

Eritropoietina: prospettive nella terapia cardiovascolare

Erythropoietin: a new perspective in cardiovascular therapy

Riccardo Raddino, Debora Robba, Giorgio Caretta, Ivano Bonadei, Melissa Teli, Gregoriana Zanini, Alberto Madureri, Enrico Vizzardi, Livio Dei Cas

ABSTRACT: *Erythropoietin: a new perspective in cardiovascular therapy. R. Raddino, D. Robba, G. Caretta, I. Bonadei, M. Teli, G. Zanini, A. Madureri, E. Vizzardi, L. Dei Cas.*

Erythropoietin is a hormone produced by the kidney, which regulates proliferation, differentiation and maturation of red cells. Recombinant human EPO (rH-EPO) is well known to correct anaemia in patients with chronic renal failure in terminal stage. However, recent studies showed the existence of several not haematopoietic effects of erythropoietin. EPO receptors have been found to be expressed in several tissues, included the cardiovascular system. An increase in cardiac systolic function has been observed in patients with chronic heart failure treated with EPO. Other

beneficial effects appear to be related to the pro-angiogenic properties on endothelial cells and could be useful for treatment of ischemic heart disease. These findings suggest that EPO could provide potential therapeutic benefits in the management of cardiovascular diseases beyond anaemia correction. This review focuses its attention on the pleiotropic effects of EPO and its future promising applications in cardiovascular pathology.

Keywords: Erythropoietin, Apoptosis, Anemia, Ischemia, Myocardial infarction, Heart failure.

Monaldi Arch Chest Dis 2008; 70: 206-213.

Sezione Malattie Cardiovascolari, Dipartimento Medicina Sperimentale Applicata, Università degli Studi di Brescia.

Corresponding author: Riccardo Raddino; Divisione di Cardiologia - P.le Spedali Civili, I-25123 - Brescia, Italy; E-mail address: riccardo.raddino@libero.it

Introduzione

L'eritropoietina o EPO è un ormone glicoproteico prodotto negli esseri umani dai reni e in misura minore dal fegato e dal cervello, che ha come funzione principale quella di regolare l'eritropoiesi. Durante un insulto ischemico, le cellule di mammifero vengono stimolate ad esprimere una varietà di proteine tra le quali il fattore inducibile dell'ipossia 1a (HIF-1a), che aumenta esponenzialmente al decrescere della concentrazione di ossigeno cellulare [1]. L'incremento dei livelli di HIF-1a porta ad una conseguente espressione di diverse proteine tra cui l'EPO, promuovendo quindi la sopravvivenza e la proliferazione dei precursori eritroidi [2]. La produzione di eritropoietina è anche direttamente stimolata dall'ipossia, infatti, la concentrazione dell'ormone aumenta quando l'emoglobina (Hb) scende al di sotto dei 12 g/dl.

Come conseguenza, dopo alcuni giorni, si verifica un incremento del numero dei reticolociti nel sangue periferico e dopo circa due settimane un significativo aumento dei valori dell'ematocrito (HCT) con vantaggiose ripercussioni cliniche.

In commercio sono attualmente disponibili tre tipi di agenti stimolanti l'eritropoiesi, due dei quali sono eritropoietine umane ricombinanti (rH-EPO), epoletina α ed epoletina β , e un analogo sintetico dell'EPO umana, la darbepoietina, un composto dotato di lunga durata d'azione ed emivita prolungata rispetto alle rH-EPO [3].

È noto che la maggioranza dei pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico (SCC) presentano anemia. In tali pazienti è stato notato un aumento delle concentrazioni di EPO, tuttavia insufficiente per controbilanciare la diminuzione dei livelli di Hb [4]; infatti, uno studio ha mostrato come la terapia con eritropoietina ricombinante, oltre a correggere i livelli di emoglobina, aumenti significativamente la funzione cardiaca e la qualità di vita [5].

L'esatto meccanismo di questi effetti è sconosciuto.

In una review, Noakes ha sottolineato che se il ruolo dell'EPO fosse limitato soltanto ad aumentare la capacità di trasporto di ossigeno del sangue, essa avrebbe un ruolo solo nell'esercizio massimale di breve durata che dipende strettamente dalla capacità di rilascio di ossigeno ai muscoli; in realtà tale ormone ha effetti molto più duraturi che suggeriscono il ruolo di altri meccanismi [6].

Recentemente è stato riportato un ruolo protettivo nelle malattie cardiovascolari [7, 8, 9] con la somministrazione di rH-EPO: durante il danno ischemia-riperfusion (IR) nel cuore e nel cervello isolato di ratto è stata evidenziata una riduzione dell'estensione infartuale mediante pre-trattamento con eritropoietina; sebbene gli effetti favorevoli di questi cambiamenti EPO-correlati siano per la maggior parte sconosciuti, i possibili meccanismi di cardioprotezione sembrano dipendere dalle proprietà antiapoptotiche e antiossidanti dell'EPO [10] e al suo potenziale proangiogenico [11] (vedi dopo).

Scopo di questa revisione è quello di discutere gli effetti pleiotropici dell'eritropoietina sul sistema cardiovascolare, così come le sue potenziali nuove applicazioni in ambito clinico.

Effetti antiapoptotici dell'EPO

Gli effetti fisiologici dell'EPO vanno ben oltre l'eritropoiesi: è ormai noto che tale ormone esercita la sua azione non solo sulle cellule eritroidi, ma anche su numerosi altri tessuti e organi che presentano i suoi recettori, come tessuto muscolare, cervello, midollo spinale, retina, gonadi, polmone, intestino, pancreas, utero e reni [12].

Nell'embrione l'EPO è necessaria per la proliferazione dei miociti cardiaci [13].

