

N. Brandan *
M.V. Aguirre **
M. Alvarez ***
J. Juaristi **.

Cátedra de Bioquímica. INBIFAR.
Facultad de Medicina. U.N.N.E.

Respuesta esplénica murina a eritropoyetina humana recombinante en función de la hipoxia

Introducción

El sistema hemopoyético responde a la hipoxia con una serie de acomodaciones destinadas a asimilar las variaciones del medio. Los niveles plasmáticos de eritropoyetina (Epo) se elevan rápidamente, alcanzado su máxima concentración alrededor de las 24 hs., descendiendo luego a valores próximos a los basales (8). En respuesta a estos títulos séricos, hay una explosión esplénica (2) que transforma al bazo murino en un órgano eritroideo por excelencia. Esto se debe a una reorganización de las poblaciones celulares caracterizada por proliferación "in situ" de los progenitores eritroides, desplazamiento de las poblaciones celulares hacia las fases más Epo sensibles del ciclo (11) y fundamentalmente, migración de progenitores eritroides de médula ósea a bazo (9). La magnitud del incremento de la respuesta esplénica no podría explicarse sin esta colonización medular.

Además de la hipoxia, una multiplicidad de estímulos como el sangrado,

tratamiento con fenilhidrazina (FHZ) o tiamfenicol (TAP), pueden transformar el bazo en el microambiente más apto para la proliferación eritroide. Sin embargo, este drástico aumento de la respuesta esplénica es transitorio. Después de valores máximos de enriquecimiento hemopoyético alrededor de los 6 u 8 días post-estímulo, comienza a descender su contribución en la producción total (10). Esto puede explicarse mejor por una sensibilidad diferencial a la hormona de las poblaciones celulares a lo largo de la readaptación que por la variación de los títulos hormonales.

El objeto de nuestro estudio fue medir la variación de la sensibilidad de células esplénicas murinas sometidas a hipoxia prolongada con distintas concentraciones de eritropoyetina humana recombinante (rh Epo) por la incorporación de timidina tritiada (^3H DTR) al ADN, asumiendo que la respuesta proliferativa "in vitro" es dependiente del status fisiológico del animal donante.

Materiales y métodos

Ratones de la cepa CF-1 (6 ejemplares/lote) fueron sometidos a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 18 días a hipoxia hipobárica (HH) a 0.4 atm 22 hs./día. Los animales se sangraron por punción intracardiaca con jeringas hepari-

nizadas. Los hematocritos y los contejos de reticulocitos fueron determinados por procedimientos estándares.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Células esplénicas de lotes hipóxicos y controles fueron pooleadas y cultivadas a una concentración final de $4,5 \times 10^5$ células/microplaca con alfa medio libre de ribósidos y desoxiribósidos (Sigma Co) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Gibco Co), glutamina, transferrina-Fe, antibióticos y 2-mercaptoetanol (Sigma Co).

Los cultivos se incubaron 22 hs en atmósfera estéril humidificada con 5% de CO_2 . Cada serie se ensayó con diferentes dosis (3,9 a 250 mU/ml) de eritropoyetina humana recombinante (rh-Epo) (HEMAX, BIOSIDUS).

A cada microplaca se añadió 10 μl de medio con 0,5 μCi de timidina triatada (^3H -dTR) (NEN Dupont USA) y las mismas fueron procesadas 2 horas después según método standard (3). Se realizaron tres cultivos por cuadruplicado a cada tiempo de HH.

Los resultados se expresan como index de estimulación (IE):

$$\text{IE} = \frac{\text{cpm con rh Epo}}{\text{cpm sin rhEpo}}$$

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedio \pm SD (desviación standard) utilizándose el Student "t" test para su análisis.

* Profesora Titular. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. U.N.N.E. Miembro de la Carrera del CONICET.

