

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



“Respuesta proliferativa a la hipoxia y expresión génica de progenitores eritroides aislados de habitantes de altura andinos con Mal de Montaña Crónico”

Daniela Inés Bermudez Pumasunco

Tesis para optar por el Título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

LIMA-PERÚ

2020

Índice de contenidos

	Agradecimientos	4
	Resumen	5
	Abstract	6
I.	Introducción.....	7
II.	Hipótesis	18
III.	Objetivos.....	
	3.1 General	18
	3.2 Específico	18
IV.	Materiales y métodos	18
	4.1 Área de estudio	18
	4.2 Diseño y tipo de estudio	19
	4.3 Cálculo de tamaño muestral	19
	4.4 Reclutamiento de participantes de estudio	19
	4.5 Compensaciones	20
	4.6 Muestras de sangre	21
	4.7 Aislamiento y cultivo de PBMC	22
	4.8 Identificación y conteo de colonias BFU-E	23
	4.9 Análisis de sensibilidad a hipoxia y Epo.....	24
	4.10 PCR en tiempo real	24
	4.11 Parámetros hematológicos de Epo y perfil de hierro	26
	4.12 Análisis estadísticos.....	26
V.	Resultados	26
VI.	Discusión.....	30
VII.	Conclusiones.....	34
VIII.	Limitaciones.....	35
IX.	Futuros pasos.....	36
X.	Referencias bibliográficas.....	37

XI.	Anexo I: Consentimiento Informado.....	46
XII.	Anexo II: Historia clínica	52
XIII.	Anexo III: Metodología PCR en tiempo real	54

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Francisco Villafuerte por su gran labor y dedicación durante el desarrollo del estudio y todo el proceso de elaboración de tesis. Asimismo, quiero agradecer a todo el grupo que conforma el Laboratorio de Fisiología Comparada quienes también participaron y me brindaron su apoyo durante el desarrollo del estudio, y su tiempo durante el proceso de escritura de esta tesis: MSc. José Luis Macarlupu, Sr. Gianfranco Aicardi, Sr. Joseph Figueroa, y Sr. Gustavo Vizcardo. También quisiera agradecer a la Dra. Priti Azad y al Dr. Gabriel Haddad, División de Medicina Respiratoria, Departamento de Neurociencias de la Universidad de California, San Diego, La Jolla, CA. Finalmente, agradezco de manera muy especial a mi mamá por su apoyo incondicional.

Este trabajo de investigación se realizó gracias al financiamiento de The Wellcome Trust Grant 107544/Z/15/Z.

Resumen

La característica principal del Mal de Montaña Crónico (MMC) es la eritrocitosis excesiva (EE) que se define como el exceso del número de glóbulos rojos y una elevada concentración de hemoglobina (Hb; $Hb \geq 21g/dl$ en hombres y $\geq 19g/dl$ en mujeres). El MMC es síndrome clínico altamente prevalente en regiones andinas ubicadas a más de 2500msnm, y aquellos que la padecen son considerados mal adaptados a la vida en hipoxia crónica. Se sabe que, en promedio, alrededor del 25% de varones residentes a más de 4000msnm en los Andes centrales son afectados por EE. La hipoxemia es el principal estímulo para el desarrollo de EE, sin embargo, existe controversia acerca de los mecanismos que subyacen la aparición de esta condición. Es por ello por lo que surge la necesidad de investigar el efecto de la hipoxia a nivel celular con el fin de identificar potenciales vías de señalización que podrían estar involucradas en el desarrollo de la EE. Estudios realizados en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés) derivadas de células de nativos de altura que padecen de MMC han permitido identificar genes reguladores de la eritropoyesis, que podrían explicar la exagerada respuesta eritropoyética. Sin embargo, aún se desconoce la respuesta fisiológica de células nativas de individuos con MMC ante el estímulo hipóxico. El objetivo principal del presente estudio consistió en evaluar la respuesta proliferativa de células progenitoras eritroides (BFU-E) de nativos de altura con MMC y nativos de altura sanos y su sensibilidad hacia eritropoyetina (Epo) bajo condiciones de hipoxia y normoxia. Adicionalmente, se buscó determinar los niveles de expresión de ARNm de EpoR, Epo, SENP1 y GATA1. Las colonias BFU-E de individuos con MMC presentaron una mayor respuesta proliferativa y una mayor sensibilidad hacia Epo en comparación con las BFU-E de los individuos que no padecen de MMC; asimismo, las células de individuos con MMC mostraron mayor expresión de EpoR, SENP1 y GATA1. Nuestros resultados sugieren que la EE se manifiesta en nativos de altura que padecen de MMC debido a que las células progenitoras eritroides de estos sujetos presentan mayor sensibilidad a Epo en condiciones hipóxicas, favoreciendo la proliferación excesiva de células de linaje eritroide; lo cual también está relacionado a la mayor expresión de genes eritropoyéticos en estas células. Palabras clave: Hipoxia, Mal de Montaña Crónico, BFU-E, Eritrocitosis excesiva.

Abstract

The main sign of Chronic Mountain Sickness (CMS) is excessive erythrocytosis (EE), which is defined as an excessive number of red blood cells and hemoglobin (Hb) concentration (Hb; Hb \geq 21g/dL in men and \geq 19g/dL in women). CMS is a highly prevalent clinical syndrome in Andean regions located at more than 2500 m, and those who suffer from it are considered maladapted to life in chronic hypoxia. On average, about 25% of males living above 4000m in the central Andes are affected by EE. Hypoxemia is the main stimulus for the development of EE; however, the underlying mechanisms for the progression of this condition are still controversial. Therefore, it becomes necessary to investigate the effect of hypoxia at the cellular level to identify potential pathways that could be involved in the development of EE.

Studies on erythroid progenitors derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) obtained from CMS highlanders' cells, have identified genes that regulate the erythropoietic process that could explain the exaggerated erythropoietic response. However, the physiological responses of native CMS cells to hypoxia are still unclear. The aim of the present study is to evaluate the proliferative response and Epo-sensitivity under hypoxic and normoxic conditions of erythroid progenitor cells (BFU-E) of CMS and healthy highlanders. Additionally, mRNA expression levels of the erythropoietic-relevant genes EpoR, SENP1 and GATA1 was investigated. CMS BFU-E colonies showed greater proliferative response, increased Epo-sensitivity, and increased mRNA expression for EpoR, SENP1 and GATA1, when compared to BFU-E cells from healthy subjects. Our results suggest that CMS highlanders develop EE because their erythroid progenitor cells are more sensitive to Epo under hypoxic conditions, promoting the excessive proliferation of erythroid cells which could also be associated to the augmented expression of erythropoietic genes in these cells. Keywords: Hypoxia, Chronic Mountain Sickness, BFU-E, Excessive erythrocytosis.

I. Introducción

El ser humano ha poblado regiones de gran altura geográfica por miles de años (1, 2). Alrededor del mundo, más de 140 millones de personas habitan a gran altitud (3), y se encuentran distribuidas en grandes poblaciones, principalmente Quechuas y Aymaras en los Andes sudamericanos, los habitantes de la meseta del Tíbet en Asia Central (5), y los residentes de Amhara en Etiopía (8).

Estas poblaciones presentan diversos caracteres fisiológicos que actúan para contrarrestar los efectos adversos de la hipoxia hipobárica, consecuencia de la menor presión barométrica debido a la altitud. Este conjunto de características fisiológicas a nivel celular y sistémico comprende, entre otras, diferentes patrones en la producción de eritrocitos y en el control respiratorio (6-9).

Desde la publicación del primer artículo sobre adaptación de poblaciones humanas a la vida en altura en 1891 (89) y hasta 1970, la mayor parte de estudios hematológicos se habían realizado en los Andes. Es así que ciertas características de dicha población, tales como un hematocrito (Hct) y concentración de hemoglobina (Hb) elevados (10), se consideraron como patrones generales de adaptación, lo cual aumenta la capacidad de acarreo de O_2 de la sangre. Alrededor de 1980, estudios realizados en la meseta del Tíbet revelaron que los habitantes de esta región presentaban una menor concentración de Hb en comparación a los habitantes andinos (aproximadamente 16 vs 19 g/dl) a la misma altitud de residencia (11). Posteriormente, se reportó también que la concentración de Hb de los habitantes de Amhara era similar a los valores de los habitantes del Tíbet (90).

Los cambios en el sistema respiratorio han sido también fundamentales en la investigación de los patrones de adaptación a la vida en altura; ya que tanto estos como los cambios hematológicos son parte del sistema de transporte de oxígeno hacia los tejidos. Una mayor ventilación pulmonar favorece una mayor presión inspirada y alveolar de O_2 (P_iO_2 y P_AO_2 , respectivamente), ayudando a contrarrestar el efecto de la baja PO_2 ambiental. Entre los parámetros ventilatorios más estudiados se encuentran la ventilación pulmonar (VE) en reposo, y el incremento

de la ventilación en respuesta a una exposición aguda a la hipoxia, también conocida como respuesta ventilatoria aguda a la hipoxia (RVAH).

En comparación a un nativo de nivel del mar aclimatado, o a un nativo del Tíbet, se ha demostrado que la VE en reposo del habitante andino se encuentra atenuada (12). En promedio, un nativo del Tíbet respira 1.5 veces más volumen de aire por minuto en comparación con un andino (13); mientras que los etíopes exhiben un patrón ventilatorio similar al de nativos del nivel del mar, con una S_aO_2 superior a la de andinos y tibetanos (Beall, 2006). Por otro lado, luego de una exposición aguda a hipoxia, la RVAH de los andinos corresponde a la tercera parte de los niveles alcanzados por residentes del nivel del mar (6); mientras que los valores de RVAH de los tibetanos y de nativos del nivel del mar son similares (13-15).

Se podría afirmar entonces, que, desde el punto de vista hematológico y respiratorio, las poblaciones de andinos, tibetanos y etíopes exhiben un patrón distinto de adaptación a la vida en altura. Los andinos favorecen la alta capacidad de acarreo de O_2 , debido a la mayor concentración de Hb; mientras que los tibetanos favorecen el incremento de la VE con el consecuente aumento de la P_{AO_2} , requiriendo una menor concentración de Hb (3, 16, 17). Por otro lado, los etíopes exhiben patrones de adaptación intermedios, con valores de Hb similares a los tibetanos y una ventilación similar a la de nativos de nivel del mar (8, 90)

Inicialmente el patrón clásico de adaptación de la población andina se consideró ventajoso para la vida en altura. Se pensó que el incremento en la producción de eritrocitos, con el consecuente aumento en la concentración de Hb, facilitarían el transporte de oxígeno hacia los tejidos (18). Sin embargo, si esto no es acompañado de un incremento en la P_{AO_2} , el aumento en la concentración de Hb, no garantiza un transporte efectivo de oxígeno; ya que una producción excesiva de glóbulos rojos incrementaría la viscosidad de la sangre, dificultando el intercambio gaseoso a nivel pulmonar y el aporte de oxígeno a los tejidos; contribuyendo así a la aparición de patologías de altura tal como el Mal de Montaña Crónico (MMC), un síndrome clínico altamente prevalente en pobladores que residen en altitudes mayores a 2500msnm (4, 19).

El MMC se caracteriza principalmente por la presencia de eritrocitosis excesiva (EE), hipoxemia severa, y frecuentemente hipertensión pulmonar (20-22). Este síndrome se puede manifestar desde la juventud, y su prevalencia aumenta con la edad y la altitud de residencia (23-26). En mujeres, un factor de riesgo adicional para el desarrollo de MMC es la llegada de la menopausia (27), ya que la disminución de los niveles de estradiol y progesterona contribuyen a disminuir la oxigenación de la sangre y a reducir el flujo respiratorio máximo y la VE, que se ve reflejada en la disminución de la saturación arterial de oxígeno (SaO_2) y al incremento de los valores de Hb (24, 28).