La maggior parte degli effetti antiapoptotici dell'EPO sono emersi in ambito ematologico. L'EPO è il regolatore principale dell'eritropoiesi e promuove la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici eritroidi; essa serve anche, in minima parte, a proteggere gli eritroblasti immaturi dalla morte apoptotica cellulare. Studi effettuati sulle linee cellulari eritroidi precoci umane dimostrano che la proliferazione cellulare EPO-mediata è principalmente dovuta all'attivazione della cascata MAPK p42/44 o JAK2-STAT5, mentre l'inibizione dell'apoptosi dalla attivazione dall'asse PI3K-AKT o dalla via JAK2-STAT5 [14]. In quest'ultimo caso, JAK2 fosforilata porta all'attivazione di STAT5, con la conseguente traslocazione del fattore di trascrizione nel nucleo, dove si lega agli specifici elementi responsivi del DNA, inducendo una cascata di risposte cellulari che includono l'espressione di geni antiapoptotici, come bcl-2 e bcl-XL [15, 16].

I meccanismi antiapoptotici descritti al riguardo sono importanti non solo nell'eritropoiesi, ma sembrano anche giocare un ruolo di rilievo in tutte le altre condizioni caratterizzate dalla perdita di cellule mediante apoptosi come lo stroke, malattie retiniche e condizioni quali l'infarto del miocardio e lo scompenso cardiaco congestizio [17, 18, 19].

Molti recettori dell'EPO sono presenti nella sostanza bianca e nei neuroni motori del midollo spinale. In alcuni esperimenti condotti su ratti, subito dopo aver indotto un danno ischemico sperimentale sul midollo spinale, è stata somministrata eritropoietina che ha provocato un quasi completo recupero della funzione motoria. La differenza tra animali trattati con EPO e quelli trattati con soluzione salina, già visibile dopo un'ora, diventava ancor più evidente dopo 48 ore. Alla valutazione istopatologica, gli animali non trattati mostravano una degenerazione neuronale assai diffusa, mentre appariva notevolmente ridotta nel midollo spinale degli animali che ricevevano il trattamento con EPO [20, 21].

È stato indicato che a livello encefalico, così come nel rene, la produzione endogena di eritropoietina è stimolata dall'ipossia e che un'aggiunta di EPO esogena può proteggere i neuroni dall'ischemia. Il trattamento con EPO ventiquattro ore prima di un'ischemia cerebrale attenua il danno dovuto allo stroke, riducendo la dimensione dell'area infartuata, minimizzando il verificarsi della morte cellulare programmata e limitando l'estensione delle modificazioni irreversibili in sede peri-infartuale.

Più specificatamente riguardo all'attività antiapoptotica dell'EPO, uno studio condotto da Chong *et al.* ha documentato che nelle cellule endoteliali della microcircolazione cerebrale esposte a danno da ischemia-riperfusion, il trattamento con eritropoietina riduce l'attivazione della cascata mitocondriale dipendente dalla modulazione del fattore apoptotico 1 che attiva le proteasi (Apaf-1) e il rilascio di citocromo c. Analogamente l'EPO inibisce anche l'attivazione di caspasi-9 e le attività caspasi-3-like [22].

Lo stesso gruppo di ricercatori in uno studio precedente ha dimostrato come l'EPO possa garantire una nuova citoprotezione durante il danno vascolare ischemico attraverso la modulazione diretta della fosforilazione di AKT1, del potenziale di membrana mitocondriale e dell'attività della proteasi cisteina [23]. Inoltre nei ratti con stroke embolico, l'EPO aumentava la densità di microvasi nella periferia dell'area necrotica e migliorava il recupero funzionale [24]. Analogamente, nei ratti esposti per 60 minuti a ischemia cerebrale transitoria, l'infusione di EPO (5000U/Kg) al momento dell'occlusione riduceva le dimensioni dell'infarto del 75% e attenuava marcatamente l'incidenza di apoptosi neuronale [25]. Gli effetti benefici del trattamento con eritropoietina sono anche stati documentati nel sistema nervoso periferico del ratto, dove sembra essere implicata nella riduzione della velocità di conduzione nervosa che si verifica in corso di neuropatia diabetica nel modello animale del ratto [26]. Allo stesso modo nel modello di danno ischemico retinico l'EPO, somministrata al momento dell'insulto ischemico o appena dopo riduce drammaticamente tale danno, mentre i recettori solubili dell'eritropoietina, antagonizzando l'EPO intrinseca, incrementano l'estensione del danno ischemico [27]. Infine nei ratti sottoposti a nefrectomia la darbepoietina sottocute, iniettata una volta a settimana, migliora la sopravvivenza, rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica (63% vs 33%, $p < 0,05$), nonostante un eguale ematocrito in entrambi i gruppi. Tra gli effetti documentati, apparentemente correlati ad un meccanismo antiapoptotico, si annoverano la riduzione del danno endoteliale e tubulointerstiziale e un miglioramento nella sclerosi vascolare e glomerulare [28].

Ruolo dell'EPO nell'angiogenesi

Oltre agli effetti antiapoptotici sono state descritte altre importanti proprietà dell'eritropoietina.

Ad esempio in uno studio di Juul *et al.* è stata rilevata la presenza di EPO e del suo recettore (EPOr) nel tessuto fetale umano; nonostante il cuore avesse presentato minori quantità di tale ormone, il suo recettore era abbondantemente espresso nel miocardio fetale, aumentando con il progredire della gravidanza, e persistendo nel tessuto cardiaco adulto [29]. L'espressione di EPOr nel cuore completamente sviluppato è stata confermata da un più recente studio condotto sul cuore di ratto [30]. Esperimenti condotti su ratti knock-out per il gene che esprime EPO ed EPOr e affetti da ipoplasia ventricolare hanno messo in evidenza il suo ruolo nel tessuto cardiaco. L'ipoplasia, infatti, sembra essere indipendente dallo stato ipossico ed è probabilmente dovuta ad una

