

Tesis de Posgrado

Regulación de la eritropoyesis en roedores con policitemia inducida por hipertransfusión o por exposición crónica a hipobaría

Bozzini, Carlos E.J.

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bozzini, Carlos E.J.. (1991). Regulación de la eritropoyesis en roedores con policitemia inducida por hipertransfusión o por exposición crónica a hipobaría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2432_Bozzini.pdf

Cita tipo Chicago:

Bozzini, Carlos E.J.. "Regulación de la eritropoyesis en roedores con policitemia inducida por hipertransfusión o por exposición crónica a hipobaría". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2432_Bozzini.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Registro N° 2432.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*REGULACION DE LA ERITROPOYESIS EN ROEDORES CON
POLICITEMIA INDUCIDA POR HIPERTRANSFUSION O POR
EXPOSICION CRONICA A HIPOBARIA*

Autor: *Carlos E. J. Bozzini*

Director *Dr. Jorge Affanni*

Lugar de trabajo Cátedra de Fisiología,
Facultad de Odontología,
Universidad de Buenos Aires

*Tesis.
2432
ej. 2*

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1991

CAPITULO I : CONCEPTOS ACTUALES SOBRE EL MECANISMO DE REGULACION DE LA ERITROPOYESIS

Los reticulocitos sanguíneos y los eritrocitos maduros forman un órgano, llamado "eritrón circulante" o "masa roja circulante" (MRC), que contribuye en gran medida al transporte de oxígeno y de dióxido de carbono dentro del compartimiento sanguíneo. El primero es un eritrocito joven que todavía contiene una pequeña cantidad de mRNA durante un lapso aproximado de 24 horas. Es, por lo tanto, una célula capaz de sintetizar hemoglobina (1).

Las células constituyentes de la MRC poseen dos importantes características: 1) vida media limitada (120 días en el humano, 60 días en la rata), y 2) incapacidad de auto-renovación. Auto-renovación es la capacidad de ejecutar una intensa actividad proliferativa mediante mitosis sin que se observen cambios aparentes en las propiedades de las células, permitiendo así el mantenimiento del tamaño de las poblaciones celulares frente a las fuerzas de diferenciación y senescencia que tienden a disminuirlo.

Por lo tanto, alrededor del 1% (o 20 ml) de la MRC desaparece cada día de la sangre humana por senescencia. Para que se mantenga una masa eritrocitaria estable en la circulación, las células que se pierden deben ser reemplazadas a una velocidad semejante a la de su desaparición, acción que ocurre a través de un proceso continuo llamado "eritropoyesis". Esta constituye, por lo tanto, el proceso vital durante el cual se forman eritrocitos funcionales (eritropoyesis efectiva) o no funcionales (eritropoyesis inefectiva) y en la que ocurren mecanismos de diferenciación (modificación de la expresión genética), de maduración (cambios cuantitativos iniciados en un proceso de diferenciación y que determinan una estructura poblacional en edades), de proliferación y de amplificación (que implican aumento del tamaño de la población durante la maduración).

Durante la vida postnatal, la eritropoyesis ocurre en la cavidad medular del esqueleto. En el ratón, la cavidad medular es insuficiente para alojar al eritrón fijo, por lo que éste se ubica también en el bazo (2). Las células eritropoyéticas o precursoras forman allí una población transitoria, unidireccional y suicida, con una estructura en edades, en la que ocurren fenómenos simultáneos de maduración y amplificación. Cada célula precursora inicial (proeritroblasto o pronormoblasto) realiza cuatro mitosis durante su proceso madurativo, durante el cual ocurre un incremento progresivo del contenido celular de hemoglobina. Estas etapas de amplificación y maduración dan lugar a la estructura en edades, representada por los diversos eritroblastos con sus características tintoriales. A partir de cada proeritroblasto se producen 16 células: el proeritroblasto y su progenie forman una "unidad eritropoyética". La progenie pierde entonces el núcleo y se transforma en 16 reticulocitos, que ingresan como tales al torrente circulatorio. Lo expuesto hasta aquí en lo relacionado con la participación de la MRC en el aporte de oxígeno a los tejidos y el concepto de unidad

eritropoyética son mostrados en forma esquemática en las figuras 1 y 2.

El mecanismo de amplificación y de maduración característico de la eritropoyesis está sujeto a modificaciones:

a) bajo el stress de la hipoxia o la anemia, se forma un número mayor de unidades eritropoyéticas. El tiempo de maduración eritroblástica se acorta ligeramente y se observa una liberación más temprana de eritrocitos hacia la sangre. Como consecuencia, la producción medular de eritrocitos aumenta (3). La primera de estas respuestas es, con mucho, la más importante y, como se verá más adelante, sujeta a regulación humoral:

b) por el contrario, la hiperoxia o la policitemia post-transfusional o post-hipóxica deprimen la eritropoyesis mediante un mecanismo que involucra la disminución del número de unidades eritropoyéticas generadas. La producción medular de eritrocitos, por lo tanto, disminuye (4).

Las células eritropoyéticas o precursoras (que forman las unidades eritropoyéticas) normalmente no circulan, constituyendo así el "eritrón fijo". Estas células no son auto-renovables, por lo que desaparecen continuamente al ser transformadas por el proceso madurativo en eritrocitos. Otro tipo celular, la "célula progenitora eritrocítica" (ERC = erythropoietin-responsive cell) ingresa al eritrón fijo como proeritroblasto mediante un evento de diferenciación que se encuentra bajo control hormonal por la "eritropoyetina" (EPO). La ERC, a su vez, tampoco es auto-renovable, por lo que su generación ocurre mediante diferenciación y maduración de células basales (stem cells) que poseen enorme capacidad de auto-renovación, que duran durante toda la vida del animal y son capaces de producir, a través de una primera etapa de diferenciación posiblemente controlada por factores de crecimiento derivados de linfocitos y macrófagos, varias líneas de células progenitoras. Una célula progenitora es un miembro de una población en tránsito, capaz de proliferación pero no de auto-renovación, que presenta una estructura en edades debido a un proceso de maduración. Las células progenitoras poseen una capacidad restringida de diferenciación, que puede traducirse en el desarrollo de una o a lo sumo dos líneas de diferenciación.

La ERC es, por lo expuesto, una célula que se diferencia a proeritroblasto bajo la influencia de EPO, la que actuaría de-reprimiendo parte del genomio, originando así la última etapa de diferenciación que une a una célula basal hematopoyética con el proeritroblasto. Esta célula es, por lo tanto, una célula EPO-sensible por poseer receptores para la misma (5). La acción principal de la hormona es, en consecuencia, controlar el número de unidades eritropoyéticas que desarrollan en el eritrón fijo mediante control de la diferenciación de la población de ERC.

En condiciones fisiológicas, la ERC es mantenida

dentro de un tamaño óptimo para el transporte de oxígeno mediante ajustes apropiados en la magnitud de la eritropoyesis. Los primeros estudios sobre la forma en que estos ajustes son realizados fueron efectuados bajo condiciones de baja presión atmosférica (hipobaría, hipoxia hipobárica o hipóxica). Ellos permitieron alcanzar la conclusión de que una disminución de la pO_2 arterial estimula la eritropoyesis (6). Sin embargo, la eritropoyesis es también estimulada por anemia, a pesar de la normalidad de la apO_2 (7). Estas observaciones pueden ser reconciliadas por la hipótesis que supone que la pO_2 tisular, determinada por el balance entre la oferta de oxígeno por la sangre y su demanda por los tejidos, es la que regula la producción de eritrocitos, más que la apO_2 per se (8).