La sintomatología característica del MMC incluye dolores de cabeza, mareos, fatiga, cianosis, dilatación de venas, tinnitus, alteraciones de la memoria y dolor muscular o de articulaciones (19, 29). Frecuentemente, en estadios avanzados de la enfermedad y como consecuencia de la hipertensión pulmonar, los pacientes desarrollan insuficiencia cardiaca del lado derecho (4, 21).

La prevalencia del MMC es variable en cada una de las distintas poblaciones de altura, variabilidad que puede ser atribuida no solo a la diferencia temporal en que estos grupos étnicos poblaron las montañas, sino también al componente genético. Estudios realizados en la población de habitantes de la meseta del Tíbet han contribuido para determinar la presencia de variantes genéticas arcaicas que favorecen la vida en altura (30). Se ha sugerido que la baja tasa de mezcla genética o *admixture* ha favorecido la fijación de estas variantes en los nativos del Tíbet (30-32).

La presión de selección que la hipoxia ejerce sobre variantes favorables para la supervivencia ha actuado por más tiempo en las poblaciones más antiguas (3), lo que podría explicar que los nativos del Tíbet presenten la prevalencia más baja de MMC (1.21%) (33), mientras que los niveles más altos pertenecen a los pobladores de los Andes centrales de Perú (Cerro de Pasco, 4340msnm); siendo del 15.4% en varones de 30-39 años de edad, y llegando a superar el 30% en varones sanos con más de 50 años (25).

Las personas que padecen esta condición se consideran maladaptadas para la vida en altura ya que, debido a la sintomatología asociada a este síndrome, su calidad de vida se ve afectada. Hasta el momento, no existe tratamiento farmacológico que pueda ser administrado a largo plazo (34, 35), por lo que la reubicación a zonas de menor altitud es la única opción para aquellos que padecen de esta condición. Sin embargo, esta medida no es la más acertada para la mayoría de estos individuos ya que compromete sus relaciones sociales y el bienestar y estabilidad económica de sus familias.

La EE se ha definido como dos desviaciones estándar sobre el valor promedio de la concentración de Hb de habitantes sanos entre 20-29 años para la altura de residencia (25). Tomando como referencia estudios epidemiológicos realizados en Cerro de Pasco a 4340m, los puntos de corte para el diagnóstico de EE se determinaron como $Hb \geq 21g/dL$ en hombres y $\geq 19g/dL$ en mujeres; y se estima que un 5-10% de la población mundial que reside a una altitud elevada ($>2500msnm$) desarrolla esta condición (4). Los mecanismos fisiopatológicos que resultan en la aparición de EE son multifactoriales, pero aún debatibles; sin embargo, se sabe que la hipoxemia es el principal contribuyente para su desarrollo, ya que la reubicación de nativos de altura a localidades de menor altitud revierte la condición (36).

La producción de glóbulos rojos, y por ende la producción de Hb, depende de manera importante de la hormona eritropoyetina (Epo) que constituye un factor de crecimiento esencial para la eritropoyesis al ejercer su acción sobre las células progenitoras eritroides en la médula ósea.

Durante el desarrollo embrionario la producción de eritropoyetina ocurre en el hígado, sin embargo, a partir de la décimo octava semana de gestación en humanos, los riñones también empiezan a producir Epo (37, 38). Al nacer, cuando la eritropoyesis tiene lugar en la médula ósea, las células intersticiales peritubulares de la corteza renal se convierten en las principales productoras de Epo (39) (40). El incremento en la expresión y producción de Epo tanto a nivel embrionario como adulto, ocurre cuando se percibe una caída en la PO_2 a nivel celular, es decir, cuando se ha alcanzado el umbral hipóxico (41).

Diversos estudios han sugerido que el rol de Epo en el desarrollo de EE es controversial, ya que a pesar de la hipoxemia severa, la concentración de Epo circulante en nativos de altura que padecen de MMC es mayormente similar a la de nativos de altura sanos (42-45). Esto indicaría que la EE no dependería únicamente de la concentración de Epo circulante, y solo aquellos individuos que padecen de MMC y que poseen valores extremos de hematocrito, con frecuencia muestran valores elevados de Epo (42, 44).

El proceso de diferenciación de células hematopoyéticas se inicia con la unión de Epo a su receptor (mEpoR), localizado en la membrana de los progenitores eritroides tempranos BFU-E (46). En respuesta al estímulo de Epo y de factores de crecimiento como interleuquina 3 (IL-3), factor de células madre (SCF) y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); las BFU-E proliferan y se desarrollan formando colonias que están constituidas por cientos o miles de células que se agrupan en cúmulos o racimos. Estos pequeños grupos de células se caracterizan por presentar una coloración marrón-rojiza producto de la hemoglobinización (47) (48). La formación del complejo Epo-mEpoR activa una cascada de señalización intracelular que favorece y promueve la diferenciación de BFU-E hacia progenitores eritroides tardíos, proeritroblastos y normoblastos; los cuales posteriormente se diferenciarán en reticulocitos que serán liberados al torrente sanguíneo para finalizar con su maduración en eritrocitos (49) (Figura 1).

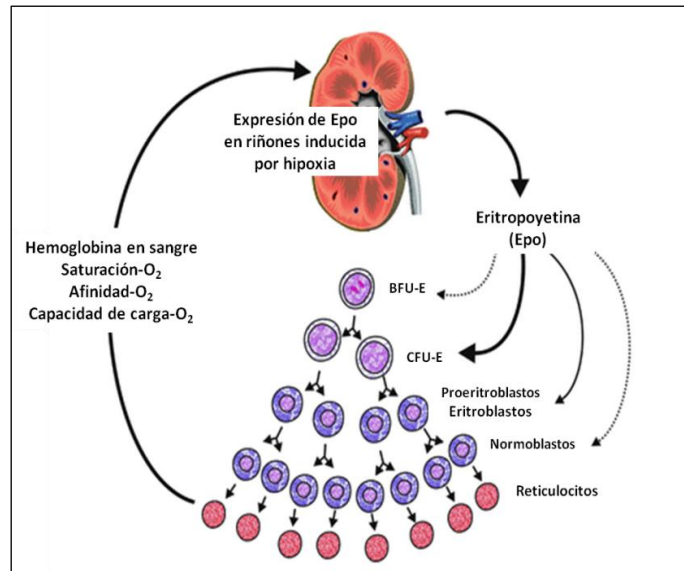


Figura 1. Regulación de eritropoyesis. La hipoxia es el principal estímulo para la producción de eritropoyetina (Epo) en la corteza renal. La Epo es un factor de proliferación y diferenciación de progenitores eritroides. Tomado y modificado de W. Jelkmann, 2011.

El mEpoR es una proteína que pertenece a la familia de receptores de citoquinas que está presente en la membrana de células de linaje eritroide, y su expresión aumenta durante el proceso de diferenciación hematopoyético (39, 49). La unión de Epo con su mEpoR resulta en el aumento de la expresión del mismo receptor y en la autofosforilación de Janus kinasa 2 (JAK2), y de otras 8 regiones con residuos de tirosina fosforilables que se convertirán en sitios de activación de proteínas que cuentan con dominios SH2 (Src homology 2) (50). De este modo, se activa la vía de Ras/MAPK, involucrada en la proliferación celular (51); así como la señal de transducción y activación de transcripción 5 (STAT5) que controla la supervivencia, proliferación, diferenciación y muerte de células hematopoyéticas (52). En su estado inactivo, la fosfatasa de tirosina (SH-1) y la molécula supresora de señalización de citoquina (SOCS) impiden la fosforilación de JAK2; bloqueando la cascada de señalización (Figura 2).

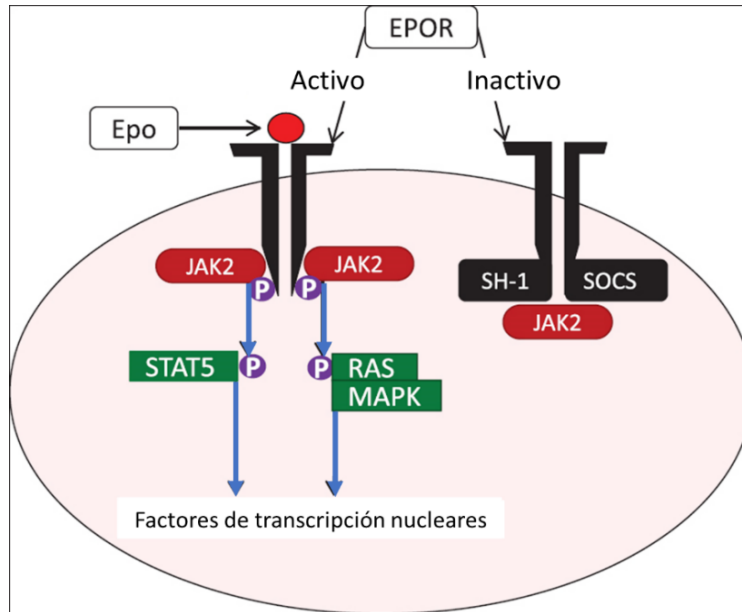


Figura 2. Cascada de señalización de EpoR. Activo: Epo se une a EpoR y promueve la fosforilación de JAK2, dando inicio a una cascada de fosforilación que permitirá la activación de factores de transcripción que regulan la proliferación y supervivencia de progenitores eritroides. **Inactivo:** reclutamiento de SH-1 y SOCS para impedir la fosforilación de JAK2. **Modificado de Aljabry (2018).**

Existe también una variante soluble del receptor de Epo (sEpoR), que está presente en el medio extracelular y torrente sanguíneo, y que se origina por un reordenamiento alternativo del ARNm de mEpoR. Esta variante soluble consta sólo del dominio extracelular del mEpoR y se ha reportado que su peso molecular varía entre 27 y 34 kDa (53, 54). Se sabe que los receptores solubles cumplen un rol importante en el proceso de señalización; ya que pueden modificar la concentración de ligando y estabilizar o alterar la interacción receptor-ligando (55). La función específica del sEpoR aún no ha sido determinada, sin embargo, se ha mostrado que el sEpoR puede unirse a Epo, por lo que al ser secretado al torrente sanguíneo, actúa como un antagonista endógeno de dicha hormona (56-60).

Recientemente se ha propuesto que el sEpoR puede comportarse como un regulador extracelular de la eritropoyesis, ya que se ha demostrado que existe una asociación entre la baja concentración plasmática del sEpoR y la EE; por lo que una

relación Epo/sEpoR elevada favorece el incremento de la disponibilidad de Epo en el torrente sanguíneo, con el consecuente aumento de eritropoyesis (20, 44).

Si bien es cierto que la relación Epo/sEpoR modularía la intensidad del estímulo eritropoyético extracelularmente, se desconoce la sensibilidad de la respuesta de progenitores eritroides a la Epo en condiciones hipóxicas una vez que esta se ha unido a su receptor de membrana. Por lo tanto, es posible que las células progenitoras eritroides de los pacientes con MMC sean más sensibles a Epo en condiciones hipóxicas y favorezcan la expresión de genes anti-apoptóticos, contribuyendo así al desarrollo de EE.

Estudios realizados en la población andina muestran que la elevada concentración de Hb es una característica con una alta heredabilidad, indicando que este rasgo podría verse afectado por selección natural (7, 8). El estudio de las bases genéticas de la adaptación humana a la vida en altura se encuentra en auge, y se han sugerido diversos genes que podrían estar bajo selección positiva en la población andina (5, 61-64).

