL*, lo cual es coherente con el descubrimiento de la interacción física de ambos factores con gran afinidad. *LMO2* forma parte también del complejo activador GATA-1/SCL, en el que junto con LDB1, forma un puente entre *SCL*/E2A unidos a una secuencia E-box, y GATA-1 unido a un motivo GATA situado a nueve pares de bases (Figura 18) (Cantor & Orkin, 2002). Los ratones carentes del factor *LMO2* mueren en torno al día embrionario 9 de anemia severa, sin hematopoyesis en el saco vitelino, lo que define un importante papel de este factor en la hematopoyesis temprana. Sin embargo, también se ha identificado la participación de *LMO2*, junto con *SCL* y GATA-1 en la formación y diferenciación de eritrocitos durante la embriogénesis (Perry & Soreq, 2002). Finalmente, también se ha observado la existencia de un complejo formado por *SCL*, E2A, *LMO2*, LDB1 y pRb con función represora génica en eritroblastos, probablemente con el objetivo de contrarrestar la activación transcripcional para limitar la diferenciación eritroide (Perry & Soreq, 2002).

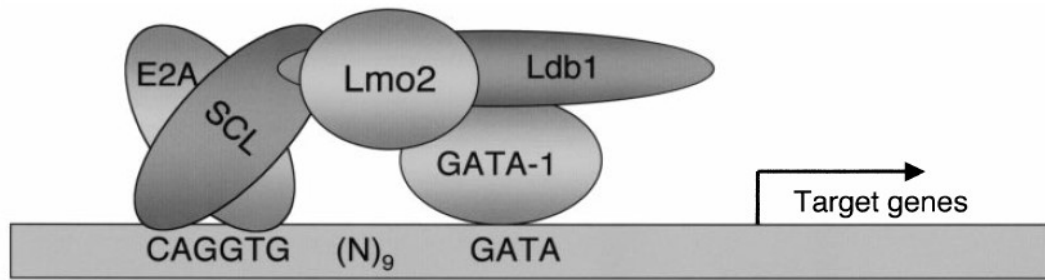


Figura 18. Complejo pentamérico formado por SCL, E2A, LMO2, LDB1 y GATA-1. Representación de una secuencia reguladora de ADN de un hipotético gen diana eritroide, que contiene un motivo E-box y un motivo GATA separados por nueve nucleótidos. SCL y E2A aparecen interactuando con el motivo E-box, y GATA-1 interactuando con el motivo GATA. Los factores LMO2 y LDB1 actúan como puente entre los factores de unión al ADN (Cantor & Orkin, 2002).

8.7 c-MYB

c-MYB fue descubierto como un homólogo celular del oncogén *v-MYB* vírico. Existen otras formas de *MYB* en los humanos, *a-MYB* y *b-MYB*. El producto del gen *c-MYB*, MYB, ha sido reconocido como un factor de transcripción crucial para la hematopoyesis y la eritropoyesis, concretamente para la maduración de los eritrocitos definitivos, y en la regulación de la expresión de hemoglobina fetal; y su expresión está finamente controlada durante las diferentes etapas de la hematopoyesis. Sin embargo, la desregulación de *c-MYB* es oncogénica; se han observado reordenamientos y translocaciones de este gen, conduciendo a expresiones aberrantes en linfomas y leucemias humanas, así como en otros tumores como el colorrectal, mamario y pancreático (Wang *et al*, 2018).

Estructuralmente, MYB consta de 3 dominios funcionales: dominio de unión al ADN, dominio de activación transcripcional y dominio regulador negativo. Sin embargo, los roles de cada uno de ellos no están aún completamente determinados. Como otros factores de transcripción, MYB es capaz de unirse al ADN. La secuencia consenso para la unión es 5'-YAACG/TG-3, y el dominio de unión al ADN de MYB se localiza en el extremo N-terminal de la proteína (Wang *et al*, 2018).

Es relevante como la regulación del gen *MYB* a través de *enhancers* situados en la región intergénica *HBS1L-MYB*, condicionan los niveles de hemoglobina fetal (Figura 19).

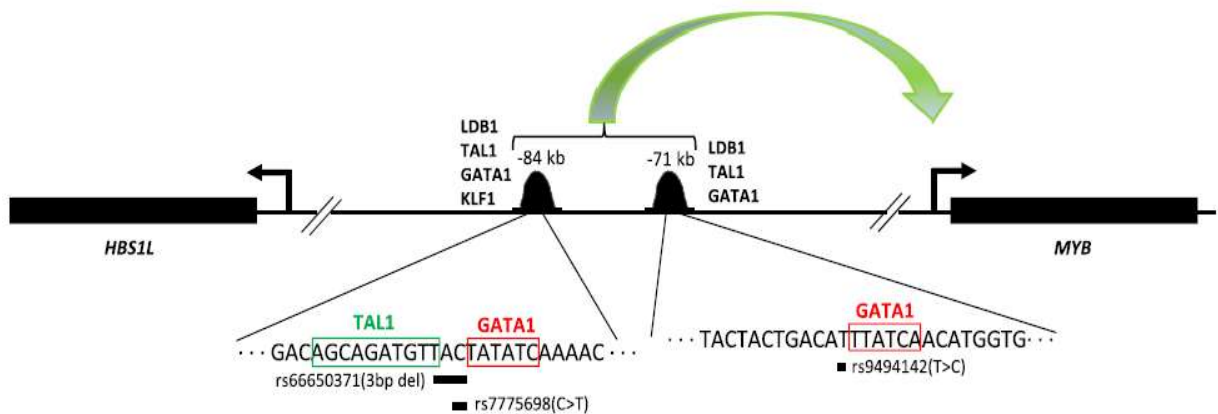


Figura 19. Región intergénica *HBS1L-MYB* en el cromosoma 6q23 con las 2 secuencias enhancer abarcando los SNPs asociados a los niveles de hemoglobina en adultos. La dirección de transcripción de *HBS1L* y *MYB* vienen indicadas con flechas negras. Los picos en las posiciones -84 y -71 indican la unión de factores de transcripción. Las partes ampliadas muestran la secuencia de ADN -84 y -71 posiciones más arriba del punto de inicio de la transcripción de *MYB*. Las secuencias consenso para *TAL1* y *GATA1* aparecen señaladas. Los tres SNPs asociados a los niveles de hemoglobina fetal en adultos están indicados. La flecha verde muestra las interacciones entre las secuencias enhancer y los promotores proximales (Wang *et al*, 2018).