La conexión entre la pO_2 tisular y la eritropoyesis está representada por EPO. La hormona, por un lado, y el oxígeno unido a la hemoglobina, por el otro, actúan como mediadores en un circuito de retroalimentación que mantiene el volumen de la MRC en su nivel óptimo. Este mecanismo, en breve, determina que el riñón, mediante un sensor de oxígeno, modula la secreción de EPO que, a su vez, ajusta la tasa eritropoyética y así el número de células transportadoras de oxígeno en la circulación (Figura 3). Aunque este simple circuito de retroalimentación puede ser complicado, su estructura básica ha permanecido inalterable con el tiempo.

El rol de la MRC en el transporte de oxígeno desde los pulmones hacia los tejidos es evidente. Sin embargo, otros componentes fisiológicos deben también operar en forma altamente integrada para asegurar la provisión de un aporte de oxígeno a los tejidos adecuado. La pO_2 tisular es el producto entre el volumen minuto circulatorio, la concentración de hemoglobina y la saturación de oxígeno de la hemoglobina (Sat O_2). Además, la distribución del flujo sanguíneo a tejidos individuales y desplazamientos de la curva de disociación de la hemoglobina pueden operar para ajustar el aporte de oxígeno, especialmente cuando aumenta la demanda tisular del gas. Cada uno de los principales componentes puede ser modificado por las necesidades de oxígeno. Un incremento general del metabolismo tisular estimula al volumen minuto circulatorio, la ventilación pulmonar y, por su influencia sobre el pH, deslaza la curva de disociación para liberar más oxígeno a los tejidos. La reducción sostenida de la pO_2 tisular no sólo estimula la eritropoyesis mediante EPO, sino que aumenta la ventilación alveolar minuto y la producción intraeritrocítica de 2,3-DPG, que disminuye la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno.

En años recientes, la clonación del gene que codifica para EPO en el hombre y el ratón y la subsiguiente producción de EPO mediante la metodología del DNA recombinante (rHu-EPO) ha posibilitado a los fisiólogos el desarrollo de nuevas técnicas experimentales y a los clínicos la utilización de un agente terapéutico muy eficaz (9).

BIOLOGIA DE LA ERITROPOYETINA

Varias observaciones efectuadas a comienzo del Siglo XX llevaron a la hipótesis de que un servomecanismo humoral estaba involucrado en el control de la eritropoyesis. Pero recién a mediados del Siglo, varios investigadores demostraron directamente la existencia de tal "factor eritropoyético" (6, 7, 10, 11). Específicamente, se demostró que la exposición a condiciones de hipoxia hipóxica de un miembro de ratas parabióticas resultaba en incremento de la eritropoyesis en el otro miembro normal y que la inyección de grandes volúmenes de plasma obtenido de animales anémicos a animales normales era capaz de incrementar la concentración de reticulocitos en sangre o la incorporación de Fe⁵⁹ al eritrón. El factor humoral fue denominado "eritropoyetina", el que no parecía afectar la producción de leucocitos y de plaquetas. Durante los 30 años siguientes, la bioquímica y la fisiología de EPO han sido estudiadas intensamente (12, 13). Está ahora bien establecido que EPO es una glucoproteína producida principalmente por el riñón, que constituye el factor principal que inicia y regula la producción de eritrocitos en los vertebrados. Además, el gene para EPO ha sido clonado (9, 14, 15), siendo la hormona recombinante disponible ahora en cantidad suficiente para la investigación clínica y de laboratorio. Esto ha permitido un mejor conocimiento de varios aspectos de la biología de la EPO y su uso como agente terapéutico en humanos.

A) PURIFICACION Y QUIMICA DE LA ERITROPOYETINA

La purificación de EPO demostró ser extremadamente difícil dado que cantidades muy pequeñas (picogramos) están presentes en suero u orina. El trabajo inicial fue realizado utilizando plasma de ovejas anémicas y luego de una larga secuencia de procedimientos se logró una preparación con una potencia de 8250 U/mg de proteína (16). Sin embargo, el recobramiento fue sólo del 0,4 %. La orina de pacientes anémicos demostró ser una fuente de hormona con menor cantidad de proteína contaminante (17). La metodología desarrollada para purificar la EPO de plasma ovino fue aplicada a las preparaciones urinarias humanas, lográndose un material con una potencia de 70400 U/mg de proteína (9). Este material contenía 30 % de glúcidos, consistente en 11 % de ácido siálico, 11 % de hexosas totales y 8 % de N-acetilglucosamina; mostró una banda única en SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida y un peso molecular estimado de 34.000 daltons (18, 19). Se hizo pronto evidente que los residuos de ácido siálico eran necesarios para la actividad biológica in vivo pero no para la actividad completa in vitro (20). La forma asialada de la hormona, como ocurre con muchas otras glucoproteínas, era rápidamente removida por el hígado debido a la interacción de los residuos de galactosa ahora expuestos y el hepatocito. La oxidación de estos residuos, o la administración simultánea de asialo- α -D-galactosidasa, era capaz de reconstituir la actividad in vivo de la EPO asialada (21).

La principal dificultad para preparar grandes cantidades de hormona pura pudo ser superada cuando fue posible la clonación del gene para EPO y su expresión en células de ovario de hamster (células CHO) (9, 14, 15) o en células de riñón de hamster (células BHK) (22). El gene, que aparece como copia única, está formado por cuatro intrones y cinco exones. Su producto incluye una secuencia leader hidrofóbica de 27 aminoácidos que es separada durante la secreción hormonal y que está unida al extremo N-terminal de la hormona activa. Esta última se pensó inicialmente que estaba formada por 166 aminoácidos con un peso molecular excluyendo los glúcidos de 18.398 daltons (23). Sin embargo, la evidencia reciente indica que tanto la proteína recombinante como la hormona natural han perdido la arginina carboxi-terminal (Arg 166) preestablecida a partir de la estructura del gene (24). Esta EPO truncada, que se piensa es el resultado de un proceso post-translacional debido a una carboxipeptidasa intracelular, posee una actividad específica de 200.000 U/mg de proteína y muy posiblemente represente la forma fisiológicamente activa de la hormona. Como la natural, la recombinante está muy glicosilada. El peso molecular de la hormona glicosilada es de 29.900 daltons (9) con una actividad específica de 120.000 U/mg de hormona, siendo la estructura glucídica indistinguible de la EPO urinaria salvo por una pequeña diferencia en la sialidación (9, 25). Por el otro lado, la hormona recombinante obtenida en *Escherichia coli* no contiene glúcidos. Esta EPO derivada de bacterias, al igual que la EPO natural que ha sido deglicosilada enzimáticamente, ha perdido gran parte de su actividad in vivo, aunque su actividad in vitro está conservada. El mecanismo de este fenómeno es incierto pero probablemente diferente de la captación hepática ya señalada.