El secuenciamiento del genoma completo de nativos de altura andinos, permitió identificar SNPs diferenciales en el gen *SENP1* (65). El mismo estudio mostró que dicho gen presentó una mayor respuesta transcripcional en sujetos con MMC bajo condiciones hipóxicas. Además, se trabajó también con un modelo animal de *Drosophila melanogaster*, y se demostró que al disminuir la expresión del gen ortólogo de *SENP1*, se incrementaba la tasa de supervivencia en condiciones hipóxicas.

SENP1 es una proteasa SUMO (pequeña modificadora relacionada a ubiquitina) cuya participación es esencial en el proceso de desumoilación de diversos factores de transcripción involucrados en el proceso eritropoyético, impidiendo su ubiquitinación y posterior degradación. Se ha reportado que factores de transcripción como HIF (Factor Inducible por Hipoxia), cuya acción es primordial para regular la respuesta celular a hipoxia; y GATA1 cuya función principal es la regulación de la eritropoyesis, son blancos de desumoilación de *SENP1*.

HIF es un factor de transcripción que está conformado por dos subunidades, HIF- α y HIF- β (66), cuya acción es clave para mantener la homeostasis de oxígeno. En normoxia, HIF- α es degradado, producto de la hidroxilación de los residuos de prolina catalizada por las prolin hidroxilasas (PHDs), enzimas dependientes de O₂. Dicha hidroxilación sirve como señal para que HIF- α pueda ser reconocida por la proteína von Hipel Lindau (pVHL) y se lleve a cabo la ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma (67). En hipoxia, las PHDs disminuyen su actividad y dejan residuos de prolina sin hidroxilar, favoreciendo la estabilización y traslocación de HIF- α hacia el núcleo, donde se dimeriza con HIF- β para activar la expresión de genes involucrados en la respuesta celular a la hipoxia (68, 69) (Figura 3).

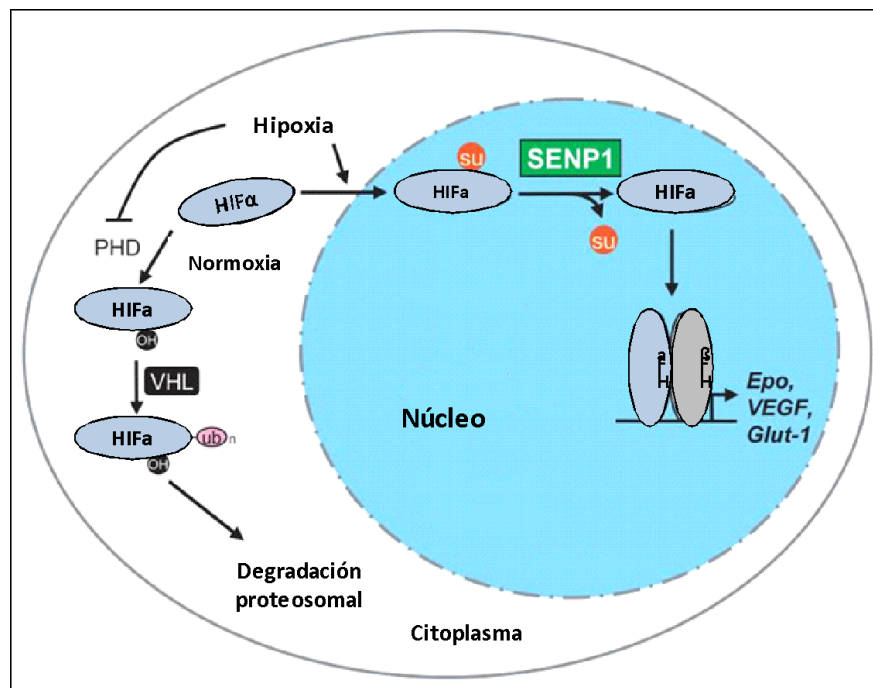


Figura 3. Regulación de HIF α . En normoxia, las PHDs hidroxilan los residuos de prolina de HIF α para que sea reconocida por la proteína VHL y se lleve a cabo la ubiquitinación y degradación en el proteosoma. En hipoxia, disminuye la actividad de las PHDs, permitiendo que HIF α se transloque al núcleo donde será desumoilada (SU) por SENP1. Finalmente, HIF α se dimeriza con HIF β para activar la transcripción de genes de respuesta a la hipoxia. **Modificado de Cheng et al. (2007).**

Otro de los potenciales blancos de desumoiación de SENP1, GATA1, pertenece a la familia GATA de factores de transcripción y está compuesto por tres dominios funcionales: un dominio N-terminal de activación, y un N-terminal y C-terminal de dedos de zinc; lo que le permite unirse al ADN en regiones conservadas (A/T)GATA(A/G) (70). Diversos estudios han demostrado que GATA1 es esencial en el proceso eritropoyético, ya que promueve la expresión de genes involucrados en la proliferación, supervivencia y diferenciación de células eritroides; y la síntesis de Hb, tales como *EpoR* y las α y β globinas (50, 71-73). Asimismo, GATA1 también controla el proceso de apoptosis durante la eritropoyesis ya que promueve la actividad de *Bcl-xL*, una proteína mitocondrial anti-apoptótica cuya expresión depende también de la actividad de *EpoR* (Figura 4) (73).

Cultivos celulares de progenitores diferenciados a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), obtenidas a partir de fibroblastos de individuos con MMC, proliferaron más y mostraron una mayor expresión de SENP1 al ser cultivados en hipoxia (5% O₂); favoreciendo un aumento en la expresión de GATA1 y sus genes blanco, como el factor antiapoptótico *Bcl-xL* (74). Si bien estos resultados muestran la importancia del rol de SENP1 en la proliferación de células eritropoyéticas, es posible que debido al proceso de transformación para la obtención de iPSCs, y posteriormente de progenitores eritroides, estas células no reflejen las respuestas fisiológicas de las células nativas.

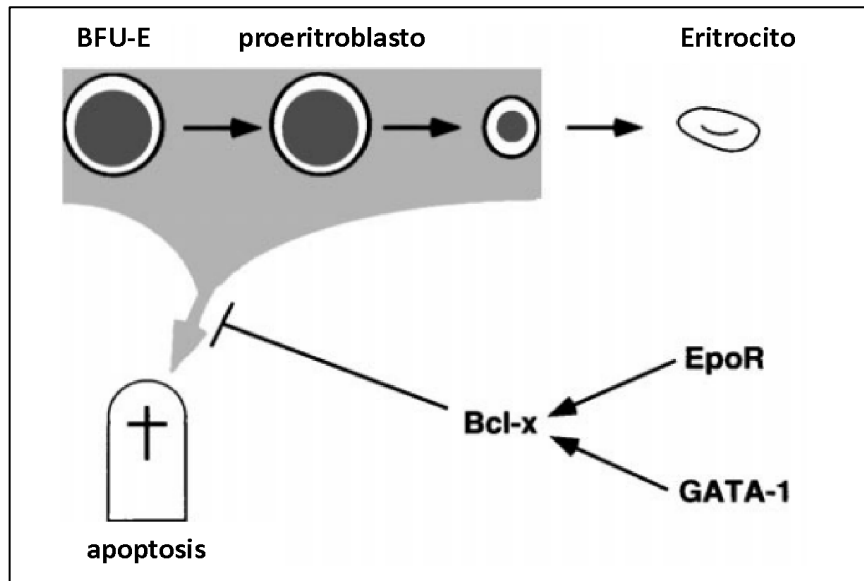


Figura 4. Regulación de apoptosis durante eritropoyesis. GATA1 y EpoR son necesarios para promover la expresión de ARNm de Bcl-x. Los tres genes son esenciales para la supervivencia de progenitores eritroides. **Modificado de Gregory et al. (1999).**

Es posible también que los progenitores eritroides sean más sensibles a Epo bajo condiciones hipóxicas, y que dicha sensibilidad esté relacionada con una mayor expresión de los genes de *Epo*, *EpoR*, *SENP1* y *GATA1*. Debido a ello, el presente estudio busca determinar la respuesta proliferativa en normoxia e hipoxia de células progenitoras eritroides BFU-E nativas, diferenciadas a partir del cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de nativos de altura. Asimismo, busca evaluar el patrón de expresión de ARNm de *SENP1*, *GATA1*, y *EpoR*, tanto en hipoxia como en normoxia para determinar si el patrón de expresión mostrado por células derivadas de iPSCs refleja el patrón fisiológico en células nativas diferenciadas a partir de PBMCs.

II. Hipótesis

Las células progenitoras eritroides BFU-E aisladas de individuos andinos con MMC presentan una mayor respuesta proliferativa, y mayor expresión de ARNm de *Epo*, *EpoR*, *SENP1* y *GATA1* en condiciones de hipoxia celular.

III. Objetivos

A. General

Evaluar la respuesta proliferativa de progenitores eritroides BFU-E de andinos sanos y con MMC, su sensibilidad hacia Epo, y el patrón de expresión de ARNm de Epo, EpoR, SENP1 y GATA1 bajo condiciones de normoxia e hipoxia celular.

B. Específicos

- Obtener cultivos estables de BFU-E a partir de células mononucleares de sangre periférica proveniente de andinos sanos y con MMC.
- Determinar el tamaño y número de colonias BFU-E a los 7 y 14 días de cultivo.
- Cuantificar los niveles de expresión de ARNm de *Epo*, *EpoR*, *SENP1* y *GATA1* en las colonias BFU-E a los 14 días de cultivo.
- Comparar los resultados obtenidos al trabajar con células progenitoras eritroides BFU-E nativas, con los resultados obtenidos de células iPSCs en estudios anteriores.

IV. Materiales y métodos

A. Área de estudio

El estudio se realizó con participantes de los distritos de Chaupimarca, Yanacancha y Simón Bolívar, ubicados en la ciudad de Cerro de Pasco, departamento de Pasco, en la vertiente oriental de los Andes y el centro del Perú, a una altitud máxima de 4380 msnm.

B. Diseño y tipo de estudio

La investigación corresponde a un estudio de tipo cuasi experimental, dirigido a determinar si existe diferencia en la respuesta al estímulo eritropoyético en células progenitoras eritroides de varones andinos sanos y con MMC.

C. Cálculo del tamaño muestral

En base al trabajo publicado por Lorenzo et al. (75), se calculó el tamaño muestral empleando el tamaño del efecto (*effect size*) para tasa de proliferación celular y área total de las colonias como nuestros *outcomes* principales. Luego de aplicar la fórmula correspondiente, $Effect\ size = d = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)/2}}$, se determinó que eran necesarios 16

participantes por grupo, para obtener una diferencia mínima del 50% con un poder estadístico del 80% y un nivel de significación de 0.05.

D. Reclutamiento de participantes de estudio

Para el presente proyecto de investigación se reclutaron treinta y siete nativos de altura (MMC=17, andinos sanos = 19) con un rango de edad entre los 20 y 65 años.

Los voluntarios recibieron información acerca del estudio y sus procedimientos, y se les solicitó leyeran el consentimiento informado con la información detallada. Si el voluntario accedía a participar en el estudio, se le solicitaba firmar el consentimiento antes de comenzar con la fase inicial, durante la cual los voluntarios respondieron un cuestionario clínico para evaluar sus características físicas generales; asimismo, se les solicitó su información demográfica (ANEXO 1 Y ANEXO 2).

Se evaluó el hematocrito y se determinó la concentración de Hb de cada uno de los participantes a partir de una gota de sangre obtenida mediante micropunción en la yema del dedo. La función pulmonar se evaluó por medio de una espirometría; se determinó la saturación arterial de O₂ y frecuencia cardíaca a través de pulso oximetría (Covidien Nellcor™ OxiMax N-560 Pulse Oximeter, Boulder, CO), colocando un sensor digital en el dedo por al menos un minuto, luego de haber estado en reposo por 3-5 minutos. La presión sistólica y diastólica se evaluó empleando un tensiómetro digital (A&D UA-767Plus, A&D, Japón).