Un conjunto de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) en la región intergénica *HBS1L-MYB* en el cromosoma 6 se han asociado con rasgos eritroides clínicamente relevantes (Figura 19). Entre estos rasgos, destaca la persistencia de hemoglobina fetal en adultos. Un pequeño número de estos SNPs muestran una asociación especialmente fuerte y se sitúan en una región de aproximadamente 24 kb llamada HMIP-2 (*HBS1L-MYB* Intergenic Polymorphism Block 2). Las variantes causales residen en 2 clusters dentro del HMIP-2, situadas a -84 y -71 kb de distancia de *MYB*. Los SNPs localizados en esta región alteran la unión de *enhancers* eritroides clave, afectando a las interacciones de largo alcance del gen *MYB* y a la expresión del propio gen, lo que proporciona una explicación para la asociación genética del HMIP-2 y los niveles de hemoglobina fetal y células F (Wang *et al*, 2018). *MYB* es el gen relevante en el HMIP-2, regulando los rasgos eritroides y los niveles de hemoglobina fetal. Existe evidencia de que el incremento de HbF es mediado, al menos parcialmente, a través de la regulación negativa de *MYB*. Del mismo modo, la expresión forzada de *c-MYB* en células K562 inhibe de forma significativa la expresión génica de γ -globina, en comparación con vectores control (Wang *et al*, 2018). El mecanismo exacto por el que *c-MYB* controla los niveles de HbF y otros rasgos eritroides no es aun completamente conocido. Lo que sí es conocido es la existencia de una clara anti-correlación entre *MYB* y los niveles de HbF, confirmada por la reducida expresión de *MYB* en las células eritroides de individuos con altos niveles de HbF. Una teoría propuesta para explicar el mecanismo de control de los niveles de HbF por *MYB* expone que la diferenciación acelerada en un ambiente de bajos niveles de *MYB* podría favorecer la terminación del ciclo celular de forma prematura durante los ciclos de proliferación celular de la eritropoyesis adulta, produciendo más células eritroides que sintetizarían predominantemente HbF (células F), antes del cambio a la síntesis de hemoglobina adulta. Por otro lado, también se ha observado que *c-MYB* activa directamente genes represores de γ -globina (Wang *et al*, 2018).

8.8 FOG-1

FOG-1 es una proteína de 998 aminoácidos que posee 9 dedos de zinc, a través de 4 de los cuales se une a GATA-1, concretamente al dedo de zinc del extremo N-terminal de GATA-1. Se expresa especialmente en eritrocitos y megacariocitos (Tsiftoglou *et al*, 2009; Cantor & Orkin, 2002). El fenotipo de ausencia de FOG-1 es similar a aquel de ausencia de GATA-1, observándose letalidad por anemia severa en la parte media del período embrionario, en torno al día embrionario 10.5-11.5. Sin embargo, los ratones FOG-1^{-/-}, a diferencia de los ratones GATA-1^{-/-}, muestran también fallo completo de la megacariopoyesis, lo que indica que FOG-1 posee funciones independientes de GATA-1 en las fases iniciales de la megacariopoyesis (Tsiftoglou *et al*, 2009; Cantor & Orkin, 2002).

La interacción entre FOG-1 y GATA-1 es esencial para la diferenciación eritroide, ya que se ha visto que proeritroblastos que expresan el factor GATA con una mutación puntual que impide la correcta interacción de GATA-1 con FOG-1, pero no la interacción de GATA-1 con el ADN, no consiguen llevar a cabo la maduración eritroide (Tsiftoglou *et al*, 2009). En una familia con anemia diseritropoyética congénita severa y trombocitopenia, se encontró una mutación similar, pero además, los megacariocitos de estos pacientes parecían megacariocitos murinos carentes de GATA-1, lo que sugiere la importancia de la interacción entre FOG-1 y GATA-1 sobre las fases finales de la megacariopoyesis (Cantor & Orkin, 2002). También se ha observado que la contribución de FOG-1 al proceso de eritropoyesis temprana es independiente de GATA-1, por lo que las funciones tempranas de FOG-1, independientes de GATA-1, difieren de las funciones tardías, dependientes de GATA-1, durante la maduración eritroide y megacariocítica (Perry & Soreq, 2002).

Se conoce que la interacción entre FOG-1 y GATA-1 da lugar a la activación y represión de genes diana de GATA-1. El mecanismo por el cual FOG-1 influencia estos procesos mediados por GATA-1 es aún incierto. Se propone que las secuencias reguladoras de genes específicos eritroides o megacariocíticos, contienen múltiples sitios de unión al ADN para GATA-1, pero situados a gran distancia. Según esta teoría, FOG-1, al poder interactuar con varias moléculas de GATA-1, puede actuar de puente. FOG-1 modificaría de este modo la conformación tridimensional del ADN, acercando *enhancers* lejanos a las proximidades del promotor, mediante la construcción de un bucle de ADN (Tsiftoglou *et al*, 2009; Cantor & Orkin, 2002). Otra posibilidad es aquella en la que FOG-1 provee un dominio de activación transcripcional, ya sea por sí mismo, o interactuando con otro coactivador transcripcional. Sin embargo, se ha comprobado en moléculas FOG-1 con mutaciones a lo largo de toda su secuencia, excepto en el dominio de unión a GATA-1, que la simple unión de FOG-1 y GATA-1 es suficiente para activar GATA-1, por lo que la idea de la existencia de un dominio de activación en GATA-1 es menos plausible (Cantor & Orkin, 2002).

9. PATOLOGÍA DE LA ERITROPOYESIS Y NUEVAS TERAPIAS

Según se ha descrito en los apartados anteriores de este trabajo, la eritropoyesis es un proceso complejo estrechamente regulado a varios niveles. Alteraciones en el proceso de formación de los eritrocitos pueden derivar en diversas patologías tales como talasemias, anemia falciforme o neoplasias de células rojas como la policitemia vera y otros.

La eritropoyesis patológica, con la consecuente anemia, es una de las principales causas de morbilidad sintomática en medicina interna (Valent *et al*, 2018). En muchos casos, la terapia tradicional se ha limitado al control de la anemia mediante transfusiones de eritrocitos, reposición con hierro oral o intravenoso, como ocurre en las anemias ferropénicas, o mediante ácido fólico o cobalamina en las anemias megaloblásticas. En las anemias con niveles de EPO endógena inadecuadamente bajas, por ejemplo, en la nefropatía crónica, el tratamiento con EPO o análogos (darbepoyetina alfa) cobra importancia. En cuanto a terapia farmacológica, se han usado fármacos como la hidroxiurea o la decitabina en el tratamiento de ciertas anemias, como la falciforme (Sankaran & Weiss, 2015).

El conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a estas patologías está proporcionando nuevas herramientas terapéuticas. Algunos ejemplos representativos de desórdenes de la eritropoyesis en los que se están desarrollando nuevas terapias son las talasemias, anemia falciforme y policitemia vera.

9.1 TALASEMIAS

Las deficiencias en la biosíntesis de hemoglobina que caracterizan los diferentes tipos de talasemia surgen de mutaciones en agrupaciones de genes de globina (*globin gene clusters*), que codifican las subunidades de globinas de la hemoglobina (Figura 20) (Benz, 2019).

Los genes codificantes para las globinas humanas están situados en 2 agrupaciones:

1. La agrupación de genes beta está localizada en el extremo del brazo corto del cromosoma 11, con una extensión de 70 kb. Contiene los genes de globina embrionarios (épsilon), fetal (gamma A y gamma G), y adulta (delta y beta). Estos genes codifican para la subunidad beta de la hemoglobina.
2. La agrupación de genes alfa está localizada en el brazo corto del cromosoma 16 y tiene una extensión de 40 kb. Contiene los genes embrionarios (zeta), y 2 copias (alfa 1 y alfa 2) del gen fetal /adulto (alfa), que codifican para la subunidad alfa de la hemoglobina (Benz, 2019).

Dentro de cada agrupación genética, los genes están separados por los extremos 5' y 3' por secuencias de ADN reguladoras: secuencias promotoras, secuencias *enhancer*, la región de control del locus (región genética que

interactúa con una serie de factores de transcripción en el inicio de la maduración eritroide para promover el acceso de la maquinaria transcripcional a las demás secuencias reguladoras del complejo genético) (Benz, 2019).

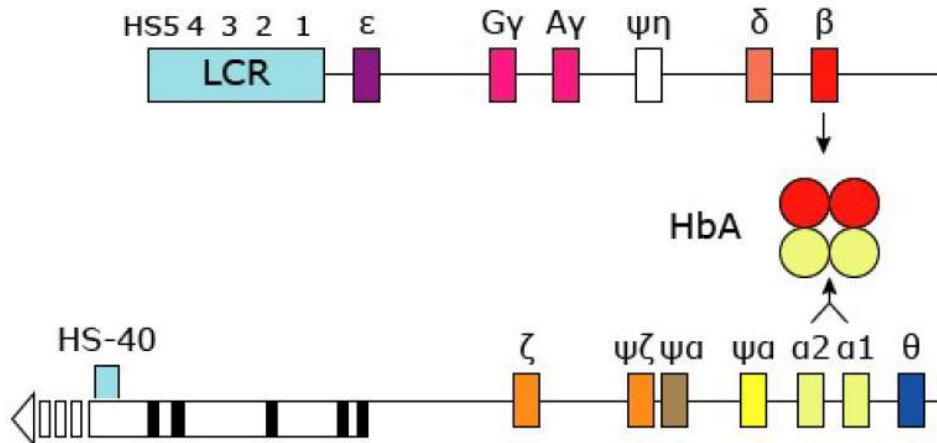


Figura 20. Representación esquemática de la agrupación génica de globina beta en el cromosoma 11 (panel superior), y de la agrupación génica de globina alfa en el cromosoma 16 (panel inferior). Ilustran la posición de los genes globínicos, la región de control del locus (LCR) de la agrupación génica beta, y los sitios de hipersensibilidad (HS). Después del nacimiento, los genes activos en el cluster beta son los que codifican las globinas gamma-G, gamma-A, delta y beta; los genes activos tras el nacimiento en el cluster alfa son el alfa-2 y alfa-1. Entre ambos paneles está la hemoglobina A (HbA), un tetrámero formado por 2 cadenas de globinas beta y 2 cadenas de globinas alfa (Benz, 2019).

La talasemia se refiere a un conjunto de trastornos caracterizados por una producción reducida o ausente de una (o más raramente, de dos o más) de las cadenas globínicas, afectándose el delicado equilibrio entre la producción de globinas alfa y no alfa (gamma o beta, por ejemplo) (Schrier, 2019a).

9.1.1 Alfa talasemia

La alfa talasemia se debe a la disminuida o nula producción de cadenas globínicas alfa, dando lugar a un exceso de globinas gamma en el feto y recién nacido, y a un exceso de globinas beta en el niño y el adulto. Aunque el exceso de globinas beta es capaz de formar homotetrámeros solubles (formado por 4 globinas beta, dan lugar a la Hemoglobina H), son inestables y algunas precipitan dentro de la célula, provocando el mal funcionamiento de los eritrocitos y una serie de manifestaciones clínicas (Schrier, 2019a).

Genéticamente, las talasemias son profundamente heterogéneas, ya que existen más de 100 mutaciones que afectan a todos los pasos necesarios para la correcta producción de hemoglobina. Las mutaciones más frecuentes son aquellas que afectan a la terminación de la traducción y al *splicing* del ARNm, mientras que deleciones y reordenamientos génicos, y defectos de la transcripción, estabilidad del ARNm o ensamblaje de la hemoglobina, son menos frecuentes. A pesar de esta heterogeneidad, se pueden utilizar ciertos términos clínicos para describir la expresión fenotípica de las alfa talasemias. Debido a la duplicación del gen alfa en humanos, cada individuo normalmente porta cuatro

genes de cadenas alfa, y podemos describir varios tipos de alfa talasemias:

1. Alfa talasemia (0): Esta entidad hace referencia a más de 20 mutaciones genéticas distintas del gen de la globina alfa, que provocan la delección de ambos loci en un cromosoma. Estos pacientes no pueden sintetizar cadenas alfa, ni por tanto, hemoglobina A, F o A2, lo que hace a esta condición incompatible con la vida.
2. Alfa talasemia (+): En este caso, más de 15 mutaciones genéticas provocan una disminución en la producción de globina alfa, debido a la delección de uno solo de los loci alfa del cromosoma afecto. Existen por tanto 3 formas de alfa talasemia (+), según el número de genes alfa heredados:
 - a. Herencia de 3 genes alfa normales (aa/a-): Esta situación se denomina alfa talasemia 2, o portador silencioso. Los sujetos son asintomáticos e incluso pueden ser hematológicamente normales. El diagnóstico se realiza mediante análisis de ADN.
 - b. Herencia de 2 genes alfa normales (a-/a-): Esta entidad se conoce como alfa talasemia menor. En ella, los sujetos son clínicamente normales, pero pueden tener ligera anemia junto con disminuciones del volumen corpuscular medio (MCV) y de la hemoglobina corpuscular media (MCH).
 - c. Herencia de 1 gen alfa normal (a-/--): Es conocida como enfermedad de hemoglobina H, debido a la formación de HbH, compuesta por tetrámeros de cadenas beta sobrantes. Estos pacientes tienen diferentes grados de anemia hemolítica, así como ligera eritropoyesis inefectiva, esplenomegalia, cambios óseos y sobrecarga de hierro (Schrier, 2019a).