B) ENSAYO DE ERITROPOYETINA

Varios métodos han sido utilizados para determinar la actividad biológica de EPO. En condiciones adecuadas, la mayoría de ellos son capaces de detectar la presencia de la hormona en forma cuantitativa, lo que ha posibilitado el control de los procesos de purificación de la hormona. En general, los métodos o ensayos pueden ser clasificados en dos amplios grupos metodológicos, a saber bioensayos e inmunoensayos. El primero puede ser dividido en ensayos in vivo e in vitro. El ensayo in vivo utiliza animales (generalmente ratones) en los cuales la secreción de EPO es disminuida mediante policitemia inducida por transfusión o por exposición previa a hipobaria. EPO o la sustancia cuya actividad eritropoyética desea determinarse, es entonces inyectada, cuantificándose el porcentaje de una dosis trazadora de Fe⁵⁹ incorporado al eritron en respuesta a la misma (26). Los ensayos in vitro se basan usualmente en la cuantificación de un efecto eritropoyético en células hemopoyéticas en cultivo. Para cultivos compuestos por una mezcla de progenies, el efecto medido debe ser específico para las células eritroides, como son la incorporación de Fe⁵⁹ al hem (27, 28) o la enumeración de colonias eritroides (29). Además, puede utilizarse un efecto menos específico, como el incremento de la síntesis de DNA, en una población formada por un

alto porcentaje de células eritroides (30). Los inmunoensayos pueden ser también divididos en dos grupos, aquellos realizados con una cantidad limitada de anticuerpo (radioinmunoensayo o RIE) y aquellos realizados con exceso de anticuerpo (ELISA). Un RIE requiere de un antígeno trazador altamente purificado que no es alterado inmunológicamente por el proceso de marcación, mientras que ELISA requiere relativamente grandes cantidades de anticuerpo muy específico.

Todos estos métodos presentan ventajas y desventajas. El ensayo en ratón policitémico detecta sólo hormona biológicamente activa, mostrando una respuesta en un rango de hasta 40 veces (26). Sin embargo, no es lo suficientemente sensible como para medir la concentración de la hormona en suero de individuos normales. Además, el ensayo es dificultoso, caro y sujeto a resultados positivos falsos originados en otros agentes estimulantes de la eritropoyesis, como son andrógenos, cobalto, prostaglandinas y agentes que causan hemólisis. Sin embargo, utilizando controles apropiados, es confiable y reproducible, convirtiéndose en el patrón de referencia para otros ensayos nuevos y para procesos industriales de preparación de EPO recombinante. Los bioensayos in vitro son generalmente más sensibles, más rápidos y más fáciles de realizar que el precedente. Sin embargo, detectan asialo-EPO, que es inactiva in vivo, siendo particularmente sensibles a efectos de matriz debido a la presencia en las muestras a ser ensayadas de sustancias ajenas a EPO, como timidina no radioactiva, endotoxinas y ciertas proteasas (31).

Los inmunoensayos presentan varias características atractivas. Son lo suficientemente sensibles como para medir los niveles de EPO en sueros normales, siendo relativamente sencillos como para realizar determinaciones en un gran número de muestras al mismo tiempo. Usando este tipo de ensayo, varios grupos de investigadores han encontrado que el nivel de EPO en el suero normal se encuentra entre 10 y 30 mU/ml (32, 33, 34). Además, se ha demostrado que la hormona recombinante es virtualmente idéntica a la EPO urinaria humana cuando es usada como trazador en el RIE (35, 36). La mayor desventaja de los inmunoensayos está relacionada con la capacidad de determinar la concentración de proteínas sin considerar sus actividades biológicas. La EPO desialidada o fragmentos de la hormona inactivos o con menor actividad in vivo pueden ser así detectados y confundidos con hormona biológicamente activa. Por ejemplo, en los pacientes de insuficiencia renal, los niveles séricos de EPO inmunológicamente detectable (iEPO) son a menudo mayores que los de la hormona bioactiva (32, 37). Por lo tanto, la capacidad de un RIE para aportar información consistente y clínicamente relevante debería ser evaluada cuidadosamente en cada caso. En el futuro, podría ser posible definir anticuerpos que fueran relativamente específicos para EPO biológicamente activa (38), lo que incrementaría el valor clínico de los resultados del ensayo.

La unidad standard de medida para EPO se basó

originalmente en el efecto eritropoyético del cobalto (39). La inyección de cobalto a ratas avinadas induce un incremento dosis-dependiente de la eritropoyesis idéntico al producido por la EPO cruda. Con el objeto de obtener un standard consistente y fácilmente obtenible, se definió la unidad de EPO (Unidad Cobalto) como la que induce una respuesta igual a la que se observa en la rata avinada cuando recibe 5 micromoles de cobalto. Cuando se dispuso de EPO ovina, un lote de ella fue considerado como Standard A. Una unidad del mismo producía una respuesta equivalente a una Unidad Cobalto. Cuando este material fue consumido, fue reemplazado por una preparación cruda liofilizada de EPO urinaria, que poseía una actividad específica de 1 U/1,48 mg de proteína y que fue designada como Primera Preparación Internacional de Referencia (40). En 1971, una segunda preparación urinaria cruda de EPO fue cuidadosamente evaluada y se transformó en la Segunda Preparación Internacional de Referencia. La Unidad Internacional (UI) para EPO es actualmente 0,20 mg de esta Segunda Preparación, que produce una respuesta groseramente equivalente a 1 UCo o 1 U Std A (41). Como la secuencia aminoacídica y la estructura glucídica de la EPO recombinante es idéntica o casi idéntica a la de la EPO natural y como ésta está disponible en forma pura en cantidad considerable, es lógico pensar que esta forma recombinante se convierta en el Standard Internacional de Referencia en el futuro inmediato. En realidad, estudios recientes efectuados en 26 laboratorios (incluido el lugar de realización de esta Tesis) correspondientes a 11 países han determinado la actividad específica de varios posibles candidatos, acordándose designar como preparación internacional a la muestra denominada K en ese estudio colaborativo dirigido por la OMS a través del Laboratory of Biological Standards and Control (Inglaterra). El informe de tal estudio aparecerá publicado en el futuro inmediato.

C) PRODUCCION DE ERITROPOYETINA

En 1957, se observó que ratas con nefrectomía bilateral eran incapaces de responder a flebotomía o a administración de cobalto con un aumento de producción de EPO (42). Ratas con sus uréteres ligados y que desarrollaban iguales niveles de uremia que las nefrectomizadas eran capaces de responder a esos estímulos en forma normal. Resultados similares se encontraron en ratones, conejos, monos y perros. En humanos, los niveles séricos de EPO se observan bajos en pacientes anémicos con uremia severa, incrementándose luego de un trasplante exitoso (43). Además, fue posible detectar actividad eritropoyética en el líquido de perfusión de riñones aislados de conejo (44) y en el medio de cultivo de células renales (45). Aunque la evidencia que apoyaba el origen renal de EPO era importante, la misma no podía ser extraída de riñones normales o de varias fracciones renales.

Para explicar esta dificultad, fueron propuestas dos hipótesis principales. La teoría "eritropoética" establecía que el riñón, en respuesta a hipoxia, producía una sustancia, llamada "eritropoetina", que enzimáticamente

convertía a una alfa-globulina circulante en EPO activa (46). mientras que la teoría "proeritropoyetina" suponía que los riñones producían una molécula inactiva que era transformada por un factor plasmático para producir EPO activa (47).