** Profesor Adjunto. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina. U.N.N.E.

*** Miembro de la Carrera de Apoyo a la investigación del CONICET.

Resultados

Efectos de la hipoxia sobre parámetros hematológicos

Los hematocritos normales de los animales de experimentación son 42.25 ± 0.87 . Los mismos se incrementan hasta un máximo de 65.75 ± 0.5 % alrededor de los 18 días de hipoxia continua, a partir de allí el estímulo sostenido no modifica los valores. El porcentaje de reticulocitos aumenta de 1.25 ± 0.18 % en controles hasta un máximo de 7.66 ± 0.43 % al sexto día de hipoxia hipobárica, decreciendo luego hasta 2.92 ± 0.54 % al final de la experiencia. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Efectos de las distintas concentraciones de Epo sobre las células esplénicas normales

El bazo normóxico contribuye con un 5% de la eritropoyesis, siendo la concentración fisiológica de Epo para la cepa utilizada por nosotros estimada en 30 mU/ml (2).

A fin de reconocer la sensibilidad que las células esplénicas normales presentan a la rh Epo, fueron cultivadas en distintas concentraciones de la hormona (de 0 a 250 mU/ml). No se observó un incremento significativo de la incorporación del isótopo a ninguna de las concentraciones ensaya-

das. Estos valores, considerados control, se grafican en todos los cuadros de la figura 1.

Efecto de las distintas concentraciones de rh-Epo sobre las células esplénicas hipóxicas

Para evaluar si la sensibilidad celular a la rh Epo es modificada en el curso de la hipoxia, se realizaron cultivos de células esplénicas de lotes hipóxicos con diferentes concentraciones de la hormona.

A los 2 días de hipoxia la diferencia de sensibilidad es significativa observándose una respuesta en función de la dosis. El índice estimulador aumentó hasta 12 veces el blanco ($p < 0.001$). (Figura 1-A).

A los 4 días se conserva esta respuesta en función de la dosis y el índice asciende hasta 13 veces el blanco ($p < 0.001$). (Figura 1-B).

A los 6 días de hipoxia se registra la máxima respuesta alcanzándose hasta 25 veces los valores control ($p < 0.001$). (Figura 1-C).

Este incremento de la actividad eritroide del bazo murino es sin embargo transitorio, tal como se observa en la Figura 1-D. Al día 8 de hipoxia la respuesta aumentada alcanza casi 20 veces el blanco ($p < 0.001$).

A partir del día 10 la sensibilidad cae bruscamente y desciende la incorporación de ^3H dTR (Figura 1-E).

Asimismo se observa que a los días 12, 14 y 18 no hay respuesta proliferativa significativa (Figura 1-F).

Se compararon los IE de cada una de las concentraciones de la hormona entre 0, considerado como control, y los demás días de hipoxia.

En la Figura 2 puede verse la variación de la respuesta proliferativa esplénica, a dosis constante de rh Epo (62.5 mU/ml) en función de los días de hipoxia y en relación con el aumento del hematocrito.

Discusión

En 1970, Fried y col. señalaron la existencia de varios fenómenos que no

podían explicarse por el concepto, que la producción de Epo y la eritropoyesis controlaban el aporte del oxígeno a los tejidos en función de sus necesidades. La declinación de los títulos de Epo durante la hipoxia sostenida podría deberse a que los tejidos hemopoyéticos saturados con los primeros niveles altos de Epo sérica mantienen luego la eritropoyesis sin concentraciones menores de la hormona.

El incremento de la sensibilidad a la Epo en función de los días de hipoxia y la saturación de la curva dosis respuesta, con títulos próximos a los fisiológicos observados en nuestros resultados, son concordantes con estos datos. Las conclusiones respecto a que el incremento del hematocrito y la velocidad de la eritropoyesis contribuyen, pero no son los únicos factores que explican el descenso del título de Epo durante la hipoxia sostenida, siguen vigentes.

Por otro lado, el animal policitémico por hipoxia o hipertransfusión, cuando es sometido nuevamente a hipoxia, vuelve a elevar sus títulos de Epo sérica, lo que muestra que si bien la hipoxia es el estímulo más eficaz para la secreción hormonal, el sistema es incapaz de reconocer el estado policitémico (2).

Tan compleja y con múltiples regulaciones como la producción de Epo es la reorganización que muestra el tejido hemopoyético en respuesta a la hipoxia.