riduzione del numero di cardiomiociti proliferanti nel miocardio ventricolare. Per supportare questo concetto ulteriori esperimenti sono stati condotti in vitro: ad esempio Wu et al. hanno scoperto che l'EPO agisce come un fitogeno nei cardiomiociti isolati dai topi EPO^{-/-} e wild type, mentre non ha effetto nei topi EPO^{r/-} [31], suggerendo che l'eritropoietina e il suo recettore, almeno durante la vita fetale, stimolino la proliferazione dei cardiomiociti. Altra osservazione interessante è che, nel ratto privo del gene dell'eritropoietina, la vascolarizzazione è disorganizzata: anziché reti vascolari fini e interconnesse il cuore EPO^{r/-} presentava grovigli vascolari dilatati e indipendenti. Ad avvalorare tale ipotesi contribuiscono studi effettuati su topi nefrectomizzati con insufficienza renale moderata e bassi livelli di eritropoietina che hanno mostrato una carenza di microvasi nel cuore [32]. L'espressione di EPO^r è stata dimostrata sulle cellule endoteliali sia in vivo che in vitro [33]. La stimolazione di cellule endoteliali coltivate con rH-EPO ha indotto proliferazione cellulare e differenziazione delle strutture vascolari; l'incubazione di anelli aortici di ratto con rH-EPO ha favorito lo sviluppo endoteliale [34]. In un lavoro di Jacquet *et al.* sono state messe a confronto le proprietà angiogeniche dell'eritropoietina con il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) sulle cellule endoteliali cardiache, e si è notato che entrambe le proteine possiedono un sovrapponibile potenziale angiogenico, suggerendo quindi un ruolo di rH-EPO nei processi vasoproliferativi [35].

L'aumento dei livelli di HIF-1 α non è implicato soltanto con l'espressione di EPO, come precedentemente descritto, ma anche di VEGF, fattore in grado di causare angiogenesi a livello miocardico [36]. Altri dati hanno dimostrato che VEGF gioca un ruolo importante nello scompenso cardiaco, e in particolare nella cardiomiopatia dilatativa idiopatica (CDI) [37]. Infatti, nella CDI è stata osservata una riduzione della capillarizzazione sproporzionata rispetto al grado di ipertrofia, contribuendo al disequilibrio tra richiesta e disponibilità di ossigeno. Apparentemente il motivo di questa capacità angiogenica ridotta potrebbe risiedere nella diminuita espressione di VEGF nella CDI. D'altra parte, SCC è anche associato ad una progressiva perdita di cellule cardiache, dovuta, almeno in parte, ad un meccanismo apoptotico [38, 39]. Dal momento che la riduzione della capillarizzazione e l'incremento dell'apoptosi sembrano giocare un ruolo rilevante nella patogenesi dell'insufficienza cardiaca ne consegue che l'uso di rH-EPO, visti i suoi vantaggiosi effetti anti-apoptotici e proangiogenici, potrebbe risultare clinicamente utile per ostacolare, o addirittura prevenire, lo sviluppo e la progressione dello scompenso cardiaco.

Più recentemente è stato evidenziato da Kawamoto e coll. che le cellule progenitrici endoteliali del midollo osseo (EPCs), che presentano alcuni antigeni di superficie in comune con le cellule staminali, vengono mobilizzate verso il sangue periferico e reclutate dai foci di neovascolarizzazione fisiologica e fisiopatologica, determinando neof ormazione endoteliale [40]; tale effetto è dovuto, in parte, alla mobilizzazione dell'eritropoietina dal midollo osseo. La rilevanza fisiopatologica di queste scoperte è stata ulteriormente valorizzata da

studi effettuati in pazienti con patologia coronarica, nei quali i livelli di EPO sierica sono risultati associati ad un aumento significativo di EPCs funzionalmente attive [41]. Da questi studi si potrebbe quindi evincere che la terapia con eritropoietina nei pazienti con malattia coronarica o scompenso cardiaco congestizio potrebbe risultare benefica grazie alla mobilizzazione dei precursori delle cellule endoteliali derivati dal midollo osseo.

RH-EPO nell'ischemia miocardica e nell'infarto

Diversamente dalla necrosi cellulare, universalmente riconosciuta come il prototipo di morte cellulare ischemica, solo da alcuni anni l'apoptosi è stata coinvolta nella patogenesi del danno cardiaco da ischemia/riperfusion (IRI). Le caspasi sono enzimi che, attivandosi con un meccanismo a cascata, sono responsabili dell'iniziazione, esecuzione e finalizzazione del processo apoptotico; è stato ripetutamente dimostrato che un'inattivazione di tali enzimi risulta connessa ad un miglior recupero post-ischemico della funzione cardiaca dovuto ad un meccanismo d'azione antiapoptotico. In linea con queste scoperte diversi studi hanno evidenziato effetti benefici dell'eritropoietina, interamente correlati all'emopoiesi, nell'ambito dell'IRI [42].

In ratti ai quali è stata somministrata una singola dose di EPO (3000 U/kg) subito dopo la chiusura della coronaria sinistra è stata notata una riduzione dell'apoptosi del 50% e una riduzione delle dimensioni dell'infarto [43]. Allo stesso modo isolando cuori di ratto esposti a IRI e perfusi con l'ormone si otteneva una riduzione della morte cellulare, così come una migliore ripresa funzionale e un maggiore flusso coronarico rispetto agli animali non trattati [44]. Partendo dalla prima settimana dopo l'intervento fino a otto settimane di follow up, le dimensioni telesistoliche e telediastoliche del ventricolo sinistro risultavano significativamente minori nei ratti trattati con eritropoietina, mentre la frazione di accorciamento era maggiore, nonostante l'aumento non statisticamente significativo dell'ematocrito.

In un ulteriore studio, la somministrazione dell'EPO dopo la chiusura della coronaria causava una significativa riduzione nelle dimensioni dell'infarto, mentre l'incubazione con tale ormone dei mioblasti di ratto in coltura riduceva l'estensione della frammentazione del DNA indotta o dalla deprivazione sierica o dallo stress ossidativo mediato da perossido di idrogeno [45].