La evidencia actual, abrumadora, indica que ninguna de estas teorías es correcta y que EPO es sintetizada principalmente en el riñón y es secretada como hormona intacta. Primero, el análisis del gene para EPO muestra que codifica sólo para una secuencia leader de 27 aminoácidos que pareciera ser importante para el proceso de secreción hormonal más una estructura hormonal activa de 166 aminoácidos (15). Segundo, esta estructura predecible a partir de la estructura del gene de 166 aminoácidos excepto para la arginina terminal (24) se relaciona exactamente con la secuencia de aminoácidos derivada del análisis de la hormona natural, lo que significa que ninguna prohormona es sintetizada. Tercero, aunque el mRNA no es fácilmente detectable ni en el riñón ni en ningún otro tejido en animales normales, es rápidamente inducido (dentro de 1 hora) en el riñón y en menor medida en el hígado luego de que los animales son hechos anémicos o hipóxicos (48, 49, 50). Cuarto, aún en animales extremadamente hipóxicos, ningún otro tejido, incluyendo pulmón, cerebro, músculo esquelético, bazo y glándulas salivales, se ha visto contiene EPO-mRNA (49). Considerado en conjunto, estos resultados aportan importantes evidencias de que en el animal adulto EPO es sintetizada principalmente en el riñón y secretada como hormona intacta.

Aunque el riñón constituye el sitio principal de formación de EPO, la producción de la hormona continúa después de la nefrectomía bilateral en muchas especies, aunque a un nivel considerablemente reducido. Ratones y ratas anéfricas retienen el 10 % de su capacidad original de incrementar la producción de EPO en presencia de hipoxia (51, 52). mientras que pacientes anéfricos que desarrollan intensa anemia poseen algo de EPO en sus plasmas (53, 54). Varias líneas de estudio señalan al hígado como el sitio primario de producción de EPO extrarenal. La hepatectomía suprime la producción de EPO inducida por hipoxia en ratas anéfricas (55) pero no en animales con riñones intactos; en ratas hepatectomizadas parcialmente, la EPO extrarenal en respuesta a hipoxia se correlaciona directamente con la regeneración hepática, siendo mayor durante el período de mayor proliferación (56); y EPO-mRNA puede ser hallado en el hígado, aunque en menor cantidad que en el riñón, en ratones anemizados por flebotomía (49).

Durante la vida fetal, la fuente primaria de EPO podría ser también hepática, por lo menos en algunas especies. Los fetos de oveja responden a anemia con un incremento de la EPO sérica que es suprimido por hepatectomía pero no por nefrectomía (57). Además, EPO-mRNA ha sido hallado en hígado fetal humano (58) y en muy pequeñas cantidades en hígado fetal murino durante la mitad del período gestante (59). Por el contrario, no se observó mRNA en hígado fetal murino durante la gestación

cardia cuando los fetos eran anemizados, mientras que I125-EPO, inyectada en hembras gestantes, fue transferida al feto en cantidades apreciables durante la porción media y final de la gestación (59). Además, la placenta de ratas y ratones es el único tejido no-hematopoyético que posee receptores específicos para EPO (60). Este último hallazgo sugiere que en el ratón la transferencia placentaria de EPO materna podría ser una fuente de hormona fetal. Aunque parece difícil explicar cómo la transferencia placentaria por sí misma podría proveer cantidades crecientes de EPO en respuesta al stress de la anemia fetal, es posible que en condiciones normales los requerimientos fetales de EPO puedan ser cubiertos por la transferencia placentaria de hormona materna.

Hasta épocas muy recientes, las células renales responsables de la producción de EPO no habían sido identificadas, aunque estudios indirectos señalaban al tubo proximal como participando en el proceso (61, 62). Varios experimentos que incluían ensayo de EPO en varias fracciones tisulares, producción de EPO por líneas celulares derivadas de tejidos renales específicos o métodos de inmunofluorescencia dieron resultados inconsistentes (63, 64). El desarrollo de sondas específicas marcadas de RNA y DNA para EPO-mRNA brindó una metodología poderosa para la localización in situ de la producción de EPO. Al contrario de la hormona, que es secretada y por lo tanto podría estar en aproximación estrecha a muchos y diferentes tipos celulares, el EPO-mRNA debería estar sólo localizado en aquellas células productoras de EPO. Mediante esta metodología, se encontró EPO-mRNA en fracciones tisulares no glomerulares (50). Más tarde, dos grupos independientes (65, 66), mediante el uso de radioautografías, encontraron que una célula intersticial peritubular era la única célula renal que contenía cantidades significativas de EPO-mRNA, tanto en condiciones basales como luego de la estimulación de la síntesis de EPO por anemia o hipoxia. Además, la iniciación del mecanismo para la producción de EPO en condiciones de stress involucraba principalmente el reclutamiento de células adicionales que transcribían EPO-mRNA en vez de estar restringido al incremento de la producción de EPO-mRNA por las células identificadas inicialmente (67). El origen preciso de esta célula intersticial no ha sido fijado, aunque podría representar a una célula endotelial capilar (66). Se estimó que el 20-30 % de la población total de células intersticiales de la corteza renal interna y menos del 10 % de células intersticiales de la corteza subcapsular eran capaces de sintetizar EPO. Por lo tanto, la célula productora de EPO podría representar un tipo especializado de célula dentro del intersticio cortical más que un tipo celular generalizado, como es la célula endotelial de los capilares peritubulares. Además, el estímulo hipóxico pareciera no ser uniforme, alcanzándose el umbral para iniciar la síntesis de EPO en áreas focales (68, 69).

Mientras que la identidad precisa de las células productoras de EPO es desconocida, ellas se agrupan en focos intersticiales adyacentes a los tubos proximales (70), lo que está de acuerdo con trabajos de Giglio y col

(61) y de Eckardt y col (71). Trabajos previos que señalan a los macrófagos como productores de EPO (72) no pudieron ser confirmados (73), mientras que un trabajo reciente sobre producción de EPO por células tubulares renales realizado con sonda marcada con P32 dió resolución pobre en los autoradiogramas (74).

El sitio de producción de EPO en el hígado es todavía desconocido, aunque existen evidencias para las células de Kupfer y los hepatocitos (75).

Virtualmente, cualquier alteración que resulte en una disminución del aporte de oxígeno a los tejidos actúa como estímulo para la producción de EPO por el riñón; sin embargo, la señal precisa y la secuencia de eventos responsables de la iniciación y modulación de esta producción son desconocidos. Los niveles séricos de EPO parecieran no estar involucrados debido a que el pretratamiento de ratones con altas dosis de EPO no bloquea la producción renal de mRNA inducido por flebotomía. La ausencia de un depósito apreciable de EPO (76), el hecho que EPO no sea sintetizada como un precursor activable (23) y la relación proporcional observada entre los niveles séricos de EPO y la concentración de EPO-mRNA luego del stress hipóxico (77) indican que la secreción renal de EPO es regulada por el nivel de su síntesis.