Los participantes fueron evaluados considerando los criterios de inclusión y exclusión del estudio (Tabla 1). Se evaluó también la presencia y severidad del MMC mediante el uso del Puntaje de Qinghai para MMC (Tabla 2; León-Velarde et al, 2005) a través de un cuestionario.

E. Compensaciones

Los participantes del estudio recibieron una compensación de 40 Nuevos Soles por el tiempo que dedicado al estudio.

Tabla 1. Criterios de Inclusión y Exclusión

<p style="text-align: center;">Inclusión</p>	<ul style="list-style-type: none"> . Residir en la ciudad de Cerro de Pasco y haber nacido a más de 3500 msnm . Rango de edad: 20-65 años . Hematocrito mayor a 63% para pacientes con MMC . Hematocrito menor a 58.5% para controles
<p style="text-align: center;">Exclusión</p>	<ul style="list-style-type: none"> . Transfusión o donación de sangre y/o sangría en los últimos 6 meses. . Haber viajado en los últimos 6 meses, por más de 7 días, a alturas <3000 msnm . Fumar más de 3 cigarrillos al día . Trabajo en mina

Tabla 2. Puntaje de Quinghai para MMC

Falta de aire o palpitaciones	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo	Parestesias	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo
Dilatación de venas	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo	Cefalea	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo
Cianosis	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo	Tinnitus	0 No presenta 1 Leve 2 Moderado 3 Severo
Dificultad para dormir	0 Duerme bien 1 Despierta raras veces durante la noche. 2 Despierta constantemente durante la noche, pocas horas de sueño. 3 No puede conciliar el sueño	Concentración de Hemoglobina	Hombres: >18 g/dl < 21 g/dl 0 ≥21 g/dl 3 Mujeres: >16 g/dl < 19 g/dl 0 ≥19 g/dl 3

F. Muestras de sangre

Se tomaron tres muestras de sangre de la vena antecubital en tubos de 10ml recubiertos en heparina de sodio por cada voluntario para el aislamiento de PBMCs. Se obtuvieron además dos muestras adicionales en tubos de 6ml con separador de suero. Para evitar variación en la concentración de Epo debido al ritmo circadiano, las muestras fueron colectadas entre las 6 y las 7 de la mañana. El suero fue separado mediante centrifugación por 20 minutos a 1100 g, para luego conservarlo en nitrógeno líquido hasta su análisis.

G. Aislamiento y cultivo de PBMC

Se mezcló 5ml de sangre con 5ml de PBS en un tubo Falcon de 15ml y se agregaron los 10ml de mezcla a otro tubo Falcon que contenía 3ml de Ficoll (Histopaque 1077, Sigma), con el cuidado de no generar una mezcla de fases. Luego se procedió a centrifugar por 20 minutos a 400 g (Figura 5A).

Luego del proceso de centrifugación, se obtuvieron cuatro fases celulares y se empleó una micropipeta de 1000µl para extraer las células mononucleares (aprox. 2ml) de la interfase entre el plasma y el Ficoll (Figura 5B). La capa de células se colocó en otro tubo Falcon de 15ml y se agregó PBS hasta completar 10ml; se mezcló el contenido del tubo y se procedió a centrifugar por 10 minutos a 100 g, paso que se realizó dos veces (Figura 5C).

Luego, se resuspendió el pellet en 1ml de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Sigma); y se procedió con el conteo de células en cámara de Neubauer para determinar la cantidad de células por unidad de volumen. Finalmente, se procedió con el cultivo de células MMC como las de individuos andinos sanos en placas de cultivo de 35mm de diámetro, en medio semisólido Methocult H-4534 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC), a una concentración final de 2.5×10^5 células/ml en presencia de 3000mU/ml de Epo recombinante humana (rhEpo; Stemcell Technologies, Vancouver, BC) por 14 días (Figura 5D). Las placas fueron incubadas en condiciones de normoxia e hipoxia, proceso que se realizó por separado: primero se realizó la incubación en hipoxia y luego en normoxia.

Los cultivos celulares se mantuvieron en una cámara de incubación BioSpherix X3 (Biospherix, Parish, NY) a 37°C con 5% CO₂ y 10% O₂ para la condición de normoxia celular. El nivel de normoxia celular para las PBMCs se consideró como la fracción equivalente a la media entre los valores promedio de la PO₂ arterial y venosa (PaO₂=95mmHg and PvO₂=45mmHg, valores referenciales) a nivel del mar (Presión Barométrica (PB)=747 mmHg), considerando la presión de vapor de agua

(P_vH₂O)=47mmHg a 37°; de este modo tenemos que:
$$\frac{\left(\frac{PaO_2 + PvO_2}{2}\right)}{(PB - P_{vH_2O})} = \frac{\left(\frac{95mmHg + 45mmHg}{2}\right)}{(747mmHg - 47mmHg)} =$$

0.099 o 10% O₂. Para la incubación en hipoxia, los niveles de CO₂ se mantuvieron a 5% CO₂, mientras que los niveles de oxígeno se redujeron a 1%.

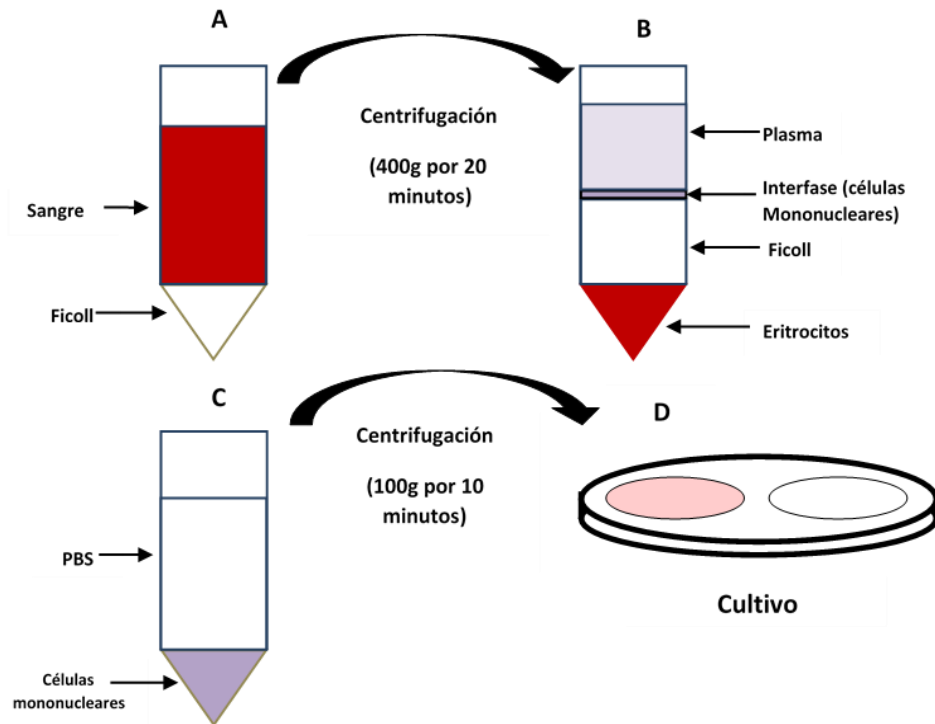


Figura 5. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

H. Identificación y conteo de colonias BFU-E

De acuerdo a los protocolos establecidos para el cultivo de BFU-E derivadas de PBMCs, al sétimo día de incubación es posible apreciar las primeras colonias BFU-E (StemCell Technologies). Con el fin de no interrumpir el período de incubación, se realizó la identificación y el conteo de colonias BFU-E dentro de la cámara BioSpherix X3 en el día 7 empleando un microscopio invertido Lumascope LS560 (Etaluma, Carlsbad, CA) a una magnificación de 20X. En el día 14, los cultivos fueron retirados de la cámara de incubación y se utilizó un AxioZoom Stereomicroscope (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY) a una magnificación de 10X para tomar fotografías digitales de las colonias BFU-E. Las imágenes fueron analizadas con el programa ZEN (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY) para el conteo de colonias y calcular el área ocupada por cada una de ellas. Se determinó también el área total ocupada por las

colonias; dicho parámetro se obtuvo luego de multiplicar el área ocupada por cada colonia por el número de colonias, y se utilizó como un indicador del número total de células. Asimismo, se calculó la tasa de proliferación del número de colonias del día 7 al día 14, que se utilizó como indicador del crecimiento y diferenciación de las colonias.

I. Análisis de sensibilidad a hipoxia y Epo

Se cultivaron PBMCs de un subgrupo de andinos sanos y con MMC a concentraciones crecientes de la hormona (0, 15, 30 y 3000 mU/ml) tanto en hipoxia (MMC, n=5; andinos sanos, n=6) como en normoxia (MMC, n=5; andinos sanos, n=4). Se realizó la cuenta del número de colonias al día 14, y también se determinó el área en mm² de las colonias. Con estos datos se calculó el área total de las colonias para cada una de las concentraciones de Epo.

J. PCR en tiempo real

Se determinó la expresión de *Epo*, *EpoR*, *SENP1* y *GATA1* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), y se utilizó el gen de *18s* ARNr como gen de referencia. El ARN total de *EpoR* y *Epo* fue extraído utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), al cual se le añadió cloroformo y se procedió a centrifugar la muestra por 15 minutos a 4°C y a 12,000g.

Al finalizar el proceso de centrifugado, se obtuvo tres fases: rojo fenol en el fondo del tubo, una interfase y la fase acuosa, que contiene el ARN, en la parte superior. Se colocó la fase acuosa en otro tubo, y se le agregó 0.5ml de isopropanol para luego centrifugar por 10 minutos a 4°C y a 12,000g. Se descartó el sobrenadante y se procedió a enjuagar el ARN; para lo cual se suspendió el precipitado en etanol al 75% y se procedió a centrifugar por 5 minutos a 4°C y a 7500g. Finalmente, se descartó el sobrenadante con una micropipeta y se dejó secar entre 5-10 minutos (Figura 6). Para la generación del ADNc se utilizó 500µg del ARN total y se empleó la enzima polimerasa MultiScribe™ RT (Applied Biosystems, Bedford, MA).

El ARNm total para la cuantificación de *SENP1* y *GATA1* fue aislado utilizando RNeasy Mini kit (QIAGEN, Germantown, MD). Las muestras fueron lisadas y homogenizadas, y luego se añadió etanol. Después, la mezcla del lisado+etanol fue filtrada a través de una membrana de sílice del RNeasy kit; finalmente, se obtiene el ARN puro que será posteriormente diluido (Figura 7). Para generar el ADNc fue se empleó el sistema SuperScript™ III First Strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA).

El qPCR fue realizado en reacciones de 10µl utilizando LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Pleasanton, CA) y 100 pM de los primers diseñados para *Epo*, *EpoR*, *SENP1*, *GATA1* y *18s* ARNr (IDT, Coralville, IA). Las reacciones del PCR fueron realizadas en la plataforma Pikoreal 96 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). Se utilizó el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para cuantificar la expresión de *Epo* y *EpoR* con respecto a la expresión de *18S* ARNr (ANEXO 3).