9.1.2 Beta talasemia

La beta talasemia es una hemoglobinopatía heredada en la que la producción de una o ambas cadenas globínicas beta es deficiente. Se manifiesta clínicamente con anemia hemolítica y alteración en el manejo del hierro. Al igual que la alfa talasemia, la beta talasemia se puede clasificar según el grado de reducción de la globina beta:

1. Beta⁰ talasemia: Aquella en la que hay una completa abolición de la producción de cadenas beta. Los pacientes homocigotos para mutaciones de beta⁰ talasemia tienen la denominada beta talasemia mayor, no pueden producir cadenas beta, ni tampoco la hemoglobina adulta normal (hemoglobina A). Estos pacientes tienen graves anemias que requieren múltiples transfusiones y otras manifestaciones graves.
2. Beta⁺ talasemia: Está producida por mutaciones que disminuyen (pero no completamente) la producción de cadenas beta. Los pacientes homocigotos para mutaciones de beta⁺ talasemia pueden formar algo de hemoglobina A y clínicamente presentan una menor gravedad en comparación con la beta⁰ talasemia (Schrier, 2019b).

Del mismo modo que la alfa talasemia, las principales mutaciones genéticas son aquellas que afectan a la terminación de la traducción y al *splicing* del ARNm. Sin embargo, es destacable la relación entre mutaciones en el gen *GATA-1* y la beta talasemia. El gen *GATA-1* se localiza en el cromosoma X y

codifica para el factor de transcripción GATA-1, el cual es un importante activador de genes durante la eritropoyesis, incluyendo los genes de las globinas. En individuos con la mutación R216Q, se produce beta talasemia junto con trombocitopenia y anemia diseritropoyética. La causa de la afectación selectiva del locus beta es incierta, pero puede deberse al impacto de la mutación sobre el factor FOG-1 u otros factores, que afectan a la activación desregulada del gen de la beta globina (Benz, 2019).

9.1.3 Nuevas terapias en talasemias

Se han desarrollado pequeñas moléculas que están en fase de ensayo clínico para el tratamiento de las talasemias (Tabla 1), basadas en nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares de esta enfermedad.

1. Luspatercept (anteriormente llamado ACE-536) es un agente subcutáneo que secuestra la activina A, así como otros miembros de la familia de TGF-beta, los cuales parecen cumplir una importante función en la maduración de los eritrocitos. Luspatercept y otros fármacos similares como el Sotatercept, promueven la eritropoyesis y la formación ósea a través de un mecanismo independiente de la eritropoyetina (Benz & Angelucci, 2019). Los primeros estudios llevados a cabo sobre ratones, utilizando ortólogos murinos de estos fármacos demostraron mejoría sobre la anemia e incremento de la maduración de los eritroblastos. Estos efectos se han reproducido en ensayos clínicos de fase II en pacientes con beta talasemia, objetivándose menor necesidad de transfusiones en pacientes transfusión-dependientes, incrementos en los niveles de hemoglobina en pacientes no transfusión-dependientes, y reducción de la sobrecarga de hierro (valorada mediante la disminución de la concentración férrica hepática). Ambos fármacos fueron generalmente bien tolerados, sin efectos adversos importantes, siendo los más frecuentes el dolor musculoesquelético y cefalea. Actualmente se está llevando a cabo la fase III del ensayo clínico BELIEVE, multicéntrico y doble ciego, para evaluar la eficacia y seguridad del Luspatercept en pacientes con talasemia transfusión-dependientes (Zivot *et al*, 2018).
2. Las ADN metiltransferasas son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de grupos metilo a nucleótidos de citidina de ADN genómico. La ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) es una enzima modificadora de la cromatina que mantiene marcas de metilación en el ADN durante la división celular. La metilación del ADN es una estrategia de regulación epigenética, silenciando la expresión de los genes metilados en su promotor (Zivot *et al*, 2018). La decitabina es un análogo de citidina que provoca hipometilación del ADN a través de la inhibición de DNMT1. Un estudio piloto sugiere que la decitabina puede potencialmente activar la expresión de la globina gamma, incrementando los niveles de hemoglobina fetal y mejorando las cifras de hemoglobinas en pacientes con beta talasemia; además se observó una disminución global en los marcadores de eritropoyesis inefectiva, como LDH, bilirrubina indirecta y recuento reticulocitario. La tolerancia del fármaco fue buena, siendo la trombocitosis asintomática el principal efecto secundario (Benz & Angelucci, 2019; Zivot *et al*, 2018).
3. Los inhibidores de histona deacetilasa (HDACi) son un conjunto de

enzimas que regulan la expresión génica a través de la modificación de la cromatina. La acetilación de la cromatina es un mecanismo que relaja la estructura cromatínica, incrementando así la accesibilidad de los factores de transcripción a los genes diana, y por tanto potencia la expresión génica. Los butiratos son un tipo de HDACi que activan la expresión genética de globinas gamma y pueden elevar potencialmente los niveles de hemoglobina fetal y reducir la anemia (Zivot *et al*, 2018). La mayor parte de estos agentes se administran por vía intravenosa, lo que hace menos atractivo su uso rutinario. HQK-1001 es un derivado de ácidos grasos de cadena corta que se puede administrar por vía oral, y se ha observado ligeros aumentos de hemoglobina fetal en pacientes con beta talasemia intermedia o mayor (Benz & Angelucci, 2019). Sin embargo, el ensayo clínico en fase II fue cancelado, ya que en los análisis no se observaron incrementos significativos de hemoglobina fetal, pero sí empeoramiento de crisis vasooclusivas en el grupo experimental (Zivot *et al*, 2018).