En forma similar a lo que ocurre durante la ontogenia de la hemopoyesis, donde varían los órganos respecto a su capacidad de proliferación eritroide (el hígado fetal cede el comando a la médula ósea neonatal) (12) durante el stress hemopoyético, por estímulos tan diferentes como sangrado, FHZ, TAP o hipoxia prolongada el bazo se transforma transitoriamente en el microambiente más apto para la proliferación y diferenciación eritroide.

Este comando eritroide esplénico está incluso descripto en leucemias experimentales como la de Rauscher (4) o en ratones β talasémicos (5).

Tabla 1

Efecto de la hipoxia sobre parámetros Hematimétricos

HIPOXIA (Días)	HEMATOCRITO (% \pm SD)	RETICULOCITOS (% \pm SD)
0	42.25 ± 0.87	1.25 ± 0.18
2	44.25 ± 0.96	2.80 ± 0.46
4	58.60 ± 1.29	3.58 ± 0.64
6	54.00 ± 2.62	7.66 ± 0.43
8	58.63 ± 2.13	3.91 ± 0.52
10	61.00 ± 1.29	3.06 ± 0.66
12	63.00 ± 1.70	3.66 ± 0.32
14	64.75 ± 0.96	2.08 ± 0.72
18	65.75 ± 0.50	2.92 ± 0.54

Normalmente la médula ósea tiene el 95% de la actividad eritroide y esto es suficiente para mantener una producción normal de glóbulos rojos. Sometido el animal a hipoxia, hay una migración de progenitores desde la médula ósea a sangre circulante (9) y una subsecuente colonización esplénica.

Este fenómeno se visualiza a través de un cambio significativo de la masa esplénica, de su composición celular (6) y en nuestra experiencia, por la variación de la dosis respuesta a la rh Epo en función de los días de hipoxia.

En el bazo normóxico, no se detecta una dosis respuesta a la Epo. La capacidad del bazo hipóxico para responder a la rh Epo es explicable por una reorganización de las poblaciones "in situ", donde juega un papel fundamental la colonización por los progenitores eritroides medulares y (si se verifica) la producción esplénica de Epo (10).

A los 2 días de hipoxia se observa una respuesta significativa para las distintas concentraciones de rh Epo, presentando un plateau con valores próximos a los fisiológicos (Figura 1-A).

Entre los 4 y 6 días la respuesta se incrementa, llegando a un máximo de 25 veces el control. La curva muestra siempre el mismo perfil de respuesta a concentraciones fisiológicas o levemente superiores (Figura 1-B y 1-C).

Este fenómeno de saturación a concentraciones fisiológicas de rh Epo coincide con los resultados obtenidos por Dunn (7), quien observó que ratones sometidos a 4 días de hipoxia no aumentaban su respuesta ante la administración de Epo exógena. Este autor postuló que además del aumento de las células respondedoras a Epo (ERC) existiría un incremento de la sensibilidad de las mismas, por lo que la producción endógena de la hormona era suficiente para obtener una máxima respuesta del sistema eritropoyético.