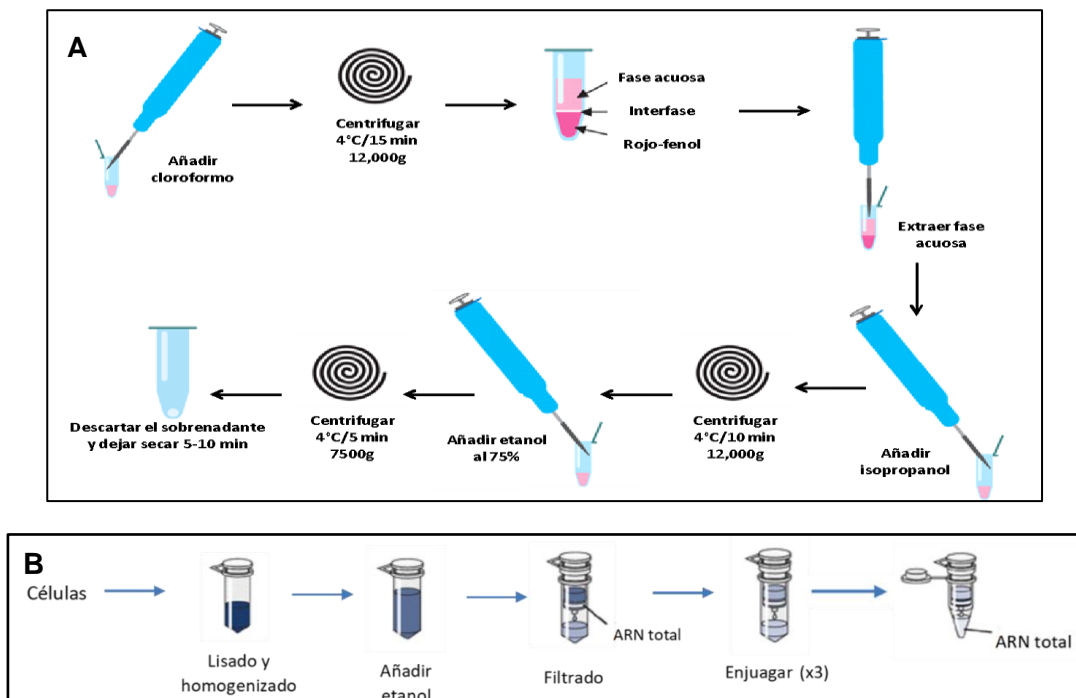


Figura 6. (A) Extracción de ARN mediante método de fenol cloroformo. Modificado de Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud, 2da edición. McGraw-Hill Medical. **(B) Extracción de ARN mediante kit RNeasy.** Modificado del manual de uso del RNeasy kit para purificación de ARN total de células y tejidos animales, bacteria y levadura.

K. Parámetros hematológicos de Epo y perfil de hierro

La concentración sérica de Epo, hierro, ferritina, y transferrina se cuantificó a partir de las muestras de suero de cada voluntario. Los análisis fueron realizados en los laboratorios clínicos MedLab (ISO 9001:2000), Lima, Perú.

L. Análisis estadísticos

Se determinó la normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos, mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y el Test de Fisher, respectivamente. Se empleó el t-test de Student para análisis paramétricos y el t-test de Wilcoxon para no paramétricos, para evaluar las diferencias en los cultivos celulares, así como los niveles de expresión de Epo y EpoR entre ambos grupos, MMC y controles. Para evaluar las diferencias en los niveles de expresión de SENP1 y GATA1, se empleó el t-test de Student. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El análisis estadístico fue realizado utilizando el paquete estadístico STATA 15 (StataCorp., College Station, TX).

V. Resultados

La tabla 3 muestra las características de los grupos de estudio. La edad promedio del grupo con MMC fue menor que la de los nativos sanos, y no hubo diferencias significativas en IMC entre grupos. Los nativos de altura con MMC presentaron mayor Hct, mayor puntaje de MMC, y menor SpO₂. La concentración sérica de Epo y los parámetros hematológicos correspondientes al perfil de hierro fueron similares entre ambos grupos.

Tabla 3. Características de los participantes de estudio

	Andinos sanos (Media ±SE)	Andinos con MMC (Media ±SE)
Edad	51.9 ± 2.2	44.8 ± 2.7*
IMC, kg/m ²	26.1 ± 0.7	26.9 ± 0.8
Hct, %	54.7 ± 0.6	68.1 ± 0.8 ⁺
Puntaje MMC	0.37 ± 0.1	7.1 ± 0.8*
Saturación de O ₂ , %	87.4 ± 0.8	83.8 ± 0.6**
Epo sérica, pg/dl	21.6 ± 6.7	12.8 ± 2.8
Hierro sérico, µg/dl	100.7 ± 10.9	120.3 ± 15.7
Ferritina sérica, ng/ml	162.9 ± 24.2	124.6 ± 19.3
Saturación de transferrina sérica, %	26.4 ± 2.7	29.6 ± 3.8

Andinos sanos (n=19), andinos con mal de montaña crónico (MMC) (n=17). IMC, índice de masa corporal. Significación vs. participantes sanos: *p<0.05, **p<0.01, +p<0.001.

Con los datos obtenidos del número y área de las colonias, se calcularon los parámetros de tasa de proliferación entre el día 7 y el día 14, y área total como indicador del número total de células presentes en las placas. Bajo condiciones hipóxicas (1% O₂), las colonias aisladas de individuos andinos con MMC proliferan más rápido en comparación con las colonias de andinos sanos (Figura 8A). Asimismo, exhiben un crecimiento mayor (Figura 8A) en comparación con las BFU-E de los controles, al ser incubadas en condiciones hipóxicas.

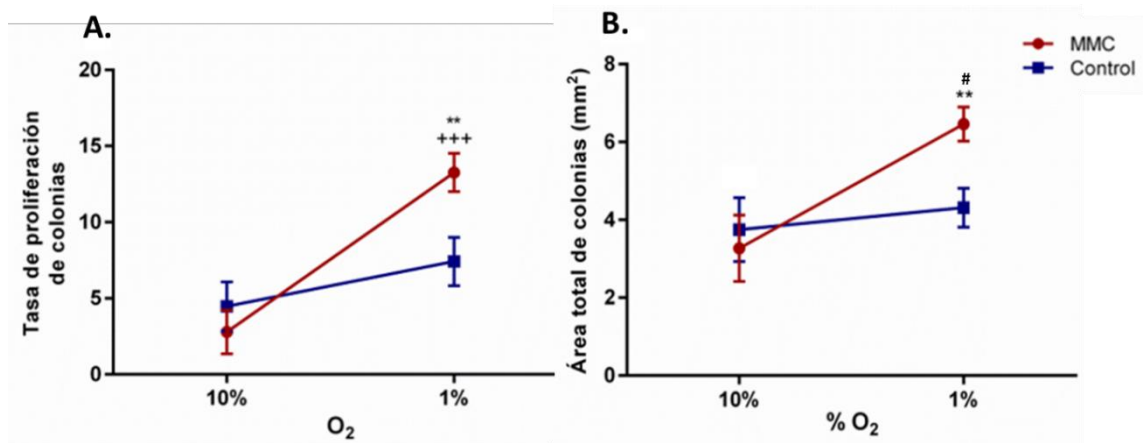


Figura 8. Parámetros de proliferación de BFU-Es en normoxia e hipoxia. **A.** Tasa de proliferación de las colonias BFU-E del día 7 al día 14 de incubación en normoxia e hipoxia, MMC (N=17) vs. Sanos (N=19) a 1% O₂, **p<0.01 ; 1% O₂ vs. 10% O₂ en células MMC, ***p<0.001. **B.** Área total de colonias BFU-E en condiciones de normoxia e hipoxia al día 14, MMC (N=13) vs. Sanos (N=15) a 1% O₂, **p<0.01 ; 1% O₂ vs. 10% O₂ en células MMC, #p<0.01.

La sensibilidad hacia Epo por parte de las colonias BFU-E de nativos de altura con MMC fue mayor bajo condiciones hipóxicas, lo cual se ve reflejado en el incremento del área total al incrementar la concentración de Epo (Figura 9A). En condiciones de normoxia celular, el área total de las colonias de andinos sanos y con MMC muestran un patrón similar de respuesta al estímulo de Epo (Figura 9B).

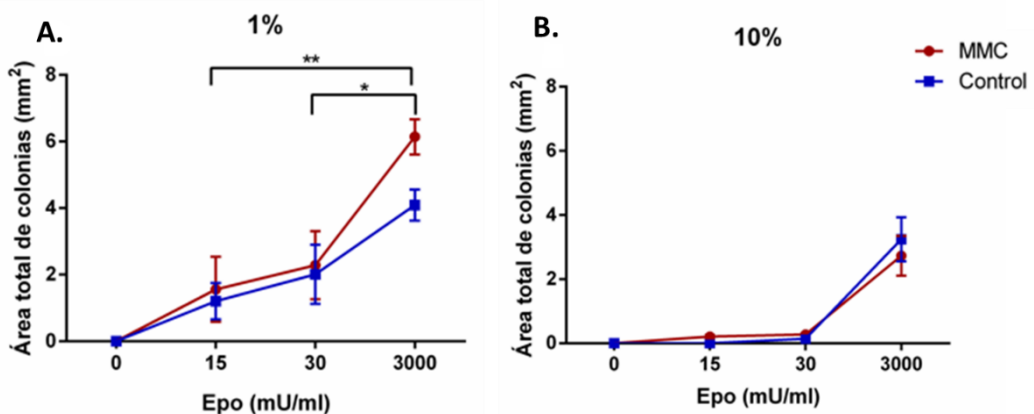


Figura 9. Sensibilidad hacia Epo bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Área total de colonias BFU-E de individuos andinos con MMC (línea roja) e individuos andinos sanos (línea azul) a los 14 días de cultivo, incubadas bajo condiciones de hipoxia (A; MMC=5, andinos sanos=6) y normoxia (B; MMC=5, andinos sanos=4), expuestas a concentraciones crecientes de Epo (0, 15, 30 y 3000 mU/ml). **p<0.01, *p<0.05.

La expresión de ARNm de *Epo* fue similar entre grupos, tanto en hipoxia como en normoxia celular (Figura 10A). Los niveles de expresión de ARNm de *EpoR* a 1% O₂ fueron mayores en colonias BFU-E derivadas de células de nativos de altura con MMC, comparados con los de nativos de altura sanos (Figura 10B). Asimismo, la expresión de ARNm de *SENP1* y *GATA1* en células BFU-E de andinos con MMC, bajo condiciones hipóxicas, fue mayor que la expresión de ARNm de andinos con MMC en normoxia, y que la de células BFU-E de andinos sanos, tanto en hipoxia como en normoxia (Figura 10C y D).