4. La regulación positiva de JAK2 puede contribuir a la eritropoyesis inefectiva en la talasemia. En modelos murinos de talasemia mayor y menor, se ha observado un mayor porcentaje de células detenidas en la fase S del ciclo celular, con morfología de eritroblasto inmaduro. Tras tratamiento con Ruxolitinib, los ratones experimentaban una importante reducción en el tamaño del bazo, y una menor proporción de eritroblastos inmaduros respecto a eritroblastos maduros (Zivot *et al*, 2018). Ruxolitinib es un inhibidor de la kinasa JAK2, que ha mostrado en estudios disminuir las necesidades de transfusiones y el tamaño del bazo en pacientes con talasemia, lo que merece un estudio más profundo (Benz & Angelucci, 2019).
5. Terapia génica: se basa en la transferencia transducida viralmente de un gen de beta globina correctamente funcionando en células madre hematopoyéticas autólogas. La terapia génica para la talasemia es especialmente complicada porque requiere una expresión finamente regulada a largo plazo del gen reemplazado a niveles muy altos. El vector es crítico, puesto que debe haber una regulación precisa de la expresión de beta globina para igualar (y no exceder) los niveles de expresión de la globina alfa. La primera corrección satisfactoria de talasemia con un vector lentivirus, fue llevada a cabo en un modelo murino de talasemia intermedia, en la que se observó un incremento medio de hemoglobina de 3-4 g/dL por cada copia del vector, con corrección de los niveles de eritrocitos (Zivot *et al*, 2018). El primer ensayo terapéutico llevado a cabo en humanos se realizó en junio de 2007 en un paciente con talasemia mayor (transfusión-dependiente) con beta talasemia y hemoglobina E. El paciente recibió un régimen mieloablatoivo con busulfán y posteriormente, una infusión con un vector de beta-globina a partir de un lentivirus (β T87Q), transducido en células CD34+. El paciente consiguió la independencia respecto a las transfusiones, con unos niveles estables de hemoglobina en torno a 8.5-9 g/dL 2 años después de la infusión (Zivot *et al*, 2018). En un par de estudios llevados a cabo en 2018 se describe el uso de esta terapia génica en pacientes con beta talasemia severa, y se observaron beneficios clínicos sobresalientes (Benz & Angelucci, 2019).

Tabla 1. Nuevas estrategias terapéuticas en la beta talasemia (Zivot *et al*, 2018).

Company	Drug/Target	Mechanism	Eligibility	Route	Clintrials.gov	Status
a. Gene therapy						
Bluebird Bio	BB305 lentiviral vector (betibeglogene darolentivec)	Improved erythropoiesis	- Transfusion-dependent β -Thalassemia - age 12–35	IV	NCT01745120	Active, not recruiting - Phase 1/2
IRCCS San Raffaele	GLOBE lentiviral vector	Improved erythropoiesis	- Transfusion-dependent β -Thalassemia - age ≥ 3 and < 65	IV	NCT02453477	Open - Phase 1/2
b. Small molecule targets						
New England Research Institutes	Decitabine	HbF induction	- age ≥ 18 - TD β Thalassemia and HbE β -Thalassemia	Subcutaneously	NCT00661726	Completed - Phase 2
Medical College Kolkata	Decitabine	HbF induction	- age ≥ 18 - TDT and NDTT HbE β -Thalassemia	Subcutaneously	-	Completed - ASH 2017
Novartis Pharmaceuticals	INC424 (Ruxolitinib)	Jak 1/2 inhibitor	- age ≥ 18 - TDT β - Thalassemia - Splenomegaly - iron chelation $\times 4$ weeks	Oral	NCT02049450	Completed - Phase 2a
Acceleron	ACE-536 (Luspatercept)	Ligand trap TBG beta superfamily	- age ≥ 18 - TD and NDTT β -Thalassemia	Subcutaneously	NCT02268409	Active, not recruiting - Phase 2
Celgene	ACE-011 (Sotatercept)	Ligand trap TBG beta superfamily	- age ≥ 18 - TD and NDTT β -Thalassemia	Subcutaneously	NCT01571635	Active, not recruiting - Phase 2a

9.2 ANEMIA FALCIFORME

La anemia falciforme es un trastorno autosómico recesivo causado por una mutación puntual *missense* (GAG a GTG) causando la sustitución de una valina por un ácido glutámico en la posición 6 de la cadena globínica beta, lo que da lugar a la denominada hemoglobina S (Steinberg, 2019; Zivot *et al*, 2018).

Durante episodios de desoxigenación, la hemoglobina S tiene una característica adicional, la capacidad de polimerizar. Estos polímeros de hemoglobina S deterioran al eritrocito, incrementan su densidad, reducen su deformabilidad, incrementan su adhesividad y disminuyen su período de vida (Steinberg, 2019). La polimerización de la hemoglobina S es el evento central de la patogénesis de la anemia falciforme. Este polímero tiene la forma de fibra similar a una cuerda elongada, que se alinea con otras fibras, formando un fascículo, distorsionando la forma del eritrocito hasta dar lugar a la clásica forma de hoz, y disminuyendo la deformabilidad celular. La hemoglobina S puede polimerizar y depolimerizar continuamente según las condiciones de oxígeno, pero la membrana eritrocitaria solo puede aguantar un pequeño número de estos ciclos antes de deteriorarse de forma irreversible (Steinberg, 2019).

Los eritrocitos falciformes ocluyen capilares y arteriolas y producen interacciones endoteliales anormales y hemólisis crónica. Esto da lugar a anemia e hipoxia tisular que a su vez generan una serie de complicaciones agudas: crisis vasooclusivas dolorosas, ictus, priapismo y síndrome coronario agudo. Las complicaciones crónicas están relacionadas con la vasculopatía de pequeño y grande vaso, daño orgánico isquémico progresivo y hemólisis crónica: enfermedad cerebrovascular, retinopatía, hipertensión pulmonar, cálculos biliares, insuficiencia renal, hipoesplenismo, enfermedad ósea, hepatopatía y muerte prematura (Zivot *et al*, 2018). Por todo ello, se están investigando nuevas estrategias terapéuticas con posible aplicación en la anemia falciforme (Tabla 2).