El mecanismo exacto para la transición de la hipoxia en el reclutamiento de células sintetizadoras de EPO es todavía desconocido. La administración de AMPc a ratones incrementa la producción de EPO y la MRC (78); PGE1 incrementa AMPc y la concentración de EPO en riñones aislados de perro y perfundidos (79), mientras que PGE2 incrementa los niveles de EPO y la eritropoyesis en ratones; la constricción de la arteria renal incrementa PGE y los niveles de EPO en perros, mientras que la indometacina, que inhibe la formación de PGE, previene el incremento de EPO en respuesta a hipoxia (80).

Sobre la base de estos experimentos, muchos de los cuales fueron efectuados in vivo con múltiples variables, se ha propuesto que la hipoxia renal podría resultar en liberación de PGE, que a su vez podría incrementar el AMPc renal y, a su vez, la síntesis de EPO. AMPc podría actuar como reductor de la concentración intracelular de Ca^{++} debido a que el cobalto, que estimula la producción de EPO, es un inhibidor general de los canales de Ca^{++} ; la disminución del Ca^{++} del medio aumenta la producción de EPO en células de carcinoma renal in vitro; y el verapamil y el diltiazem, que bloquean la entrada de Ca^{++} , también aumentan la producción de EPO (81). Este mecanismo podría aplicarse a la misma célula que produce EPO o a células adyacentes que gatillan a la célula productora. En humanos, sin embargo, agentes que bloquean la síntesis de PGE y los canales de Ca^{++} no producen secreción aumentada de EPO.

D) SITIO Y MECANISMO DE ACCION DE ERITROPOYETINA

EPO actúa a nivel de los órganos eritropoyéticos para incrementar selectivamente a la eritropoyesis sin alterar en forma significativa la producción de leucocitos y plaquetas. Este efecto involucra la iniciación de la diferenciación de la progenie eritrocítica a partir de una célula primitiva, morfológicamente indefinida. Específicamente, la inyección de una dosis única de EPO a ratones hipertransfundidos cuyos órganos eritropoyéticos no contienen células de la progenie citada resulta en la aparición de proeritroblastos dentro de las 24 horas, mientras que a las 72 horas el proceso de maduración ha alcanzado la etapa de reticulocito (82). Cuando la estimulación con EPO es terminada mediante la administración de anticuerpos anti-EPO 6 horas después de la inyección hormonal, la onda de maduración eritropoyética continúa, lo que indica que EPO no es necesaria para la maduración de los eritroblastos.

En 1961 fue desarrollada una técnica para ensayo de CFU-S (célula formadora de colonia esplénica) (83) la que podría ser considerada como la célula basal hematopoyética (stem cell). EPO no actúa directamente sobre CFU-S, sino sobre descendientes de la misma, denominados ERC (EPO-responsive cells) (84).

La caracterización inicial de ERC fue dificultosa por la razón de ser este compartimento no identificable morfológicamente. Estudios posteriores fueron favorecidos por el desarrollo de métodos de cultivo en coágulo de plasma (85) o metilcelulosa (86), capaces de permitir el crecimiento de colonias eritropoyéticas discretas. Con esta metodología, fue posible describir dos principales subdivisiones de ERC en ratones y humanos: CFU-E (unidad formadora de colonia eritroide) y BFU-E (unidad formadora de burst eritroide). Pareciera existir una continuidad de células entre la BFU-E (célula cercana al stem cell multipotencial = CFU-S) y la CFU-E (célula cercana al proeritroblasto). Esta estructura en edades, característica de las poblaciones celulares en maduración, se caracteriza por un aumento progresivo de células en ciclo y de un incremento de la sensibilidad a EPO, de manera tal que la CFU-E depende de EPO para su crecimiento y diferenciación en proeritroblasto.

Esta visión de la ERC, si bien atractiva, es una simplificación. Existe evidencia de que el efecto completo de EPO involucra interacción de la hormona con otros factores de crecimiento así como con células de otro linaje (insulina y somatomedina C) (87).

Gran cantidad de trabajos experimentales (88) sugieren que la estimulación de la síntesis de RNA constituye el evento clave de la acción molecular de EPO, la que es seguida por síntesis de DNA, mitosis y maduración (producción de hemoglobina) en la célula sensible. Todos estos estudios fueron, sin embargo, realizados utilizando hormona y poblaciones celulares impuras, lo que abre un interrogante sobre si los cambios observados fueron inducidos por EPO. Los eventos

descriptos dependen de la interacción de EPO con receptores presentes en las células sensibles, habiéndose descrito dos poblaciones de los mismos, en dependencia con su afinidad por la hormona.

E) LA RELACION OFERTA/DEMANDA DE OXIGENO COMO BASE DE CONTROL DE LA SECRECION DE ERITROPOYETINA

El modelo descrito anteriormente sobre la importancia de la relación existente entre el aporte de oxígeno a los tejidos y sus necesidades del gas predice ciertas respuestas que han sido confirmadas por investigadores y clínicos:

1) Una oxigenación de los tejidos disminuida, con demanda de oxígeno normal, induce aumento de la secreción de EPO y mayor eritropoyesis. Esto se observa en condiciones de hipoxia: a) hipóxica (disminución de la pO_2 de la sangre arterial) por descenso de la pO_2 del aire inspirado (altura, hipopresión, mezclas gaseosas con poco oxígeno), por hipoventilación pulmonar (obstrucción de las vías aéreas, alteraciones pulmonares, insuficiente expansión pulmonar), por difusión lenta de oxígeno (alteración del endotelio capilar o alveolar) o por desajuste entre ventilación alveolar y flujo sanguíneo pulmonar); b) anémica (disminución de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre arterial) por hemoglobina ocupada (intoxicación con CO), hemoglobina alterada (metahemoglobina) o hemoglobina disminuida (anemia); y c) histotóxica (incapacidad de utilización de oxígeno por las células) por intoxicación con ácido cianhídrico y sus sales).

2) Una oxigenación aumentada con demanda normal de oxígeno determina disminución de la secreción de EPO y descenso de la eritropoyesis. Este hecho se comprueba en la policitemia por hipertransfusión (por administración de eritrocitos) o post-hipóxica (por exposición a pO_2 disminuida durante un tiempo y regreso a pO_2 normal) o en condiciones de hiperoxia (aumento de presión atmosférica en cámaras hiperbáricas, que determina aumento de la cantidad de oxígeno transportado mediante disolución en plasma).

3) Una oxigenación normal con disminución de la demanda tisular de oxígeno determinará menor secreción de EPO y descenso de la eritropoyesis. Situaciones de este tipo se observan después de la hipofisectomía y tiroidectomía y durante el ayuno y la privación de agua (89, 90, 91).

4) Una oxigenación normal con demanda tisular de oxígeno aumentada inducirá mayor secreción de EPO y aumento de la eritropoyesis. Esto se observa durante la administración de hormonas caloridénicas (92) y de anabólicos (93).

CAPITULO II : OBJETIVOS DE LA PRESENTE INVESTIGACION

El efecto de la policitemia experimental sobre el nivel de EPO circulante y la eritropoyesis es conocido desde los trabajos del grupo de Jacobson en Chicago (4).