Successivamente è stato evidenziato come l'eritropoietina, somministrata o prima della legatura della coronaria o al momento della riperfusion, e, successivamente, ogni giorno per l'intera durata della sperimentazione, aumentava la pressione ventricolare telediastolica (LVTDP) e induceva uno shear stress maggiore rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica [46].

Considerevoli risultati sono stati ottenuti in numerosi studi condotti in vivo su conigli albini adulti mediante un modello analogo di ischemia cardiaca. Parsa *et al.* per esempio somministravano una singola dose di EPO (5000U/Kg) a conigli esposti a IRI, al momento dell'occlusione iatrogena della coronaria [47]. Al terzo giorno, sebbene non fossero

state documentate differenze in HCT, era stato notato un significativo miglioramento nella contrattilità e nel rilasciamento del miocardio, valutato sia come dP/dT max, sia come riduzione delle dimensioni dell'area infartuale, associato ad una riduzione della morte cellulare apoptotica. In un ulteriore studio condotto dagli stessi ricercatori, sono stati testati due diversi dosaggi di EPO, somministrata o ad una dose di 1000 o di 5000 U/Kg al momento dell'ischemia, al momento della riperfusione, o 12 ore prima dell'ischemia. Tuttavia una riduzione delle dimensioni dell'infarto è stata notata in tutti i gruppi trattati con EPO e il più importante miglioramento funzionale, valutato come recupero post-ischemico nel LVTDP, è stato ottenuto quando l'eritropoietina era stata somministrata a maggiori concentrazioni 12 ore prima dell'ischemia [48].

In uno studio seguente condotto su cuori isolati di ratto sottoposti a danno da ischemia/riperfusione, Lipsic *et al.* hanno dimostrato che gli effetti antiapoptotici dell'EPO erano sempre più marcati quando veniva somministrata dopo l'inizio della riperfusione, anziché 2 ore prima dell'IRI o all'inizio dell'ischemia [49].

A supporto delle scoperte sulla cardioprotezione EPO-mediata considerata indipendente dai suoi effetti sull'emopoiesi, Gao e coll. hanno riportato come la darbepoietina riduceva considerevolmente la morte per necrosi e per apoptosi dei miociti nei cuori di ratto esposti a IRI [50].

Sebbene i ricercatori si siano maggiormente soffermati sugli effetti antiapoptotici esercitati dall'EPO sui miociti cardiaci, questo non esclude la possibilità di meccanismi alternativi di protezione mediata dall'eritropoietina.

L'ischemia è in grado solamente di iniziare la cascata apoptotica, mentre è necessaria la riperfusione per completare il programma di morte cellulare programmata [51]. Inoltre negli stadi iniziali della riperfusione l'apoptosi si verifica dapprima nelle cellule endoteliali e poi si diffonde ai cardiomiociti circostanti, suggerendo quindi che la rivascolarizzazione induce il rilascio di mediatori proapoptotici dalle cellule endoteliali [52]. Dal momento che il recettore dell'eritropoietina è esposto anche sulle cellule endoteliali cardiache, si potrebbe ipotizzare che rH-EPO sia anche in grado di ridurre l'estensione dell'apoptosi delle cellule endoteliali, diminuendo perciò l'estensione della conseguente morte cellulare dei miociti e la disfunzione endoteliale associata.

Ruolo dell'eritropoietina nello scompenso cardiaco

L'anemia nello scompenso cardiaco ha una patogenesi complessa che include la ridotta produzione di eritropoietina da parte dei reni, l'emodiluizione e il malassorbimento intestinale con conseguente carenza di ferro. In aggiunta, alcune citochine proinfiammatorie, come il tumor necrosis factor (TNF), possono causare resistenza all'EPO e generare la cosiddetta "anemia da malattia cronica" [53, 54].

I livelli di EPO, aumentati nel corso dello scompenso cardiaco, correlano scarsamente con quelli di emoglobina e il loro monitoraggio sembra essere davvero promettente come fattore prognostico [55].

Anemia, insufficienza renale cronica e scompenso cardiaco, che danno origine alla cosiddetta "sindrome cardio-renale" possono innescare un circolo vizioso: in termini fisiopatologici l'anemia causa ipossia tessutale, che a sua volta è responsabile di vasodilatazione periferica con conseguente riduzione della resistenza vascolare e della pressione sanguigna; ciò provoca l'attivazione del sistema nervoso simpatico con conseguente incremento dell'indice cardiaco nonché vasocostrizione renale con conseguente riduzione del flusso ematico e dell'indice di filtrazione glomerulare, attivando così il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e provocando il rilascio dell'ormone anti-diuretico. Come conseguenza il volume plasmatico si espande, i ventricoli si dilatano e subiscono un rimodellamento caratterizzato da combinazione di meccanismi necrotici e apoptotici che conducono a morte cellulare dei miociti. Il progressivo peggioramento della funzione cardiaca in corso di scompenso, così come il rilascio di diversi fattori, tra cui TNF, portano ad una tempestiva attivazione del RAAS, con ulteriore aggravamento della performance miocardica e quindi della perfusione renale [56] (Fig.1).

La prevalenza di anemia nello scompenso cardiaco varia in base alla classe funzionale cui appartiene il paziente. La diminuzione dei valori di emoglobina si aggrava progressivamente con la severità dell'insufficienza cardiaca. Infatti, secondo Silveberg e coll. l'anemia, definita come Hb<12 g/dL, era presente nel 55,6% di tutti i pazienti con HF; essa aumentava da 9,1% con Hb media 13,7 g% nella classe NYHA I a 79,1% con Hb media 10,9 g% nella classe NYHA IV [57].

Un'analisi retrospettiva dello studio RENAISSANCE ha mostrato che l'anemia era associata con una maggiore mortalità e frequenza di ospedalizzazione nei pazienti con SCC [58].