9.2.1 Nuevas terapias en anemia falciforme

1. La terapia génica tiene el potencial de curar la anemia falciforme porque puede sustituir el gen de la beta globina defectuoso del paciente por una secuencia génica normal, o proporcionar una fuente adicional de cadenas similares a la beta globina (por ejemplo, gamma globina). Estudios *in vitro* y modelos animales han proporcionado evidencia sobre la factibilidad de estas técnicas, pero aún es necesario estudiar la seguridad y eficacia de los métodos de transporte génico (Rodgers, 2019).
 - a. Corrección del gen de la beta globina: La reconversión a la secuencia *wild type* en uno o ambos alelos del locus de la beta globina podría convertir la anemia falciforme en un rasgo de anemia falciforme (condición benigna) o en una hemoglobina adulta normal. La corrección y edición génica son procesos en los que se usa un gen de beta globina *wild type* como modelo para las endonucleasas para reparar la secuencia mutante (Rodgers, 2019).
 - b. Inserción de un gen de beta globina anti-falciforme: Consiste en crear una versión artificial del gen de la beta globina con la sustitución del aminoácido glutamina por treonina en la posición 87 (beta globina T87Q). Este cambio de aminoácidos no elimina la mutación patológica, pero replica la región de la secuencia de la gamma globina que se piensa que bloquea la polimerización de la hemoglobina S (Rodgers, 2019).
 - c. Gen de la gamma globina: la gamma globina es la fuente de cadenas no alfa para la hemoglobina fetal (HbF), la cual se expresa predominantemente en la gestación tardía y en la infancia temprana. El gen de la gamma globina es diferente al de la beta globina, y no contiene la mutación patológica. Existen modelos preclínicos en los que se han realizado estrategias de edición génica mediante endonucleasas CRISPR/Cas (clustered regulatory interspersed short palindromic repeat), para eliminar una región involucrada en el silenciamiento de la expresión de gamma globina, incrementando así los niveles de hemoglobina fetal (Rodgers, 2019; Zivot *et al*, 2018).
2. Agentes hipometilantes: La metilación del ADN contribuye al cambio de expresión de globinas, de la gamma globina a la beta globina, para pasar de formar HbF a HbA. En este caso, los análogos de nucleótidos como la 5-azacitidina o la decitabina pueden reducir esta metilación del ADN permitiendo una mayor expresión de globinas gamma y de HbF (Rodgers, 2019). Estos compuestos han demostrado incrementar la producción de HbF en pacientes con anemia falciforme, tanto en estudios con animales como en estudios en humanos. El primer ensayo clínico, cuyo objetivo era inducir la expresión de HbF a través de la inhibición de DNMT1, comenzó en 2012. Se combinó decitabina con tetrahidouridina, no observándose toxicidades significativas y objetivándose incrementos significativos en HbF (Zivot *et al*, 2018).
3. Inmunomoduladores: La talidomida es un fármaco originalmente desarrollado para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple. Lenalidomida y Pomalidomida son análogos de la talidomida de nueva generación, con una mayor eficacia sobre el mieloma múltiple y un mejor

perfil de efectos secundarios. Estos fármacos han mostrado ser potentes inductores de la HbF durante la diferenciación eritroide, tanto en modelos murinos de anemia falciforme como en células humanas CD34+ *in vitro* de pacientes con anemia falciforme. En ensayos clínicos se ha observado el incremento de HbF y de Hb total en pacientes con anemia falciforme tratados con Pomalidomida. Este agente evita el silenciamiento de la expresión de la gamma globina mediante la reprogramación transcripcional de los progenitores eritroides precoces (Zivot *et al*, 2018).

4. Inhibidores de histona deacetilasa: estudios preclínicos han demostrado elevaciones de la HbF con la inhibición no específica de las HDAC. La seguridad y tolerabilidad de Vorinostat se ha comprobado recientemente en una fase 1 de un ensayo clínico con 5 pacientes. También se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase 1 con el fármaco Panobinostat (Rodgers, 2019; Zivot *et al*, 2018). Otros inhibidores de la HDAC como los derivados butíricos han mostrado eficacia en los ensayos clínicos, pero están limitados por su administración parenteral (Zivot *et al*, 2018).

Tabla 2. Nuevas estrategias terapéuticas en la anemia falciforme (Zivot *et al*, 2018).

a. Gene therapy							
Bluebird Bio	BB305 lentiviral vector (betibeglogene darolentivec)	Anti-sickling β -globin	- Severe SCD - age \geq 18 years	IV	NCT02140554	Open	- Phase 1/2
Children's Hospital Medical Center, Cincinnati	Gamma globin lentiviral vector	Anti-sickling γ -globin	- Severe SCD - age 18-35	IV	NCT02186418	Open	- Phase 1/2
b. Small molecule targets							
Boston University	SIRT1	HbF induction					Early stage of development - pre-clinical
The Cleveland Clinic	Decitabine and tetrahydrouridine	HbF induction	- age \geq 18 years - HbSS, HbS β° , HbS β^+ , HbSC	Oral	NCT01685515	Completed	- Phase 1
Celgene	Pomalidomide	HbF induction	- age 18-60 - HbSS, HbS β°	Oral	NCT01522547	Completed	- Phase 1
Novartis Pharmaceuticals	Panobinostat	HbF induction	- age \geq 18 yers - HbSS, HbS β°	Oral	NCT01245179	Open	- Phase 1
Dana Farber Cancer Institute	Vorinostat (Zolinza)	HbF induction	- age 18-60 - HbSS, HbS β°	Oral	NCT01000155	Discontinued	- Phase 1/2

9.3 POLICITEMIA VERA

Según la nueva clasificación de la WHO (2017), las neoplasias eritroides incluyen la policitemia vera, los síndromes mielodisplásicos (MDS) con un componente eritroide predominante (antigua AML M6) y la eritroleucemia pura (Tabla 3).

Tabla 3. Neoplasias de células rojas (Valent et al, 2018)

Neoplasm	Key Features / Criteria
Myelodysplastic syndrome with erythroid predominance	Bone marrow cell dysplasia >50% erythroid cells and myeloblasts <20%
Pure erythroid leukemia	Proerythroblasts ≥30% and >80% of all BM cells are erythroid cells; myeloblasts <20%
Polycythemia vera	<i>JAK2</i> V617F or <i>CALR</i> mutations and myeloblasts <20% and WHO criteria for PV fulfilled

WHO: World Health Organization; BM: bone marrow; PV: polycythemia vera; *JAK2*: janus kinase 2; *CALR*: calreticulin.

La policitemia es aquella condición en la cual hay un aumento de la masa eritrocitaria, y se pueden reconocer dos tipos, la primaria y la secundaria. La policitemia secundaria es aquella causada por factores plasmáticos circulantes estimuladores de la eritropoyesis, como la EPO. Por otro lado, la policitemia primaria es debida a mutaciones genéticas adquiridas o heredadas que causan la proliferación y acumulación de los eritrocitos. Estas mutaciones ocurren en la policitemia vera y en otras policitemias heredadas con patrón dominante, causadas por mutaciones que provocan ganancia de función del gen del receptor de la eritropoyetina (Prchal, 2019).