Como consecuencia de los mismos, el ratón con policitemia inducida por hipertransfusión de eritrocitos homólogos o por exposición crónica continua o discontinua a hipobaría (en cámaras de altura simulada) se convirtió en el animal más aconsejable para ser utilizado en los ensayos de la actividad eritropoética presente en plasma de humanos o de animales de experimentación, primero, y de la actividad biológica de EPO recombinante humana, más recientemente (31).

Desde el momento en que ambos modelos de policitemia aparecieron en el escenario de la Hematología Experimental se supuso, sin la evidencia experimental que lo avalara, que los mismos eran absolutamente similares y que los resultados experimentales obtenidos en uno eran perfectamente comparables y aplicables al otro.

La existencia de innumerables resultados contradictorios entre diferentes laboratorios que estudiaron los efectos de hormonas en ratones policitémicos en dependencia con el tipo de modelo utilizado, por un lado, y el hallazgo en nuestro laboratorio (94) de diferencias entre ellos en lo relacionado con la producción de EPO en respuesta al estímulo hipóxico, nos llevó a emprender este proyecto de investigación, con el objeto de determinar las similitudes y probables diferencias que existen entre ratones con policitemia post-transfusional o post-hipóxica en cuanto al mecanismo de regulación de la eritropoyesis se refiere. El hallazgo de diferencias entre ambos tipos de animales policitémicos obligaría a un replanteo de la interpretación de gran cantidad de datos experimentales obtenidos durante los últimos 30 años y a precisar la utilización de los mismos como animales de bioensayo de EPO.

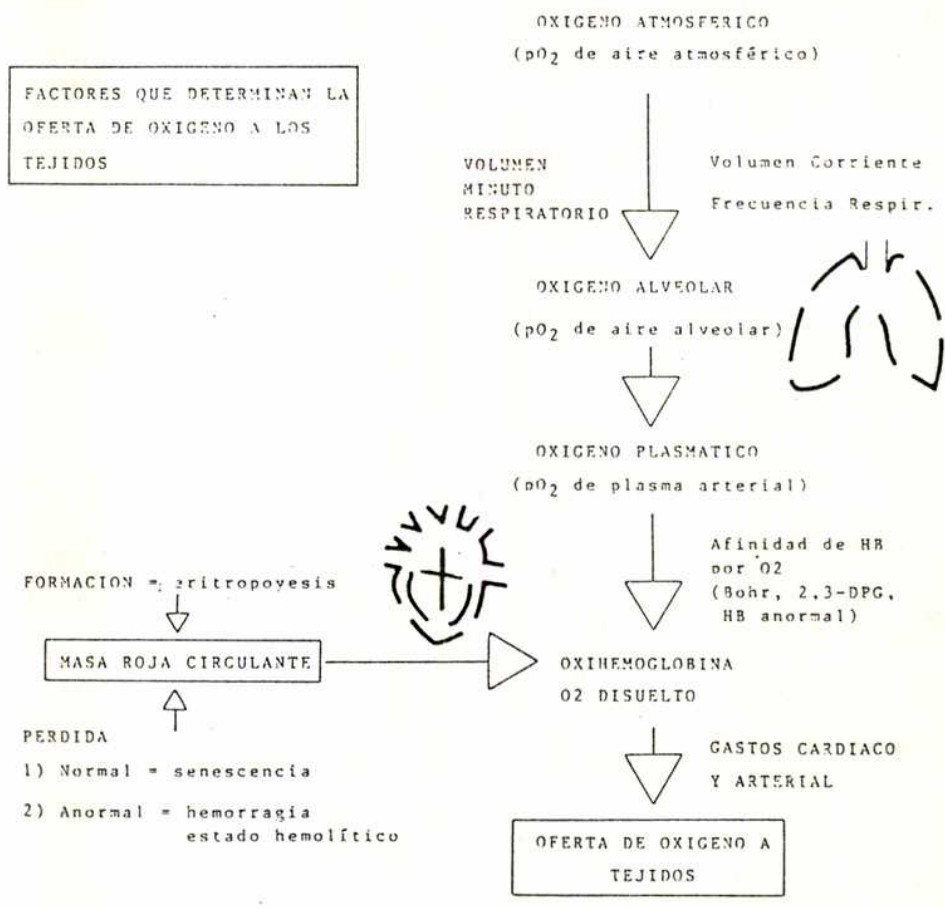


FIGURA 1 :Factores que determinan la oferta de oxígeno a los tejidos. La masa roja circulante, que en condiciones normales es función de la eritropoyesis, constituye uno de los factores involucrados en la función.

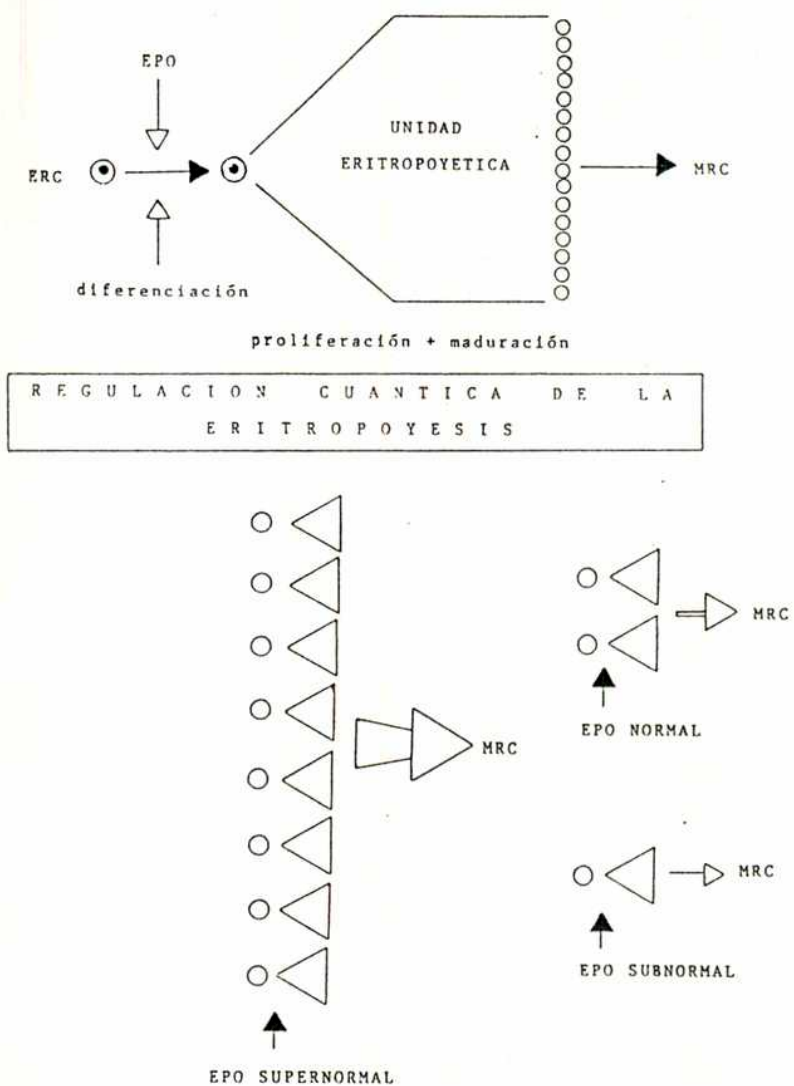


FIGURA 2 : Representación esquemática de la teoría de la regulación cuántica de la eritropoyesis. La diferenciación de una ERC bajo la acción de EPO induce la generación de una unidad eritropoyética e ingreso posterior de 16 eritrocitos a la MRC. La concentración de EPO determina, por lo tanto, el número de unidades eritropoyéticas generadas y el nivel de la producción de eritrocitos.