L'analisi del database SOLVD (6563 pazienti) ha documentato che, nei pazienti con disfunzione sistolica del ventricolo sinistro, sia la ridotta funzione renale sia un ridotto valore di HCT, erano connesse ad elevata mortalità (p<0,001). In linea con queste osservazioni, nello studio OPTIME è stato dimostrato che la riduzione di un punto di Hb aumentava il rischio di morte o di ricaduta di scompenso del 13% [59].

I dati che suscitano maggior interesse sulla terapia con EPO nello scompenso appartengono al gruppo di Silveberg e coll. I pazienti con SCC refrattario a terapia medica erano trattati con ferro e.v. ed eritropoietina in formulazione sottocute [60, 61, 62, 63]. La correzione dell'anemia e il mantenimento delle riserve di ferro nei range terapeutici correlava con una riduzione del 91,9% delle ospedalizzazioni, un aumento della frazione di eiezione, il miglioramento della classe NYHA e la stabilizzazione del tasso di filtrazione glomerulare, ridotto stabilmente di 1ml/min/mese prima del trattamento. Nello stesso studio randomizzato, dopo otto mesi di follow-up, nel gruppo trattato con eritropoietina non vi erano stati decessi correlati allo scompenso rispetto a quattro decessi su sedici nel gruppo dei controlli; la classe NYHA migliorava del 41,2% dei pazienti trattati con EPO rispetto al peggioramento

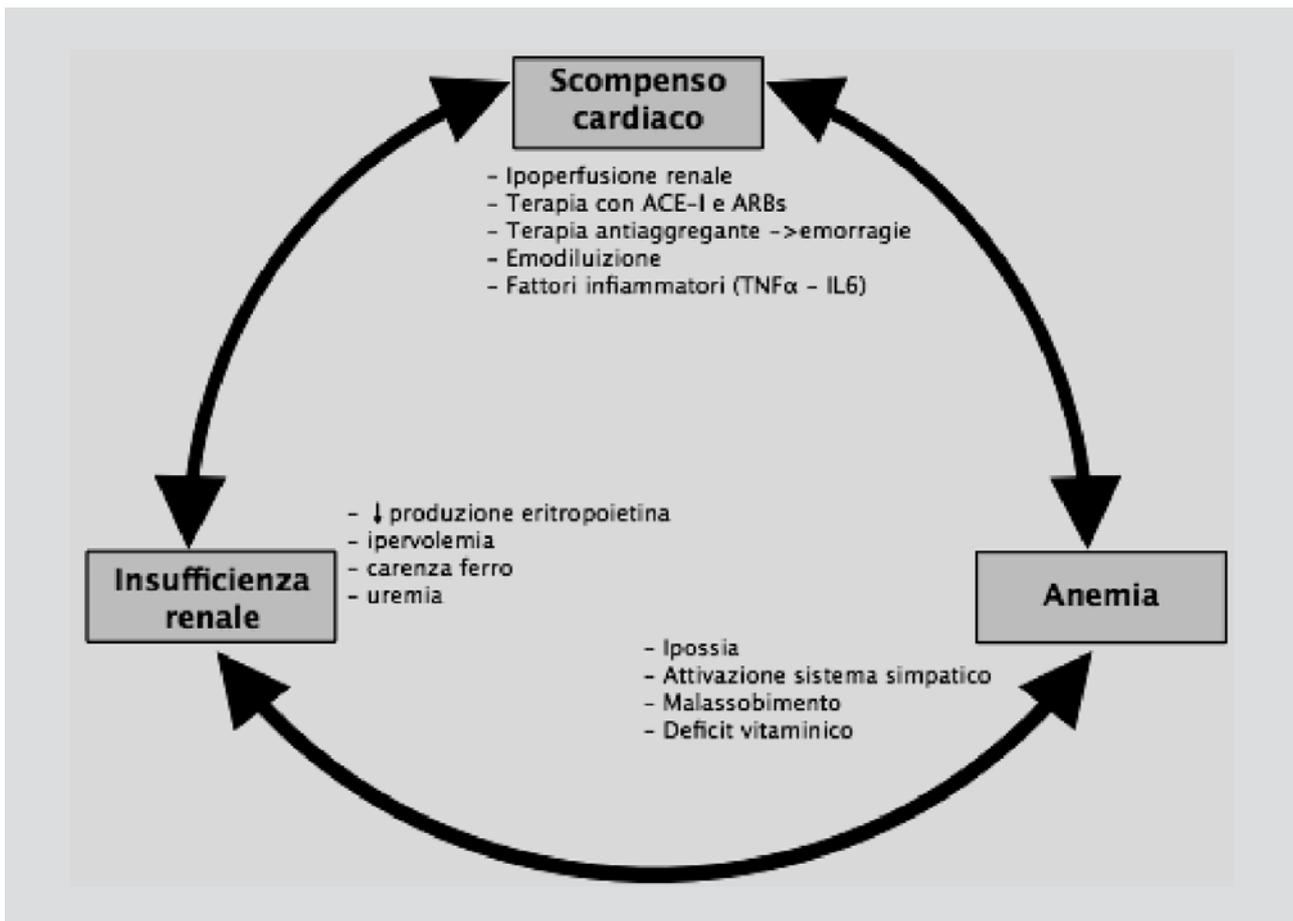


Figura 1. Sindrome dell'anemia cardio-renale.

dell'11,4% nei pazienti non trattati, mentre la frazione di eiezione aumentava del 5,5% nei primi e si riduceva del 5,4% nei secondi. Inoltre la creatinina sierica, i cui valori non subivano variazioni nei pazienti trattati con EPO, aumentava del 28,6% nel gruppo dei controlli. Infine la necessità di furosemide per via orale e infusiva diminuiva del 51,3% e del 91,3%, rispettivamente nel gruppo trattato con la citochina, mentre aumentava del 28,5% e del 28,0% nei pazienti controllo.