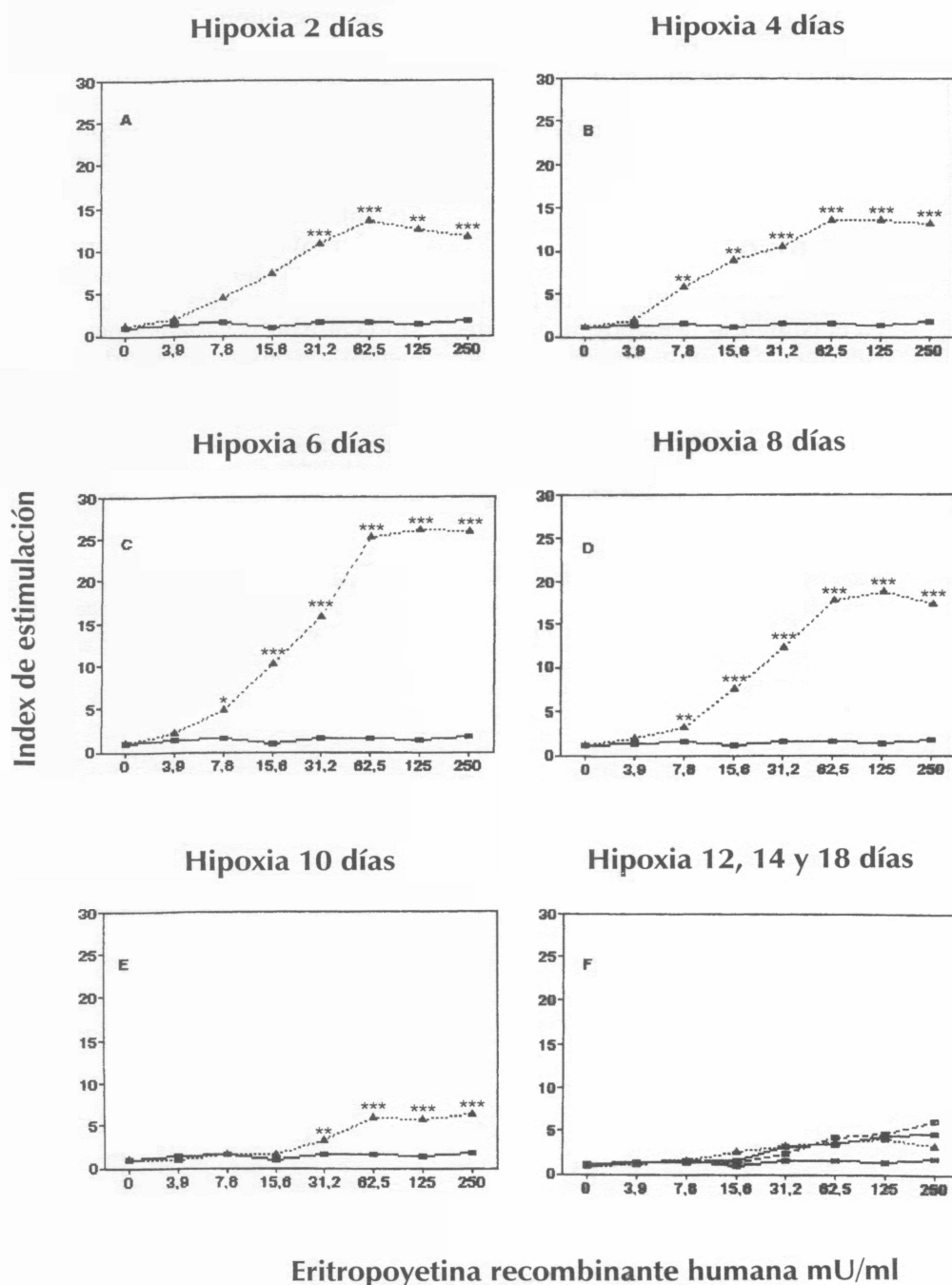
Al octavo día de hipoxia la respuesta comienza a decrecer y a partir del

Figura 1

Index estimuladorio de células esplénicas murinas cultivadas con rh Epo (0-250 mU/ml) (●) a 2 (A), 4 (B), 6 (C), 8 (D) y 10 (E) días de hipoxia hipobárica. Los index correspondientes a 12, 14 y 18 días se ilustran en (F). En todos ellos se representan los index estimuladorios de cultivos esplénicos normóxicos (○).

Los valores representan la media \pm SD, con la siguiente significación estadística:

*** ($p < 0.001$), ** ($p < 0.01$) y * ($p < 0.05$).



día 10 solo se evidencia proliferación con las mayores concentraciones, como si las células esplénicas hubieran perdido sensibilidad a la hormona. Lo mismo se observa a los días 12, 14 y 18, a medida que comienza a establecerse un nuevo estado estacionario.

De estos estudios se concluye que pasado el stress y estabilizándose el sistema hemopoyético en un nuevo estado de equilibrio, la participación del bazo en la eritropoyesis vuelve a ser mínima y el comando de la producción eritroide es retomado por la médula ósea.