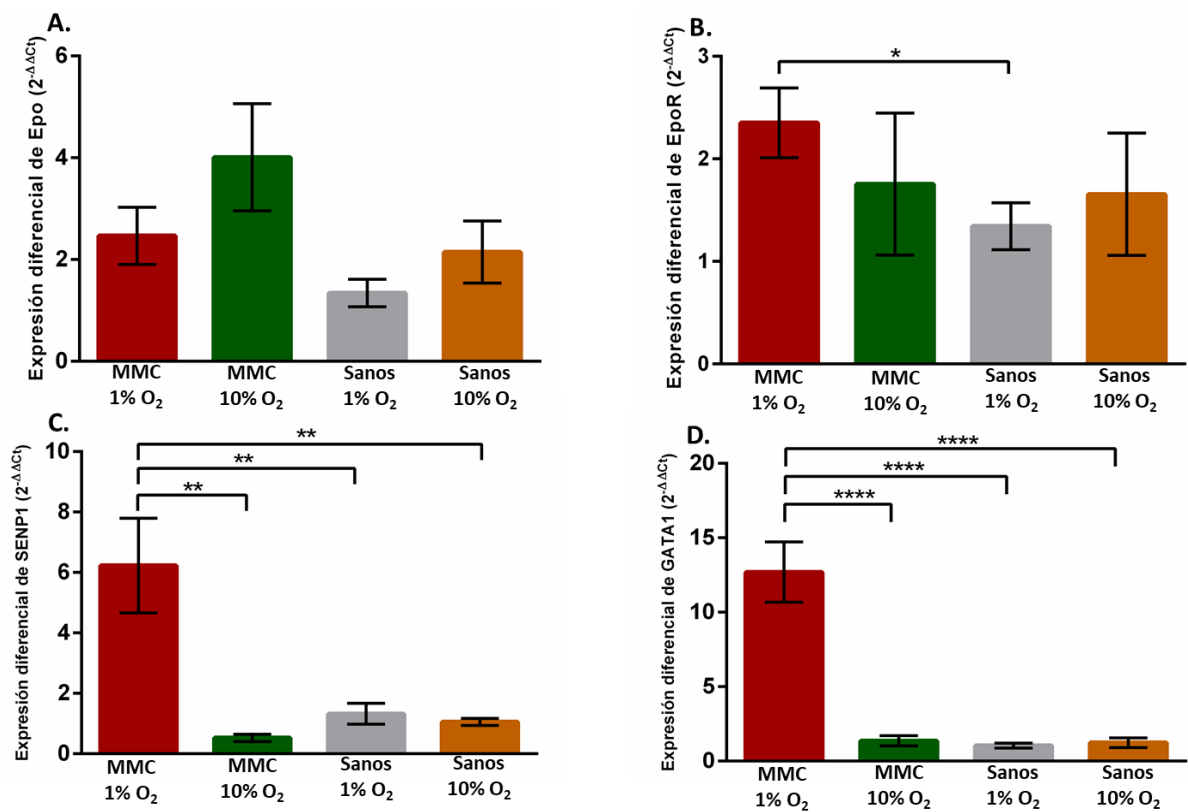


Figura 10. Expresión de ARNm en las colonias BFU-E de andinos sanos y con MMC luego de 14 días de incubación bajo condiciones de normoxia e hipoxia. (A) *Epo*, (B) *EpoR*, (C) *SENP1* y (D) *GATA1*. MMC-1% O₂ (N=17), MMC-10% O₂ (N=13), Sanos-1% O₂ (N=19), Sanos-10% O₂ (N= 15). Las barras corresponden a la media \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Los resultados del presente estudio muestran que los progenitores eritroides de nativos de altura con MMC muestran mayor proliferación y generación de colonias BFU-E cuando son incubadas en condiciones hipóxicas (Figura 11).

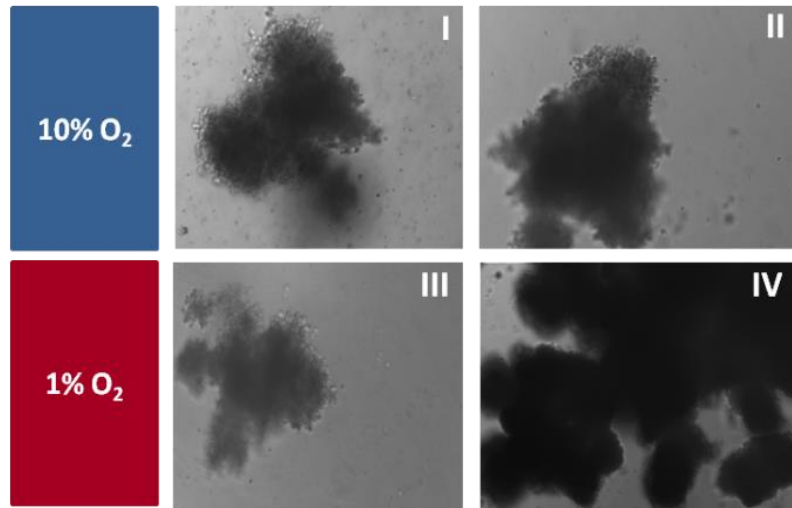


Figura 11. Colonias BFU-E cultivadas en hipoxia y normoxia. I y II, colonias de andinos sanos y con MMC, respectivamente, incubadas a 10% O₂. III y IV, colonias de andinos sanos y con MMC, respectivamente, incubadas a 1% O₂. Magnificación: 20x

VI. Discusión

La presencia de EE en la población andina como respuesta al estímulo hipóxico puede interpretarse como un signo de mal adaptación a la vida en altura, contrario a lo que se observa en los habitantes de la meseta del Tíbet. La variabilidad presente en factores hormonales y cardio-respiratorios, no explica la exagerada respuesta eritroide.

En el presente estudio, reportamos que la concentración de Epo sérica no es suficiente para explicar el desarrollo de EE, ya que tanto individuos andinos sanos como aquellos que padecen de MMC poseen valores similares de la hormona; por lo que es posible que alteraciones a nivel celular estén involucradas en el desarrollo de EE.

Nuestro trabajo muestra que las células BFU-E de nativos de altura con MMC son más sensibles a Epo al ser cultivadas en un ambiente hipóxico, exhibiendo una mayor área total y mayor tasa de proliferación en comparación a los nativos sanos. Es más, se observó que el área total y la tasa de proliferación de las BFU-E de individuos andinos sanos no incrementan de modo significativo, lo que sugiere que su respuesta eritropoyética al estímulo hipóxico se encontraría comparativamente atenuada.

Un estudio en el que se comparó la respuesta proliferativa de BFU-E de tibetanos y de nativos del nivel del mar mostró que bajo condiciones hipóxicas, los progenitores eritroides de los primeros proliferan menos que las células de individuos del nivel del mar (75). Se determinó que esta atenuación en la respuesta eritropoyética está asociada a la presencia de variantes del gen *EGLN1* que regula la expresión de la prolil-hidroxilasa 2 (PHD 2), proteína involucrada en la degradación de HIF en condiciones de normoxia. Estas variantes del gen *EGLN1* exhiben mutaciones de cambio de sentido (c. 12C>G, c. 380G>C), las cuales se consideran como alelos protectores contra el desarrollo de eritrocitosis de altura, ya que su presencia estaría asociada a la baja concentración de Hb en tibetanos (77).

Por otro lado, en la población andina de Cerro de Pasco, estas variantes del gen *EGLN1* se encuentran en una frecuencia casi nula (78), sugiriendo que la respuesta proliferativa de las células BFU-E de individuos andinos sanos en condiciones hipóxicas esté relacionada con la actividad de otros genes y refleje un mecanismo diferente de adaptación (63,79, 80), o esté asociada a una modificación epigenética relacionada a la exposición crónica a hipoxia (91). Mientras que diversos estudios realizados en distintas poblaciones de Etiopía indican que la actividad de un conjunto de genes, no reportados anteriormente en ninguna de las tres poblaciones, podría estar asociada a la tolerancia ante el estímulo hipóxico (92, 93).

Un estudio reciente mostró que la expresión de ARNm de *Epo* en células mononucleares de médula ósea de individuos con MMC, residentes de la meseta de Quinghai, China, es mayor comparada con las muestras aisladas de sujetos sanos,

mientras que la expresión de EpoR es similar (81). En nuestro estudio, mostramos que ocurre lo contrario.

Es posible que esta discrepancia radique en que las células mononucleares y las BFU-E requieren distintos niveles de Epo para desarrollarse, ya que pertenecen a diferentes estadios celulares. Las células mononucleares se encuentran en una etapa inicial de diferenciación en la que necesitan de Epo para comprometerse al linaje eritroide e iniciar el proceso de diferenciación (47, 82, 83). Debido a ello, es posible que en este estadio basal ocurra un incremento en la expresión de *Epo* y de su efecto paracrino, con una menor densidad de EpoR.

En nuestro estudio se midió la expresión de *EpoR* en células BFU-E, estadio inicial de progenitores eritroides, en el que las células cuentan con una mayor densidad de EpoR, por lo que ya no requieren incrementar la expresión de Epo para continuar con la diferenciación y proliferación celular (39, 84). Por lo tanto, es posible que bajo condiciones hipóxicas, las células BFU-E de individuos andinos con MMC promuevan el incremento en la expresión de *EpoR*, lo cual estaría asociado a una mayor tasa de proliferación en las colonias BFU-E y un mayor hematocrito, como se reporta en este trabajo.

Existen diversos genes que se encuentran involucrados en la regulación de mecanismos de respuesta a la hipoxia (62, 85), por lo que se ha sugerido que la expresión alterada de otros genes, además de *Epo* y *EpoR*, podría estar asociada a la característica producción exagerada de eritrocitos en el MMC; *SENP1* es el que ha cobrado mayor importancia en los últimos años (74, 86, 87). Se ha reportado que existen diferentes frecuencias haplotípicas de *SENP1* entre individuos andinos con y sin MMC (65); lo que convirtió a *SENP1* en un posible candidato para explicar las diferencias que existen entre sujetos que padecen de este síndrome y los que no.

Debido a la asociación reportada de *SENP1* con la respuesta eritropoyética excesiva, se ha sugerido que *GATA1*, un factor de transcripción crucial para promover la expresión de genes involucrados en el proceso eritropoyético, y cuya actividad está

relacionada con la proliferación, diferenciación y supervivencia de progenitores eritroides (70, 73, 88); sería uno de los blancos de desumolación de SENP1 (74, 87).

Nuestros resultados corroboran los hallazgos reportados recientemente en los que la proliferación de progenitores eritroides tardíos derivados de iPSCs fue mayor al ser incubadas en condiciones hipóxicas (74). En nuestro estudio, se resalta la elevada expresión de ARNm de *SENP1* y *GATA1* en progenitores eritroides tempranos de individuos andinos con MMC. Estas observaciones sugieren que la proliferación excesiva de eritrocitos en respuesta al estímulo eritropoyético podría iniciarse desde estadios basales de diferenciación, ya que el incremento en la expresión de *EpoR* podría estar asociado a una mayor expresión de *SENP1* y de *GATA1*.

A nivel funcional, ha sido reportado que la actividad transcripcional de SENP1 es mayor en células de individuos andinos con MMC en comparación con células de individuos andinos sanos (65). Asimismo, en el estudio realizado con iPSCs, se mostró que la expresión diferencial del gen anti-apoptótico *Bcl-xL* en células de andinos con y sin MMC estaría relacionada a la actividad de GATA1, luego de ser activada por SENP1; sugiriendo un vínculo entre la actividad reguladora de SENP1 y los procesos de apoptosis celular (74).

Adicionalmente, diversos estudios han reportado que una de las funciones principales de GATA1 consiste en promover la transcripción y expresión del *EpoR* (70, 71). Asimismo, existen diversos estudios respecto a la interacción y diversas relaciones funcionales que existen entre GATA1 y *EpoR* (71, 72); lo que refuerza la importancia del rol de GATA1 en el desarrollo de EE en nativos de altura andinos.

Es posible entonces que la exagerada producción de eritrocitos en células de andinos con MMC sea resultado de un incremento en el número de receptores de *Epo*, el cual podría estar vinculado a una mayor expresión del gen de *EpoR*, producto de un incremento en la expresión de ARNm de *SENP1* y *GATA1*. De este modo, se incrementaría el número de sitios de unión de *EpoR* disponibles, aumentando la actividad de dicha vía de señalización y la expresión de factores antiapoptóticos.

Nuestro estudio realizado en base a la extracción de PBMCs aisladas de individuos andinos con y sin MMC, es el primero en mostrar el comportamiento de progenitores eritroides de esta población en respuesta al estímulo hipóxico, sin estar influenciados por factores sistémicos confusores; lo que nos ha permitido demostrar que el desarrollo de EE está influenciado no solo por estímulos hormonales o cardio-respiratorios. El presente trabajo muestra que existe también un patrón distinto en la expresión de genes entre los nativos de altura sanos y aquellos con MMC; y que esta diferencia de expresión genética coincide con una elevada producción de eritrocitos.