La policitemia vera es un trastorno clonal mieloproliferativo de la médula ósea. Se caracteriza por el incremento de la masa eritrocitaria, asociado a la proliferación de las líneas eritroide, megacariocítica y granulocítica. Prácticamente siempre se debe a la mutación *JAK2*V617, la cual resulta en la activación constitutiva de la vía de señalización *JAK*/*STAT* dependiente de EPO. Esta activación provoca una serie de efectos, como el incremento de la fosforilación de *STAT5* en progenitores eritroides y la activación de las vías *PI3K* y *MAPK/ERK*. Además, *JAK2* puede entrar al núcleo celular y fosforilar la histona H3, ejerciendo un efecto directo sobre la regulación de la expresión genética (Zivot et al, 2018). Algunas de las nuevas estrategias terapéuticas en policitemia vera se basan en la inhibición de *JAK1/2* (Tabla 4).

Las manifestaciones clínicas se deben a la hiperviscosidad sanguínea, incluyendo trombosis arterial periférica, trombosis venosa profunda, ictus e infarto de miocardio. La principal causa de mortalidad se atribuye a las complicaciones trombóticas, pero la progresión a mielofibrosis y a leucemias agudas también supone una causa importante de morbilidad y mortalidad a largo plazo (Zivot et al, 2018).

9.3.1 Nuevas terapias en policitemia vera

1. Inhibidores *JAK*: el descubrimiento de la mutación *JAK2*, responsable de la policitemia vera, ha permitido el desarrollo de opciones terapéuticas dirigidas. Una de ellas es el ruxolitinib, cuya seguridad y eficacia en pacientes con policitemia vera resistente (o intolerantes) al tratamiento con hidroxiurea, fue comprobada en un ensayo clínico de fase 3 llamado

RESPONSE. Los resultados mostraron una superioridad de este fármaco respecto a la mejor terapia disponible en el control del hematocrito, reducción del volumen esplénico y mejoría de la sintomatología, como prurito o sudoración nocturna. La toxicidad observada se limitaba a anemia, trombocitopenia e infecciones por herpes zóster en un 2%, 3% y 6% respectivamente (Zivot *et al*, 2018). Sin embargo, las guías terapéuticas recomiendan hidroxiurea, interferón o busulfán como tratamientos de primera línea, eligiendo el ruxolitinib en las siguientes circunstancias:

- a. Esplenomegalia sintomática que no responde al tratamiento con hidroxiurea, interferón o busulfán.
 - b. Prurito prolongado y severo que no responde a interferón
 - c. Mielofibrosis post-policitemia vera con indicaciones que se espera mejoría con tratamiento con ruxolitinib (Tefferi, 2019).
2. HDACi: se han observado niveles aumentados de actividad de histona deacetilasa en la policitemia vera. El vorinostat, un inhibidor de HDACs ha mostrado en un ensayo clínico de fase 2 su capacidad para disminuir la carga alélica de JAK2 V617F, reducir la esplenomegalia y normalizar los niveles de plaquetas y leucocitos. Los principales efectos adversos encontrados fueron diarrea, fatiga, deterioro renal, náuseas y pérdida del cabello. El givinostat es un inhibidor de HDACs de clase I y II, actualmente en investigación acerca de su eficacia y seguridad en pacientes con policitemia vera. Los ensayos en fase 2 en pacientes no respondedores a hidroxiurea, demostraron una respuesta hematológica significativa y resolución del prurito y esplenomegalia (Zivot *et al*, 2018).

Tabla 4. Nuevas estrategias terapéuticas en la policitemia vera (Zivot *et al*, 2018)

Company	Drug	Mechanism	Eligibility	Route	Clintrials.gov	Status
Small molecules targets						
Incyte Coproration Novartis	Jak 1/2 inhibitor (ruxolitinib) vs BAT	Cytoreduction	- age ≥ 18 years	Oral	NCT01243944	Active, not recruiting - Phase 3
Incyte	Jak 1/2 inhibitor (ruxolitinib) vs HU	Cytoreduction	- age ≥ 18 years	Oral	NCT01632904	Completed - Phase 3
AOP Orphan Pharmaceuticals AG	Pegylated interferon alpha-2b (AOP2014) vs HU	Cytoreduction	- age ≥ 18 years	subcutaneously	NCT01949805	Completed - Phase 3
Roskilde University Hospital,	Vorinostat	Cytoreduction	- age ≥ 18 years	Oral	-	Completed - Phase 2
Italfarmac	Givinostat vs HU	Cytoreduction	- age ≥ 18 years	Oral	NCT00928707	Completed - Phase 2

10. CONCLUSIONES

En los últimos años ha habido un enorme avance en nuestro conocimiento sobre los mecanismos que regulan la eritropoyesis a nivel fisiológico y cómo su desregulación puede dar lugar a diferentes enfermedades. Los mecanismos de control molecular de la eritropoyesis por las diferentes vías de señalización, principalmente por eritropoyetina, así como los reguladores genéticos, epigenéticos y transcripcionales están siendo dilucidados. Alteraciones en algún punto del proceso o de la maquinaria dan lugar a diferentes patologías que, hasta hace relativamente poco tiempo, eran tratadas o bien de forma sintomática, o bien con fármacos poco selectivos. Gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares y los reguladores críticos implicados en la patogénesis de las mismas, hemos sido capaces de desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas mucho más eficaces para el tratamiento de estas enfermedades. Como consecuencia, diversas nuevas terapias están actualmente en fase de ensayos clínicos con resultados muy prometedores.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Barminko J, Reinholt B & Baron MH (2016) Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. *Dev. Comp. Immunol.* **58**: 18–29
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.012>
- Bauer DE, Kamran SC & Orkin SH (2012) Reawakening fetal hemoglobin : prospects for new therapies for the beta-globin disorders. *Blood* **120**: 2945–2953
- Benz EJ (2019) Molecular genetics of the thalassemia syndromes. : 1–24
Available at: [https://www.uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/molecular-genetics-of-the-thalassemia-syndromes?search=molecular genetics of thalassemia syndromes&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/molecular-genetics-of-the-thalassemia-syndromes?search=molecular%20genetics%20of%20thalassemia%20syndromes&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
- Benz EJ & Angelucci E (2019) Management and prognosis of the thalassemias. : 1–41 Available at: [https://www.uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/management-and-prognosis-of-the-thalassemias?search=management of thalassemias&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/management-and-prognosis-of-the-thalassemias?search=management%20of%20thalassemias&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
- Cantor AB & Orkin SH (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: An affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**: 3368–3376
- Ciriza J, Thompson H, Petrosian R, Manilay JO & García-Ojeda ME (2013) The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: Lessons learned and possible clinical applications. *Exp. Hematol.* **41**: 411–423
- Dore LC & Crispino JD (2011) Transcription factor networks in erythroid cell and megakaryocyte development. *Blood* **118**: 231–240
- Doulatov S, Notta F, Laurenti E & Dick JE (2012) Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell* **10**: 120–136 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dulmovits BM, Hom J, Narla A, Mohandas N & Blanc L (2017) Characterization, regulation, and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* **24**: 159–166
- Fujiwara T (2017) GATA Transcription Factors : Basic Principles and Related Human Disorders. *Tohoku J. Exp. Med* **242**: 83–91
- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J & Lodish HF (2011) From stem cell to red cell : regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins , RNAs , and chromatin modifications. *Blood* **118**: 6258–6269
- Hoffbrand AV, Catovsky D & Tuddenham EG. (2014) Postgraduate Haematology Fifth. Oxford