In uno studio in doppio cieco condotto da Mancini *et al.*, l'EPO migliorava il consumo di ossigeno, la durata dell'esercizio e la performance al Six Minutes Walking Test nei pazienti scompensati [64]. Ai pazienti reclutati erano somministrate 5000 U di EPO sottocute tre volte a settimana per tre mesi con aumento fino a 10000 U tre volte a settimana se l'incremento di Hb era inferiore a 1g/dL in 4 settimane, associato a ferro gluconato e folato. Nel gruppo trattato con eritropoietina non sono stati riportati eventi trombotici o ipertensione.

In uno studio clinico randomizzato multicentrico, lo STAMINA HeFT, sono stati valutati circa 300 pazienti con SCC e con Hb<12,5 g/dL. La tolleranza all'esercizio è stata valutata mediante Treadmill Test eseguito all'inizio, a sei mesi e ad un anno nei pazienti trattati con darbepoietina alfa (iniezioni sottocutanee ogni due settimane per un anno) o con placebo [65].

Sebbene il trattamento con rH-EPO si sia dimostrato una promessa nei pazienti con HF, i suoi me-

canismi di azione restano tuttora sconosciuti. George *et al.* hanno analizzato l'effetto del trattamento cronico con rH-EPO sulle capacità proliferative e funzionali delle cellule progenitrici endoteliali nei pazienti con insufficienza cardiaca. In tale sperimentazione sono stati reclutati 28 pazienti con SCC trattati con rH-EPO contro un gruppo di controllo (n=28) per un periodo di 28 mesi; sono stati quindi eseguiti il conteggio delle cellule ematopoietiche circolanti ed endoteliali (CD34+, CD34+/CD45+, CD34+/CD133+, CD34+/VEGF-R2+ o CD34+/CD133+/VEGF-R2+) e la loro capacità proliferativa e adesiva [66]. Le EOCs dei pazienti trattati con rH-EPO mostravano un'aumentata proliferazione così come una maggiore adesione alle cellule endoteliali in coltura sia prima che dopo la stimolazione con TNF- α . L'aggiunta di EPO alle EPCs dei soggetti sani aumentava in modo dose-dipendente la loro proliferazione e capacità di adesione alla fibronectina, alle cellule endoteliali in coltura e ai cardiomiociti. Questi effetti erano significativamente ridotti in presenza degli inibitori del fosfatidilinositolo 3-chinasi. È stato quindi concluso che la terapia cronica con rH-EPO era associata ad un incremento delle proprietà adesive e proliferative delle EPC circolanti nei pazienti affetti da scompenso cardiaco cronico.

Recentemente Desai *et al.* hanno condotto uno studio sul ruolo dell'rH-EPO nei pazienti con end-stage renal disease (ESRD) che presentavano aterosclerosi accelerata. È ormai noto che uno dei meccanismi fisiopatologici che determinano tale condizio-

ne è la disfunzione endoteliale caratterizzata dalla riduzione della disponibilità di ossido nitrico endogeno (NO), in modo direttamente proporzionale alle concentrazioni ematiche di eritropoietina. Inoltre si pensa che la malattia renale cronica possa dipendere da uno stato di deficit di NO. Lo studio condotto dagli autori suggerisce che l'EPO possa esercitare un'attività proaterogena aumentando l'espressione di monocyte-chemoattractant-protein 1 (MCP-1) indotta dalla citochine nelle cellule endoteliali umane della vena ombelicale (HUVECs) e stimolando la proliferazione di HUVECs e di cellule muscolari lisce vascolari umane (HVSMS). L'aumento dell'espressione di MCP-1 sembra essere correlato alla downregulation EPO-indotta dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS): infatti, l'utilizzo di NO-donors sopprimeva l'aumento EPO-mediato dell'espressione MCP-1 indotta dalle citochine [67].

Uno dei problemi più comuni nei pazienti affetti da scompenso cardiaco congestizio è l'interazione tra i diversi farmaci utilizzati.

I livelli di eritropoietina sierica diminuiscono in seguito alla terapia con ACE inibitori (in particolare enalapril), utilizzata nei pazienti affetti da scompenso cardiaco; ciò è dovuto verosimilmente alla correzione dell'ipossia renale [4, 68, 69].

Diversi dati dimostrano che gli ACE inibitori possono inibire l'EPO con la conseguente soppressione della risposta del midollo osseo. Ad esempio nella policitemia indotta dall'altitudine solo 5 mg di Enalapril al giorno per due anni riducono la concentrazione di Hb [70]. La sospensione degli ACE inibitori nei pazienti in emodialisi con ipertensione cronica che assumono EPO può condurre ad un aumento dei livelli di HCT [71].

I dati clinici che emergono dai diversi studi sono controversi.

In uno studio di Cruz *et al.* è emerso che gli ACE inibitori non determinano alterazioni significative nella concentrazione dell'HCT e dell'eritropoietina in pazienti in emodialisi [72]. Un altro studio riportava la necessità di aumentare la dose di EPO nei pazienti con insufficienza renale in terapia con ACE inibitori per ottenere lo stesso livello di HCT [73].

Studi su pazienti con scompenso cardiaco con anemia suggeriscono che la terapia con rH-EPO, nonostante alcuni effetti avversi, è sicura ed efficace nel ridurre l'ipertrofia del ventricolo sinistro migliorando la performance durante l'esercizio e incrementando la frazione di eiezione. Nuovi studi con follow-up più lunghi sono necessari, ma i dati già esistenti sono molto incoraggianti riguardo ai vantaggi della terapia con eritropoietina nei pazienti scompensati.

Anche il tipo di beta bloccante somministrato può influenzare lo sviluppo di anemia. Il Carvedilol or Metoprolol European Trial (COMET) ha mostrato come la terapia con carvedilolo sia associata con un lieve, ma significativo, calo dell'emoglobina di circa 0.2 g/dL, rispetto al metoprololo [74]. È noto che sia le cellule deputate alla secrezione di eritropoietina a livello renale che le cellule progenitrici della serie eritroide, hanno un'importante innervazione simpatica ed hanno recettori beta - 1, beta - 2 ed alfa sulla loro membrana.