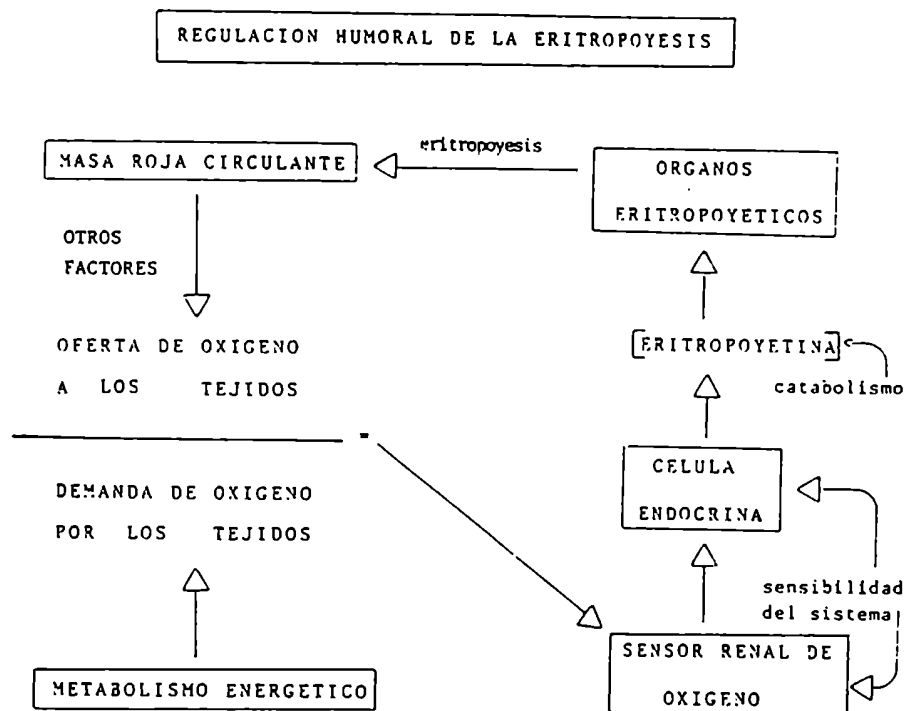


FIGURA 3 : Representación esquemática de la teoría de la regulación humoral de la eritropoyesis. La relación entre la oferta y la demanda de oxígeno a y por los tejidos determina la tasa de secreción de EPO a través de un sensor de oxígeno renal y de células endocrinas renales (existen también células endocrinas extrarenales cuyo mecanismo de estimulación es desconocido). EPO determina el nivel de la eritropoyesis si la capacidad de respuesta de los órganos eritropoyéticos es apropiada.

CAPITULO III : MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Todos los experimentos fueron realizados en ratones de la cepa CF-1, adultos, de ambos sexos, con la excepción del realizado para determinar el efecto de la nefrectomía bilateral, que se efectuó en ratas hembras de la cepa Wistar, adultas. Los primeros fueron obtenidos de la colonia mantenida en nuestro laboratorio desde hace 17 años, mientras que las ratas fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA.

Los animales fueron alimentados con dieta especial para roedores (Purina, dieta no. 1) y agua. Ambos fueron ofrecidos ad libitum. Fueron mantenidos en un bioterio con iluminación natural y temperatura controlada.

2. CUANTIFICACION DE LA ERITROPOYESIS

La cuantificación de la eritropoyesis fue realizada mediante la determinación del porcentaje de una dosis trazadora de Fe⁵⁹ (0.2-0.5 uCi) incorporada al eritrón en desarrollo (eritroblastos, donde el metal es utilizado en la síntesis de hemoglobina) y medida en el eritrón circulante (eritrocitos) 48-72 horas después de su inyección endovenosa (95). El método se basa en las siguientes consideraciones: a) Fe⁵⁹ inyectado en el compartimiento plasmático sale del mismo para incorporarse, en parte, a la hemoglobina que está siendo sintetizada en ese momento, la que será así "marcada". Cuando el proceso de la eritropoyesis termina, al alcanzar las células eritropoyéticas la madurez suficiente para cumplir con sus funciones en la sangre, la hemoglobina marcada aparece en la circulación, pudiendo su radioactividad ser fácilmente detectada en una alícuota de sangre. La cantidad de hemoglobina marcada será proporcional al número de células sintetizadoras de hemoglobina presentes en el eritrón fijo en el momento de la inyección del Fe⁵⁹, cantidad que, a su vez, será proporcional a la dosis de EPO exógena inyectada o de EPO endógena sintetizada por el animal.

Para la determinación del porcentaje de incorporación de Fe⁵⁹ al eritrón (%Fe⁵⁹), un ratón recibe 0.2 uCi y una rata 0.5 uCi de Fe⁵⁹-citrato (CNEA) en 200 ul de solución isotónica por vía endovenosa (venas de la cola), obteniéndose una muestra de sangre por punción cardíaca, con jeringa heparinizada y bajo anestesia etérea profunda, 48-72 horas después de la administración del isótopo. Obtenida la muestra de sangre, se prepara un microhematocrito y se determina la radioactividad presente en 0.5 ml de la misma en un contador de pozo.

El %Fe⁵⁹ es calculado mediante la aplicación de la siguiente ecuación:

$$\%Fe59 = \frac{\text{volemia (ml)} \times \text{ccm/ml sangre} \times 100}{\text{ccm inyectadas}}$$

Donde:

volemia = 5 ml/100g de peso corporal en animales normocitémicos y 8 ml/100 g de peso corporal en policitémicos (valor determinado mediante dilución de eritrocitos homólogos marcados in vivo con Fe59 (96))

3. INDUCCION DE HIPOXIA HIPOBARICA

La inducción de hipoxia hipobárica fue realizada de acuerdo con los lineamientos generales expuestos por Wright y col (97) mediante mantenimiento de los animales en cámaras de altura simulada (hipobáricas) en las que la presión interior es mantenida en 456 mb (0,5 atmósfera = 380 mm Hg), con flujo constante de aire.

Una cámara tipo es metálica, posee una capacidad de 240 dm³ y es mantenida en una habitación a 22 C. Está equipada con una bomba para vacío rotativa, que desplaza 300 l/min de aire, con un manómetro anerode o de Hg que registra la presión en su interior y con una válvula a resorte que abre, dejando ingresar aire al interior de la cámara, cuando en el mismo se alcanza la presión deseada. La cámara aloja en su interior 3 jaulas de alambre con bandejas de acero inoxidable con capacidad para 70 ratones cada una. La capacidad para ratas depende del tamaño de las mismas.

4. INDUCCION DE POLICITEMIA POR EXPOSICION CRONICA A HIPOBARIA O POR HIPERTRANSFUSION

La inducción de policitemia fue realizada mediante la exposición de ratones o ratas a condiciones de hipobaria en forma crónica y discontinua (animales PH = post-hipóxicos) o mediante transfusión doble de eritrocitos homólogos (animales HT = hipertransfundidos).