Estos resultados nos permiten establecer una posible relación entre la mayor expresión de ARNm de *EpoR*, *GATA1* y *SENP1*, y la exacerbada proliferación celular de progenitores eritroides aislados de individuos andinos con MMC. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar con mayor precisión las posibles modificaciones e interacciones a nivel proteico, tanto de *SENP1* como de *GATA1*, y demostrar que ellas determinan el aumento en la expresión de *EpoR*, lo que conllevaría a la manifestación del MMC en la población andina.

VII. Conclusiones

El presente estudio ha permitido determinar que las células BFU-E de andinos con MMC son más sensibles y proliferan más bajo condiciones hipóxicas que aquellas de andinos sanos. También se logró establecer una relación entre la proliferación exacerbada de progenitores eritroides BFU-E de individuos andinos con MMC y la sobre expresión de ARNm de *EpoR*. Asimismo, en condiciones hipóxicas, se mostró que las células diferenciadas de PBMCs de individuos andinos con MMC expresan niveles mayores de ARNm de *SENP1* y *GATA1* que las células de individuos andinos sanos; exhibiendo un comportamiento similar al de células derivadas de iPSCs.

VIII. Limitaciones

Una limitante durante el desarrollo del presente trabajo de investigación fue la contaminación de parte de los cultivos en normoxia celular, lo que generó una disminución del número inicial de participantes. Adicionalmente, para la toma de muestras y la obtención de las PMBCs, se planificaron un total de 8 viajes. Este esquema se diseñó teniendo en consideración que los cultivos en normoxia e hipoxia no pueden ser realizados en el mismo momento, y también teniendo en cuenta la capacidad de procesamiento para la incubación de muestras en cada condición. Esto generó que el número de muestras no alcanzara el valor mínimo necesario para los cultivos en normoxia, ya que, durante cada uno de los viajes, algunos voluntarios no disponían de tiempo para realizar la toma de muestra. No obstante, el tamaño muestral inicial se calculó para obtener una diferencia amplia entre grupos para cada uno de los *outcomes* principales, por lo que fue posible obtener significación aún cuando se haya reducido el número de individuos.

Una limitante adicional de nuestro estudio radica en que debido a que el MMC se agrava con la edad, podrían existir individuos asintomáticos que han sido clasificados como participantes sanos cuando en realidad no lo son. Sin embargo, luego de realizar un análisis de correlación simple entre edad, tasa de proliferación y área total, respectivamente, no se encontró una asociación significativa que indicara una influencia de la edad sobre alguna de estas variables.

Otra limitante del proyecto radica en el diseño del primer para amplificar el ADNc de *EpoR*, si bien este hecho no afecta la interpretación de los resultados obtenidos. Para este trabajo de investigación se utilizó un primer que mide la expresión primaria del ARNm de *EpoR*, que no permite distinguir el ARNm del *EpoR* de membrana del de su versión soluble.

Finalmente, a pesar de que los resultados sugieren una relación entre la expresión de ARNm de *EpoR*, *SENP1* y *GATA1*, y una proliferación excesiva de progenitores eritroides BFU-E; esta debe de ser confirmada también a nivel proteico que es donde ocurre la interacción entre estos genes.

IX. Futuros pasos

Este estudio constituye una base para futuras investigaciones en donde se pueda evaluar el efecto de la sobreexpresión de ARNm de progenitores eritroides BFU-E a nivel proteico y funcional. Por otro lado, ya que las células derivadas de iPSCs muestran un comportamiento similar al de células nativas en términos de proliferación y expresión génica, el uso de esta novedosa técnica podría generar una fuente ilimitada de recursos que permitan determinar el mecanismo fisiopatológico de la EE.

X. Referencias bibliográficas

1. Rademaker K, Hodgins G, Moore K, Zarrillo S, Miller C, Bromley GR, et al. Paleoindian settlement of the high-altitude Peruvian Andes. *Science* (New York, NY. 2014;346(6208):466-9.
2. Zhang XL, Ha BB, Wang SJ, Chen ZJ, Ge JY, Long H, et al. The earliest human occupation of the high-altitude Tibetan Plateau 40 thousand to 30 thousand years ago. *Science* (New York, NY. 2018;362(6418):1049-51.
3. Moore LG, Niermeyer S, Zamudio S. Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives. *American journal of physical anthropology*. 1998;Suppl 27:25-64.
4. Leon-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, Aldashev A, Asmus I, Bernardi L, et al. Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol*. 2005;6(2):147-57.
5. Moore LG. Measuring high-altitude adaptation. *J Appl Physiol* (1985). 2017;123(5):1371-85.
6. Leon-Velarde F, Gamboa A, Rivera-Ch M, Palacios JA, Robbins PA. Selected contribution: Peripheral chemoreflex function in high-altitude natives and patients with chronic mountain sickness. *J Appl Physiol* (1985). 2003;94(3):1269-78; discussion 53-4.
7. Beall CM, Brittenham GM, Strohl KP, Blangero J, Williams-Blangero S, Goldstein MC, et al. Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara. *American journal of physical anthropology*. 1998;106(3):385-400.
8. Beall CM. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integrative and comparative biology*. 2006;46(1):18-24.
9. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104 Suppl 1:8655-60.
10. Cosio G. Características Hemáticas y Cardiopulmonares Del Minero Andino. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 1972;72:547-57.
11. Beall CM, Reichsman AB. Hemoglobin levels in a Himalayan high altitude population. *American journal of physical anthropology*. 1984;63(3):301-6.

12. Lahiri S, Edelman NH, Cherniack NS, Fishman AP. Blunted hypoxic drive to ventilation in subjects with life-long hypoxemia. *Federation proceedings*. 1969;28(3):1289-95.
13. Beall CM SK, Blangero J, Williams-Blangero S, Almasy LA, Decker MJ, Worthman CM, Goldstein MC, Vargas E, Villena M, Soria R, Alarcon AM, Gonzales C. Ventilation and hypoxic ventilatory response of Tibetan and Aymara high altitude natives. *Am J Phys Anthropol*. 1997;104(4).
14. Hackett PH. Acute mountain sickness - the clinical approach. *Advances in cardiology*. 1980;27:6-10.
15. Zhuang J, Droma T, Sun S, Janes C, McCullough RE, McCullough RG, et al. Hypoxic ventilatory responsiveness in Tibetan compared with Han residents of 3,658 m. *J Appl Physiol (1985)*. 1993;74(1):303-11.
16. Beall CM, Laskowski D, Strohl KP, Soria R, Villena M, Vargas E, et al. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers. *Nature*. 2001;414(6862):411-2.
17. Ward SA. Control of the exercise hyperpnoea in humans: a modeling perspective. *Respiration physiology*. 2000;122(2-3):149-66.
18. Baker PT, & Little, M. A. . *Man in the Andes*. Dowden, Hutchinson & Ross. *Man in the Andes*. Dowden, Hutchinson & Ross. 1976.
19. Monge M. C. La enfermedad de los Andes (Síndromes eritrémicos). *Anales De La Facultad De Medicina*. 1928;14(314).
20. Villafuerte FC, Corante N, Anza-Ramirez C, Figueroa-Mujica R, Vizcardo-Galindo G, Mercado A, et al. Plasma soluble erythropoietin receptor is decreased during sleep in Andean highlanders with Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol (1985)*. 2016;121(1):53-8.
21. Penalzoza D, Sime F. Chronic cor pulmonale due to loss of altitude acclimatization (chronic mountain sickness). *The American journal of medicine*. 1971;50(6):728-43.
22. Penalzoza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation*. 2007;115(9):1132-46.
23. Sime F, Monge C, Whittembury J. Age as a cause of chronic mountain sickness (Monge's disease). *International journal of biometeorology*. 1975;19(2):93-8.

24. F. León-Velarde DSc AAM, C. Monge MD, H. Ruiz y Ruiz. Aging at high altitudes and the risk of chronic mountain sickness. *Journal of Wilderness Medicine*. 1993;4(2):183-8.
25. Monge C, Leon-Velarde, F., Arregui, A. Increasing prevalence of excessive erythrocytosis with age among healthy high-altitude miners. *The New England journal of medicine*. 1989;321(18):1271.
26. Whittombury J, Monge CC. High altitude, haematocrit and age. *Nature*. 1972;238(5362):278-9.
27. Leon-Velarde F, Ramos MA, Hernandez JA, De Idiaquez D, Munoz LS, Gaffo A, et al. The role of menopause in the development of chronic mountain sickness. *The American journal of physiology*. 1997;272(1 Pt 2):R90-4.
28. Leon-Velarde F, Rivera-Chira M, Tapia R, Huicho L, Monge CC. Relationship of ovarian hormones to hypoxemia in women residents of 4,300 m. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(2):R488-93.
29. Monge M MC. High-altitude diseases. Mechanism and management. Springfield, USA: Charles C Thomas. 1966.
30. Huerta-Sanchez E, Jin X, Asan, Bianba Z, Peter BM, Vinckenbosch N, et al. Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. *Nature*. 2014;512(7513):194-7.
31. Jiang L, Peng J, Huang M, Liu J, Wang L, Ma Q, et al. Differentiation analysis for estimating individual ancestry from the Tibetan Plateau by an archaic altitude adaptation EPAS1 haplotype among East Asian populations. *International journal of legal medicine*. 2018;132(6):1527-35.
32. Lu D, Lou H, Yuan K, Wang X, Wang Y, Zhang C, et al. Ancestral Origins and Genetic History of Tibetan Highlanders. *American journal of human genetics*. 2016;99(3):580-94.
33. Xing G, Qualls C, Huicho L, Rivera-Ch M, Stobdan T, Slessarev M, et al. Adaptation and mal-adaptation to ambient hypoxia; Andean, Ethiopian and Himalayan patterns. *PloS one*. 2008;3(6):e2342.

34. Richalet JP, Rivera M, Bouchet P, Chirinos E, Onnen I, Petitjean O, et al. Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(11):1427-33.
35. Richalet JP, Rivera-Ch M, Maignan M, Privat C, Pham I, Macarlupu JL, et al. Acetazolamide for Monge's disease: efficiency and tolerance of 6-month treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(12):1370-6.
36. Villafuerte FC, Corante N. Chronic Mountain Sickness: Clinical Aspects, Etiology, Management, and Treatment. *High Alt Med Biol*. 2016;17(2):61-9.
37. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*. 1991;77(11):2497-503.
38. Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early human development*. 1998;52(3):235-49.
39. Constance Tom Noguchi LW, Heather M. Rogers, Ruifeng Teng, Yi Jia. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med*. 2011.
40. Kawahara M, Ueda H, Tsumoto K, Kumagai I, Nagamune T. Mimicry of erythropoietin and interleukin-6 signalling by an antibody/cytokine receptor chimera in murine myeloid 32D cells. *Journal of biochemistry*. 2007;141(4):563-71.
41. Naoshi Obara NS, Kibom Kim, Toshiro Nagasawa, Shigehiko Imagawa and Masayuki Yamamoto. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. *Blood*. 2008;111(10):5223-32.
42. Dainiak N, Spielvogel H, Sorba S, Cudkowicz L. Erythropoietin and the polycythemia of high-altitude dwellers. *Advances in experimental medicine and biology*. 1989;271:17-21.
43. León-Velarde F MC, Vidal A, Carcagno M, Criscuolo M, Bozzini CE. Serum immunoreactive erythropoietin in high altitude natives with and without excessive erythrocytosis. *Exp Hematol*. 1991;19(4):257-60.
44. Villafuerte FC, Macarlupu JL, Anza-Ramirez C, Corrales-Melgar D, Vizcardo-Galindo G, Corante N, et al. Decreased plasma soluble erythropoietin receptor in high-

altitude excessive erythrocytosis and Chronic Mountain Sickness. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(11):1356-62.