Prospettive attuali e future

Sebbene la diretta azione dell'EPO sia ben conosciuta ed estesamente sfruttata in ambito clinico, le sue proprietà antiapoptotiche sono state descritte solo recentemente, aprendo nuovi orizzonti nella ricerca clinica e farmacologica.

L'importante riduzione delle dimensioni dell'area infartuale e il sorprendente miglioramento della funzione cardiaca dopo ischemia dopo trattamento con l'EPO nei modelli sperimentali di IRI sono più che incoraggianti, suggerendo un possibile uso clinico dell'ormone in aggiunta al trattamento standard delle sindromi coronariche acute.

Allo stesso modo i pazienti scompensati frequentemente sottotrattati per l'anemia possono rappresentare un'altra popolazione con un potenziale beneficio dal trattamento con EPO.

Gli studi più recenti riportano un miglioramento significativo nei pazienti con SCC cui è stata somministrata eritropoietina e nuovi studi clinici controllati su una numerosa casistica di pazienti hanno permesso di definirne accuratamente i benefici, delimitando le indicazioni cliniche e identificando i potenziali effetti avversi a lungo termine di tale terapia.

Alla luce di dati riportati in letteratura e delle attuali indicazioni della Food and Drug Administration (FDA), ovvero di evitare il raggiungimento dei valori di Hb plasmatica > 12 g/dL in quanto associati a maggior rischio di morte ed eventi cardiaci [75], può essere presa in considerazione la somministrazione di agenti stimolanti l'eritropoiesi con l'obiettivo di raggiungere livelli di Hb plasmatica di 10 - 12 g/dL. Il raggiungimento di valori superiori è da considerarsi, alla luce delle attuali conoscenze, come potenzialmente pericoloso.

Riassunto

L'Eritropoietina (EPO) è un ormone prodotto a livello renale che regola proliferazione, differenziazione e maturazione delle cellule eritroidi. L'Eritropoietina ricombinante umana (rH-EPO) è da anni utilizzata per correggere l'anemia in pazienti con insufficienza renale cronica in dialisi. Tuttavia recenti studi hanno dimostrato diversi effetti non eritropoietici dell'EPO. I recettori dell'EPO sono stati scoperti in diversi tessuti e sono espressi anche a livello del sistema cardiovascolare. Recentemente sono stati pubblicati nuovi studi che documentano un incremento della funzione cardiaca in pazienti con scompenso cardiaco recidivante in trattamento con EPO. Altri effetti benefici dell'EPO sono correlati con la sua azione pro-angiogenetica sulle cellule endoteliali, aspetto che potrebbe essere di aiuto in pazienti con cardiopatia ischemica. Considerate nell'insieme, queste scoperte suggeriscono un possibile nuovo utilizzo dell'EPO nella terapia delle malattie cardiovascolari, in aggiunta alla semplice correzione dell'anemia. Questa review focalizza l'attenzione sugli effetti pleiotropici dell'EPO nel sistema cardiovascolare e sulle sue promettenti nuove applicazioni.

Parole chiave: eritropoietina, apotposi, anemia, ischemia, infarto miocardico, scompenso cardiaco.

Bibliografia

1. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514.
2. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-489.
3. Overbay DK *et al.* Darbepoetin alfa: a review of the literature. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 889-897.
4. Volpe M, Tritto C, Testa U, *et al.* Blood levels of erythropoietin in congestive heart failure and correlation with clinical, hemodynamic, and hormonal profiles. *Am J Cardiol* 1994; 74: 468-473.
5. Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, *et al.* The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1775-1780.
6. Noakes TD. Tainted Glory - Doping and Athletic Performance. *N Engl J Med* 2004; 351: 847-849.
7. Morishita E, Masuda S, Nagao M, *et al.* Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105-116.
8. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, *et al.* In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4635-4640.
9. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, *et al.* Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4802-4806.
10. Toma C, Letts DP, Tanabe M *et al.* Positive effect of darbepoetin on peri-infarction remodeling in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2007 Aug; 43 (2): 130-6.
11. Ribatti D, Presta M, Vacca A, *et al.* Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93: 2627-2636.
12. Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, *et al.* EPO is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep* 2003; 2: 465-470.
13. Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. EPO and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 2003; 255: 334-349.
14. Ratajczak J, Majka M, Kijowski J, *et al.* Biological significance of different erythropoietic factors secreted by normal human early erythroid cells. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(5): (767-774).
15. Silva M, Grillot D, Benito A, *et al.* Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996; 88: 1576-1582.
16. Silva M, Benito A, Sanz C, *et al.* Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 22165-22169.
17. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, *et al.* Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-1141.
18. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, *et al.* Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-323.
19. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, *et al.* HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 2002; 8: 718-724.
20. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S. EPO prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2258-2263.
21. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, *et al.* Recombinant human EPO counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9450-455.
22. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 320-330.
23. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002; 106: 2973-979.
24. Wang L, Zhang Z, Wang Y. Treatment of stroke with EPO enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004; 35: 1732-737.
25. Siren AL, Fratelli M, Brines M. EPO prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4044-049.
26. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M. EPO both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 823-8.
27. Junk AK, Mammis A, Savitz SI. EPO administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10659-0664.
28. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, *et al.* Low-Dose Therapy With the Long-Acting Erythropoietin Analogue Darbepoetin Alpha Persistently Activates Endothelial Akt and Attenuates Progressive Organ Failure. *Circulation* 2004; 110: 1006-1012.
29. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 1998; 52: 235-249.
30. Van der Meer P, Lipsic E, Boer RA, *et al.* A functional erythropoietin receptor in a rat heart is linked to anti-apoptotic effects. *J Am Coll Card* 2003; 41: 330A.
31. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, *et al.* Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 1999; 126: 3597-3605.
32. Amann K, Neimeier KA, Schwarz U, *et al.* Rats with moderate renal failure show capillary deficit in heart but not skeletal muscle. *Am J Kidney Dis* 1997; 30: 382-388.
33. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, *et al.* Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3974-3978.
34. Ashley RA, Dubuque SH, Dvorak B, *et al.* Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells. *Pediatr Res* 2002; 51: 472-478.
35. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, *et al.* Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002; 64: 326.
36. Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502: 169-187.
37. De Boer RA, Henning RH, Tio RA, *et al.* Identification of a specific pattern of downregulation in expression of isoforms of vascular endothelial growth factor in dilated cardiomyopathy. *Heart* 2002; 88: 412-414.
38. Van Veldhuisen DJ, van den Heuvel AF, Blanksma PK, *et al.* Ischemia and left ventricular dysfunction: a reciprocal relation? *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 1(32 Suppl): S46-S51.
39. De Boer RA, van Veldhuisen DJ, van der Wijk J, *et al.* Additional use of immunostaining for active caspase 3 and cleaved actin and PARP fragments to detect apoptosis in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2000; 6: 330-337.
40. Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007 Oct 1;70(4):477-84.
41. Leone AM, Rutella S, Bonanno G *et al.* Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 2005 Jun; 26(12):1196-204.