Resumen

La hipoxia es un estímulo que perturba el equilibrio hemopoyético, particularmente el compartimiento eritroide. Ante esta situación el sistema se acomoda para asimilar las variaciones del medio estableciendo un nuevo estado de equilibrio. Este trabajo se diseñó para analizar la variación de sensi-

bilidad de las células esplénicas a distintas concentraciones de eritropoyetina humana recombinante (rh Epo), sometiendo al animal donante a diferentes tiempos de hipoxia y midiendo la respuesta proliferativa por la incorporación de timidina triatada (^3H -dTR).

Los progenitores esplénicos muestran índices de estimulación crecientes en función de la hipoxia con un máximo entre los 6 y 8 días. A partir de allí descende la capacidad proliferativa eritroide del bazo. La actividad máxima se verifica con 32.5 y 62.5 rh-Epo mU/ml.

La hipoxia cambia el comportamiento eritroide esplénico con una actividad máxima entre los 6 y 8 días, expresado entre otras variables por un aumento de la proliferación de los progenitores eritroides hasta 25 veces los valores control.

Estos resultados sugieren que bajo stress hemopoyético (hipoxia) las células esplénicas exhiben un incremen-

to de sensibilidad a la rh Epo en forma transitoria.

Bibliografía

1. BOZZINI C.E., BARRIO RENDO M.E., DEVOTO F.C., EPPER C.E. Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse. *Am. J. Physiol* 219;724-728, 1970.
2. BOZZINI C.E., ALIPPI R.M., BARCELO A.C., CONTI M.E., BOZZINI C., OLIVERA M.I. In: Rich I.N. Lapin T.R.J. (eds). Molecular, celular and developmental biology of erythropoietin and erythropoiesis. *Annals of the New York Acad.Sci.U.S.A.* 718;83-92, 1994.
3. BRANDAN N.C., COTES P.M., ESPADA J. In vitro assay of erythropoietin in fetal liver culture I. Comparison of radioactive tracers and evidence of assay especificity. *Br.J. Haematol* 47; 461-468, 1981.
4. BUTENKO Z.A., NAUMENKO O.I. Submicroscopic features of cells in the microenvironment of hematopoietic development of virus induced Rauscher leukemia. *Gematol. Transfuziol* 38; 29-33, 1993.
5. VAN den BOS C., KIEBOON D., VISSER T.P., WAGEMAKER G. Compensatory splenic hemopoiesis in beta-thalassemic mice. *Exp. Hematol* 21; 350-353, 1993.
6. CULLEN W., Mc DONALD T. Effects of isobaric hypoxia on murine medullary and splenic megakaryocytopoiesis. *Exp. Hematol.* 17; 246-251, 1989.
7. DUNN C.D.R., SMITH L.N., LEONARD J.L., ANDREWS R.B., LANGE R.D. Animal & computer investigations into the murine erythroid response to chronic hypoxia. *Exp. Hematol* 8 Suppl; 259-282, 1980.
8. FRIED W., JOHNSON C., HELLER P. Observations on regulation of erythropoiesis during prolonged periods of hypoxia. *Blood* 3; 607-616, 1970.
9. NIJHOF W., GORISH H., DONTJE B., DRESZ J., LOEFFLER M. Optimal erythroid cell production during erythropoietin treatment of mice occurs by exploiting the splenic microenvironment. *Exp Hematol*, 21; 496-501, 1993.
10. RATCLIFFE P.J. Molecular biology of the erythropoietin. *Nefrology Forum. Kidney international*, 44; 887-904, 1993.
11. UDUPA K.B., LIPSCHITZ D.A. Studies on the kinetics of the erythroid colony forming cells. *Exp Hematol* 14; 343-350, 1986.
12. ZANJANI E.D., ASCENSAO F.L., TAVASSOLI M. Liver derived fetal hematopoietic stem cells selectively and preferentially home to the fetal bone marrow. *Blood* 81, 2; 399-404, 1993.

Figura 2

Index estimuladorio de células esplénicas murinas cultivadas con 62.5 mU/ml de rh Epo, sometidas a hipoxia hipobárica (0-18 días) (—▲—) en relación con el aumento del hematocrito (—□—). Estos últimos se representan como promedio \pm SD con $p < 0.001$.