45. Hsieh MM, Callacondo D, Rojas-Camayo J, Quesada-Olarte J, Wang X, Uchida N, et al. SENP1, but not fetal hemoglobin, differentiates Andean highlanders with chronic mountain sickness from healthy individuals among Andean highlanders. *Experimental hematology*. 2016;44(6):483-90 e2.

46. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*. 1991;77(12):2583-90.

47. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83(1):59-67.

48. Wierenga AT, Vellenga E, Schuringa JJ. Down-regulation of GATA1 uncouples STAT5-induced erythroid differentiation from stem/progenitor cell proliferation. *Blood*. 2010;115(22):4367-76.

49. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1251-8.

50. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 2:22-8.

51. Carroll MP, Spivak JL, McMahon M, Weich N, Rapp UR, May WS. Erythropoietin induces Raf-1 activation and Raf-1 is required for erythropoietin-mediated proliferation. *J Biol Chem*. 1991;266(23):14964-9.

52. Zhao YZ, Yuan WP, Cheng T. [Roles of STAT5 in hematopoietic regulation and blood diseases]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2012;20(6):1496-500.

53. Harris KW, Winkelmann JC. Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma. *American journal of hematology*. 1996;52(1):8-13.

54. Nagao M, Masuda S, Abe S, Ueda M, Sasaki R. Production and ligand-binding characteristics of the soluble form of murine erythropoietin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;188(2):888-97.

55. Heaney ML, Golde DW. Soluble cytokine receptors. *Blood*. 1996;87(3):847-57.

56. Baynes RD RG, Shih YJ, Skikne BS, Cook JD. Serum form of the erythropoietin receptor identified by a sequence-specific peptide antibody. *Blood*. 1993;82(7):8.
57. Westphal G BK, Debus J. Detection and quantification of the soluble form of the human erythropoietin receptor (sEpoR) in the growth medium of tumor cell lines and in the plasma of blood samples. *Clin Exp Med* 2002;2(1).
58. Soliz J, Gassmann M, Joseph V. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Physiol*. 2007;583(Pt 1):329-36.
59. J.V. Brugniaux VP, G.E. Foster, C.T.C. Duggan, M. Eliasziw, P.J. Hanly, M.J. Poulin. Effects of intermittent hypoxia on erythropoietin, soluble erythropoietin receptor and ventilation in humans. *European Respiratory Journal*. 2011;37(4):8.
60. Maruyama H, Higuchi M, Higuchi N, Kameda S, Saito M, Sugawa M, et al. Post-secretion neutralization of transgene-derived effect: soluble erythropoietin receptor/IgG1Fc expressed in liver neutralizes erythropoietin produced in muscle. *The journal of gene medicine*. 2004;6(2):228-37.
61. Appenzeller O, Minko T, Qualls C, Pozharov V, Gamboa J, Gamboa A, et al. Gene expression, autonomic function and chronic hypoxia: lessons from the Andes. *Clin Auton Res*. 2006;16(3):217-22.
62. Azad P, Stobdan T, Zhou D, Hartley I, Akbari A, Bafna V, et al. High-altitude adaptation in humans: from genomics to integrative physiology. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2017;95(12):1269-82.
63. Crawford JE, Amaru R, Song J, Julian CG, Racimo F, Cheng JY, et al. Natural Selection on Genes Related to Cardiovascular Health in High-Altitude Adapted Andeans. *American journal of human genetics*. 2017;101(5):752-67.
64. Leon-Velarde F, Mejia O. Gene expression in chronic high altitude diseases. *High Alt Med Biol*. 2008;9(2):130-9.
65. Zhou D, Udpa N, Ronen R, Stobdan T, Liang J, Appenzeller O, et al. Whole-genome sequencing uncovers the genetic basis of chronic mountain sickness in Andean highlanders. *American journal of human genetics*. 2013;93(3):452-62.

66. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5510-4.
67. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):7987-92.
68. S. Ramakrishnan VAaSR. Vascular Endothelial growth factor signaling in hypoxia and Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2014;9(2):142–60.
69. Haase VH. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. *Hemodialysis international*. 21 Suppl 1:S110-S24.
70. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(4):1215-27.
71. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10638-41.
72. Chiba T, Nagata Y, Kishi A, Sakamaki K, Miyajima A, Yamamoto M, et al. Induction of erythroid-specific gene expression in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(24):11593-7.
73. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
74. Azad P, Zhao HW, Cabrales PJ, Ronen R, Zhou D, Poulsen O, et al. Senp1 drives hypoxia-induced polycythemia via GATA1 and Bcl-xL in subjects with Monge's disease. *The Journal of experimental medicine*. 2016;213(12):2729-44.
75. Lorenzo FR, Huff C, Myllymaki M, Olenchock B, Swierczek S, Tashi T, et al. A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation. *Nature genetics*. 2014;46(9):951-6.

76. Milledge J, Bartsch, P. Blood and haemostasis. In: Swenson ER, Bärtsch, Peter, editor. *High Altitude: Human Adaptation to Hypoxia*. New York: Springer; 2014. p. 203-16.
77. Simonson TS, Yang Y, Huff CD, Yun H, Qin G, Witherspoon DJ, et al. Genetic evidence for high-altitude adaptation in Tibet. *Science (New York, NY)*. 2010;329(5987):72-5.
78. Heinrich EC WL, Lawrence ES, et al. Genetic variants at the EGLN1 locus associated with high-altitude adaptation in Tibetans are absent or found at low frequency in highland Andeans. *Annals of Human Genetics*. 2018:1-6.
79. Eichstaedt CA, Antao T, Pagani L, Cardona A, Kivisild T, Mormina M. The Andean adaptive toolkit to counteract high altitude maladaptation: genome-wide and phenotypic analysis of the Collas. *PLoS one*. 2014;9(3):e93314.
80. Eichstaedt CA, Pagani L, Antao T, Inchley CE, Cardona A, Morseburg A, et al. Evidence of Early-Stage Selection on EPAS1 and GPR126 Genes in Andean High Altitude Populations. *Scientific reports*. 2017;7(1):13042.
81. Su J, Li Z, Cui S, Ji L, Geng H, Chai K, et al. The Local HIF-2 α /EPO Pathway in the Bone Marrow is Associated with Excessive Erythrocytosis and the Increase in Bone Marrow Microvessel Density in Chronic Mountain Sickness. *High Alt Med Biol*. 2015;16(4):318-30.
82. Grover A, Mancini E, Moore S, Mead AJ, Atkinson D, Rasmussen KD, et al. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(2):181-8.
83. Ward D, Carter D, Homer M, Marucci L, Gampel A. Mathematical modeling reveals differential effects of erythropoietin on proliferation and lineage commitment of human hematopoietic progenitors in early erythroid culture. *Haematologica*. 2016;101(3):286-96.
84. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in cell biology*. 2005;15(3):146-55.
85. Stobdan T, Akbari A, Azad P, Zhou D, Poulsen O, Appenzeller O, et al. New Insights into the Genetic Basis of Monge's Disease and Adaptation to High-Altitude. *Molecular biology and evolution*. 2017;34(12):3154-68.

86. Jinke Cheng XK, Sui Zhang and Edward T.H. Yeh. SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia. *Cell*. 2007;131(3):584–95.
87. Yu L, Ji W, Zhang H, Renda MJ, He Y, Lin S, et al. SENP1-mediated GATA1 deSUMOylation is critical for definitive erythropoiesis. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(6):1183-95.
88. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 2006;107(3):907-15.
89. Viault F. Constitución de la sangre en los habitantes de las planicies elevadas. *El Monitor Médico* 1891; 7 (151): 124-125.
90. Beall, C. M., Decker, M. J., Brittenham, G. M., Kushner, I., Gebremedhin, A., & Strohl, K. P. An Ethiopian pattern of human adaptation to high-altitude hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99(26), 17215-17218.
91. Julian, C. G. An Aptitude for Altitude: Are Epigenomic Processes Involved?. *Frontiers in Physiology*. 2019; 10, 1397.
92. Alkorta-Aranburu, G., Beall, C. M., Witonsky, D. B., Gebremedhin, A., Pritchard, J. K., & Di Rienzo, A. The genetic architecture of adaptations to high altitude in Ethiopia. *PLoS genetics*. 2012; 8(12), e1003110.
93. Udpa, N., Ronen, R., Zhou, D., Liang, J., Stobdan, T., Appenzeller, O., Yin, Y., Du, Y., Guo, L., Cao, R., Wang, Y., Jin, X., Huang, C., Jia, W., Cao, D., Guo, G., Claydon, VE., Hainsworth, R., Gamboa, JL, Zibenigus, M., Zenebe, G., Xue, J., Liu, S., Frazer, KA., Li, Y., Bafna, V., Haddad, GG. Whole genome sequencing of Ethiopian highlanders reveals conserved hypoxia tolerance genes. *Genome biology*. 2014; 15(2), R36.

XII. Anexo II: Historia Clínica

___/___/___

HISTORIA CLÍNICA

Nombre completo: _____ Género: _____

Fecha de nac./edad: _____/_____ Talla: _____ Peso: _____

Lugar de nacimiento: _____ Padres: _____/_____

Ocupación: _____ Teléfono: _____ Ref.: _____

Hematología		Hepático digestivo		Dermatología	
Alergias		Neurología		Psiquiatría	
Infecciones		Oseas		Urinario/genital	
Pulmonar		Oftalmológicas		Endocrino	
Cardiopatías		Otorrinolaringolog.		Sangría	
Otro	GLUC e insulina anterior				

Enfermedades

Score de Mal de Montaña

Falta de aire o palpitaciones		Parestesias	
Dificultad para dormir		Cefalea	
Cianosis		Tinnitus	
Dilatación de venas		Hemoglobina (<21g/dl: 0 >21g/dl: 3)	

Ausente: 0

Leve: 1

Moderado: 2

Severo: 3

Hcto: ____/____

Hb: ____/____

SCORE: ____

Fecha de primer diagnóstico de EE/MMC			
Fuma	NO	SI	
Toma más de 2 vasos de bebidas alcohólicas al día	NO	SI	
Nació en altura (3000 msnm o más)	NO	SI	
Padres nacidos en altura (3000 msnm o más)	NO	SI	
Viajes por más de 7 días a alturas menores de 3000 en los últimos 6 meses	NO	SI	
Medicamentos	NO	SI	Dosis:

SpO₂ (%) _____

FC (lpm) _____

Perímetro abdominal _____

PA (mmHg)

PA sistólica _____

PA diastólica _____

XIII. Anexolll: Metodología para PCR en tiempo real

El qPCR fue realizado en reacciones de 10 µl utilizando LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Pleasanton, CA) y 100 pM de los primers diseñados para *Epo*, *EpoR*, *SENP1*, *GATA1* y *18s* ARNr. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado para cada una de las muestras. Se realizaron 40 ciclos de 2 minutos a una temperatura de 95°C, y de 1 minuto a 60°C en la plataforma Pikoreal 96 (Thermo Fisher Scientific), según lo indicado por el fabricante.

Las secuencias de los primers utilizados fueron las siguientes:

Epo-L: 5'-TCATCTGTGACAGCCGAGTC-3'

Epo-R: 5'-TTTGGTGTCTGGGACAGT GA-3'

EpoR-L: 5'-AC CTTGTGGTATCTGACTCTGG-3'

EpoR-R: 5'-GAGTAGGGGCCATCGG ATAAG-3'

SENP1-L: 5'-AAGCCCAGACTGAAAAGGGT-3'

SENP1-R: 5'-CAGAGTTAAGGACCAGTGGGG-3'

GATA1-L: 5'-CCTGCTTTGTTGCCAATG-3'

GATA1-R: 5'-CTGCTCCACTGTTACGGATAC-3'

18s ARNr-L: 5'-GAGGATGAGGTGGAACGTGT-3'

18s ARNr-R: 5'-GGACCTGGCTGTATTTTCCA-3'