- Ingley E, Tilbrook PA & Klinken SP (2004) New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life* **56**: 177–184
- Kaneko H, Shimizu R & Yamamoto M (2010) GATA factor switching during erythroid differentiation. *Curr. Opin. Hematol.* **17**: 163–168
- Kim SI & Bresnick EH (2007) Transcriptional control of erythropoiesis: Emerging mechanisms and principles. *Oncogene* **26**: 6777–6794
- Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J & Loscalzo J (2012) Harrison. Principios de Medicina Interna 18th ed. McGraw-Hill
- Moriguchi T & Yamamoto M (2014) A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int. Journal Hematol.* **100**: 417–424
- Nandakumar SK, Ulirsch JC & Sankaran VG (2016) Advances in Understanding Erythropoiesis: Evolving Perspectives. *Br J Haematol.* **173**: 206–218
- Orkin SH & Zon LI (2008) Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **132**: 631–644
- Perreault AA & Venters BJ (2018) Integrative view on how erythropoietin signaling controls transcription patterns in erythroid cells. *Curr. Opin. Hematol.* **25**: 189–195
- Perry C & Soreq H (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis fine tuning of combinatorial multi-domain elements. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3607–3618
- Prchal JT (2019) Molecular pathogenesis of congenital polycythemic disorders and polycythemia vera. : 1–21 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/molecular-pathogenesis-of-congenital-polycythemic-disorders-and-polycythemia-vera?search=pathogenesis polycitemia vera&source=search_result&selectedTitle=1~108&usage_type=default&display_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/molecular-pathogenesis-of-congenital-polycythemic-disorders-and-polycythemia-vera?search=pathogenesis%20polycitemia%20vera&source=search_result&selectedTitle=1~108&usage_type=default&display_rank=1)
- Rodak B (2004) Hematología 2nd ed. Editorial Médica Panamericana
- Rodgers GP (2019) Investigational therapies for sickle cell disease. : 1–24 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/investigational-therapies-for-sickle-cell-disease?search=therapies sickle cell disease&source=search_result&selectedTitle=6~150&usage_type=default &display_rank=6](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/investigational-therapies-for-sickle-cell-disease?search=therapies%20sickle%20cell%20disease&source=search_result&selectedTitle=6~150&usage_type=default&display_rank=6)
- Sanada C, Xavier-Ferrucio J, Lu Y, Min E, Zhang P & Zou S (2016) Adult Human Megakaryocyte-Erythroid Progenitors are in the CD34 + CD38mid fraction. *Blood* **128**: 922–933
- Sankaran VG & Weiss MJ (2015) Anemia: Progress in molecular mechanisms

and therapy. *Nat. Med.* **21**: 221–230

Schrier SL (2019a) Pathophysiology of alpha thalassemia. : 1–28 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/pathophysiology-of-alpha-thalassemia?search=pathophysiology of alfa thalassemas&source=search_result&selectedTitle=1~97&usage_type=default&display_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/pathophysiology-of-alpha-thalassemia?search=pathophysiology%20of%20alfa%20thalassemias&source=search_result&selectedTitle=1~97&usage_type=default&display_rank=1)

Schrier SL (2019b) Pathophysiology of beta thalassemia. : 1–26 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/pathophysiology-of-beta-thalassemia?search=pathophysiology beta thalassemas&source=search_result&selectedTitle=1~87&usage_type=default&display_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/pathophysiology-of-beta-thalassemia?search=pathophysiology%20beta%20thalassemia&source=search_result&selectedTitle=1~87&usage_type=default&display_rank=1)

Siatecka M & Bieker JJ (2011) The multifunctional role of EKLF / KLF1 during erythropoiesis. *Blood* **118**: 2044–2055

Steinberg MH (2019) Sickle hemoglobin polymer : Structure and functional properties. : 1–19 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/sickle-hemoglobin-polymer-structure-and-functional-properties?search=sickle hemoglobin polymer&source=search_result&selectedTitle=1~79&usage_type=default&display_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/sickle-hemoglobin-polymer-structure-and-functional-properties?search=sickle%20hemoglobin%20polymer&source=search_result&selectedTitle=1~79&usage_type=default&display_rank=1)

Tallack MR & Perkins AC (2010) KLF1 Directly Coordinates Almost All Aspects of Terminal Erythroid Differentiation. *Life* **62**: 886–890

Tefferi A (2019) Prognosis and treatment of polycythemia vera. : 1–33 Available at: [https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera?search=treatment polycitemia vera&source=search_result&selectedTitle=1~108&usage_type=default&display_rank=1](https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/prognosis-and-treatment-of-polycythemia-vera?search=treatment%20polycitemia%20vera&source=search_result&selectedTitle=1~108&usage_type=default&display_rank=1)

Till J & McCulloch E (1961) A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* **14**: 213–222

Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS & Strouboulis J (2009) Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* **61**: 800–830

Valent P, Büsche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, Sotlar K, Füreder W, Bettelheim P, Oberbauer R, Sperr WR & Geissler K (2018) Normal and pathological erythropoiesis in adults : from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica* **103**: 1593–1603

Wang X, Angelis N & Thein SL (2018) MYB – A regulatory factor in hematopoiesis. *Gene* **665**: 6–17 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.065>

Zivot A, Lipton JM, Narla A & Blanc L (2018) Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Mol. Med.* **24**: 11 Available at: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s10020-018-0011-z>