42. Sterin-Borda L, Barcelo AC, Bozzini CE. EPO improves cardiac contractility in post-hypoxic mice. *Br J Haematol* 2003; 121: 180-186.
43. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, *et al.* EPO reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11612-11617.
44. Van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, *et al.* Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Heart Fail* 2004; 6: 853-859.
45. Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, *et al.* Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock* 2004; 22: 63-69.
46. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, *et al.* Recombinant human EPO protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4802-6.
47. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, *et al.* A novel protective effect of EPO in the infarcted heart. *J Clin Invest* 2003; 112: 999-1007.
48. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, *et al.* Cardioprotective Effects of EPO in the Reperfused Ischemic Heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; 279: 20655-0662.
49. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, *et al.* Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44: 473-479.
50. Gao E, Boucher M, Chuprun JK *et al.* Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Jul;293(1):H60-8.
51. Webster KA, Discher DJ, Kaiser S, *et al.* Hypoxia-activated apoptosis of cardiac myocytes requires reoxygenation or a pH shift and is independent of p53. *J Clin Invest* 1999; 104: 239-252.
52. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, *et al.* Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2001; 104: 253-256.
53. Okonko DO, Anker SD. Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms. *J Card Fail* 2004; 10: S5-S9.
54. Silverberg DS, Wexler D, Iaina A. The importance of anemia and its correction in the management of severe congestive heart failure. *Eur J Heart Fail* 2002; 4: 681-86.
55. Van der Meer P, Voors AA, Lipsic E, *et al.* Prognostic value of plasma erythropoietin on mortality in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 63-67.
56. Silverberg D. Outcomes of anemia management in renal insufficiency and cardiac disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: ii7-ii12.
57. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, *et al.* The use of subcutaneous EPO and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1737-744.
58. Anand I, McMurray JJ, Whitmore J. Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation* 2004; 110: 149-54.
59. Felker GM, Gattis WA, Leimberger JD. Usefulness of anemia as predictor of death and rehospitalization in patients with decompensated heart failure. *Am J Cardiol* 2003; 92: 625-628.
60. Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, *et al.* The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous EPO and intravenous iron: a randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1775-780.
61. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, *et al.* EPO should be part of congestive heart failure management. *Kidney Int Suppl* 2003; S40-7.
62. Silverberg DS, Wexler D, Blum B, *et al.* Anemia in chronic kidney disease and congestive heart failure. *Blood Purif* 2003; 21: 124-130.
63. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, *et al.* The effect of correction of anaemia in diabetics and non-diabetics with severe resistant congestive heart failure and chronic renal failure by subcutaneous EPO and intravenous iron. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 141-46.
64. Mancini DM, Katz SD, Lang CC, *et al.* Effect of EPO on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 294-299.
65. Mitka M. Researchers probe anemia-heart failure link. *JAMA* 2003; 290: 1835-8.
66. George J, Goldstein E, Abashidze A, *et al.* Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 299-306.
67. Desai A, Zhao Y, Lankford HA, *et al.* Nitric oxide suppresses EPO-induced monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells: implications for atherogenesis in chronic renal disease. *Lab Invest* 2006; 86: 369-79.
68. Fyhrquist F, Karppinen K, Honkanen T, *et al.* EPO levels are normalized during treatment of congestive heart failure with enalapril. *J Intern Med* 1989; 226: 257-60.
69. Al-Ahmad A, Rand WM, Manjunath G *et al.* Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 955-962.
70. Plata R, Cornejo A, Arratia C, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition therapy in altitude polycythaemia: a prospective randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 663-6.
71. Erturk S, Nergizoglu G, Ates K, *et al.* The impact of withdrawing ACE inhibitors on erythropoietin responsiveness and left ventricular hypertrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 1912-6.
72. Cruz DN, Perazella MA, Abu-Alfa AK, *et al.* Angiotensin converting enzyme inhibitor therapy in chronic hemodialysis patients: any evidence of EPO resistance? *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 535-40.
73. Albitar S, Genin R, Fen-Chong M, *et al.* High dose of Enalapril impairs the response to EPO treatment in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1206-1210.
74. Komajda M, Anker SD, Charlesworth A, *et al.* The impact of new onset anaemia on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from COMET. *Eur Heart J* 2006 Jun;27(12):1440-6. Epub 2006 May 22.
75. Fishbane S, Nissenson AR. The new FDA label for erythropoietin treatment: how does it affect hemoglobin target? *Kidney Int* 2007 Oct;72(7):806-13. Epub 2007 Jun 27.