En el primer modelo (PH), la inducción del estado policitémico fue realizada mediante estimulación de la secreción de EPO y de la eritropoyesis, siendo los animales expuestos a 456 mb durante 18 h/día, 5 veces por semana (de lunes a viernes) por 3 semanas. Este regimen asegura una exposición total de 270 horas, iniciándose a las 15 horas del lunes de la semana 1 y finalizando a las 9 horas del sábado de la semana 3.

Los ratones ingresan a la cámara hipobárica a las 15.00 horas de cada día (con excepción de sábados y domingos), siendo retirados de la misma a las 9.00 horas del día siguiente. Este tipo de exposición recibe el nombre de "discontinua", para oponerse a la "continua", en la que los animales son mantenidos en hipobaria continua. La exposición discontinua es más aconsejable que la continua, ya que durante ésta los animales reducen la ingesta de alimentos y de agua (98), con la consiguiente

pérdida de peso corporal, que no se observa en la primera.

El incremento de la masa eritrocitaria sólo es posible si los depósitos de hierro son aceptables para satisfacer la exagerada demanda del metal por la aumentada síntesis de hemoglobina. Por lo tanto, cada ratón recibe una inyección intraperitoneal de Ferranin-Complex (hierro elemental polimaltosado 1 g, hidroxicoBALamina 1.2 mg, ácido fólico 2.4 mg/100 ml, BYK Liprandi S.A.C.I) inmediatamente antes de su ingreso al período de inducción de policitemia. Además, algunas gotas de sulfato ferroso en solución son agregadas cada día en el agua de bebida durante las 3 semanas de exposición. Este tipo de acciones permite asegurar que la proporción de ratones que alcanza un valor hematocrito aceptable para los estudios (>55% en el momento de la autopsia) supera el 95% del total de animales que iniciaron la exposición.

Los valores de hematocrito (40,7 \pm 2.6 %) y de %Fe59 (41.3 \pm 3.2 %) de los animales antes de su ingreso a la cámara de altura aumentan durante la exposición, alcanzando valores de 72,3 \pm 4,2 % y de 65.2 \pm 3.1 % respectivamente, al finalizar la última exposición.

La inducción de policitemia mediante hipertransfusión se efectúa por medio de dos inyecciones intraperitoneales sucesivas (separadas por 24 horas) de 0.7 - 0.8 ml de una suspensión de eritrocitos homólogos con hematocrito = 80 %.

Esta suspensión es preparada mediante obtención de sangre de ratones "donantes" por punción cardíaca con jeringa heparinizada. En general, son necesarios cuatro donantes para obtener un receptor policitémico. La sangre obtenida es centrifugada, separándose el plasma, siendo entonces los eritrocitos lavados tres veces con solución fisiológica. Ajustado el hematocrito de la suspensión después del último lavado, la misma está lista para su administración.

Mediante este método se obtienen animales con un grado de policitemia similar al obtenido mediante exposición a hipobaría. Ambos métodos difieren en la ausencia de estimulación de la secreción de EPO y de la eritropoyesis para la obtención de la policitemia en el modelo hipertransfundido.

5. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ERITROPOYETINA EN PLASMA MEDIANTE BIOENSAYO O RADIOINMUNOENSAYO

La determinación de la concentración de EPO en plasma mediante bioensayo fue realizada en el modelo del ratón policitémico post-hipóxico (PH) (99).

En el modelo, la inducción del estado policitémico se realiza mediante estimulación de la eritropoyesis en respuesta al incremento de la secreción de EPO. Los animales son expuestos durante 3 semanas a 546 mb de presión barométrica, a razón de 18 h/día, 5 veces por semana, en cámaras hipobáricas (ver 3.)

semana. en cámaras hipobáricas (ver 3.)

El periodo de condicionamiento de los animales finaliza a las 9 horas del tercer sábado desde la iniciación del mismo. El plasma cuya actividad desea determinarse o patrones conocidos de EPO son inyectados a las 10 h del próximo miércoles (4o. día post-hipoxia) por vía subcutánea. Una dosis trazadora de Fe59 (0.2 uCi) es inyectada por vía endovenosa o intraperitoneal a las 10-15 horas del próximo viernes (6o. día post-hipoxia), 48-53 horas post-inyección de EPO. La determinación de %Fe59 es realizada a las 9 horas (9o. día post-hipoxia, 71-76 horas post-inyección de Fe59). Dentro de los resultados, sólo son considerados los valores de animales cuyos hematocritos superan el 55% en el momento de la autopsia. Es conveniente puntualizar que este método mide la concentración de EPO biológicamente activa presente en el plasma.

La determinación de la concentración de EPO mediante RIE, que determina masa de la hormona circulante independientemente de su actividad biológica, fue realizada mediante una modificación del método de Garcia y col. (100).

Epo recombinante humana (rHu-EPO) altamente purificada (>160.000 U/mg) fue obtenida de células de riñón de hamster (BHK cells) transfectadas de acuerdo con el método de Powell y col. (101) y purificada en el Laboratorio de Proteínas de Bio Sidus S.A. El producto fue marcado con I125 mediante el método de cloramina-T. La rHu-EPO fue también utilizada como inmunógeno, obteniéndose suero anti-EPO de conejos. El standard de EPO (Standard WHO o BS 1/90) en diferentes concentraciones o 100 ul de plasma puro o diluido fueron colocados en cada tubo, agregándose a los mismos el mismo volumen de suero anti-EPO en diferentes diluciones de trabajo. La mezcla fue mantenida a 4 C durante 72 horas antes de la adición de I125-rHu-EPO, siendo mantenida en las mismas condiciones durante las 24 horas siguientes. La separación del antígeno unido del libre fue realizada mediante un segundo anticuerpo (gamma globulina anti-conejo). Plasma de ratón con alto contenido de EPO (ver 6.) (22 U/ml) fue utilizado en el rango 1-500 mU/ml para la preparación de una curva standard. Los resultados fueron analizados mediante un programa computadorizado que produce una curva que permite el cálculo de la concentración de EPO en mU/ml. El límite mínimo de detección es de 3 mU/ml.

6. PREPARACION DE PLASMA CON ELEVADA CONCENTRACION DE ERITROPOYETINA

Plasma con elevada concentración de EPO bioactiva fue obtenido de acuerdo con el método de Tambourin y col. (102). Ratones de ambos sexos recibieron 600 r de radiación X: 24 h después, recibieron 60 mg/kg de peso corporal de fenilhidrazina (agente hemolítico, PHZ) por vía intraperitoneal. Alrededor de 10 días más tarde, cuando el valor hematocrito promedio era de 5.7 ± 0.4 %, los animales fueron sangrados mediante punción cardíaca, obteniéndose plasma mediante centrifugación en frío. La

concentración de EPO, medida en el bioensayo del ratón post-hipóxico, fue de 25 U/ml.

7. DETERMINACION DE LA VOLEMIA

La determinación de la volemia, y a partir de ésta del volumen total de eritrocitos circulantes (MRC), fue realizada de acuerdo con el método de dilución, que esencialmente mide la dilución de eritrocitos homólogos "marcados" in vivo con Fe⁵⁹ (96). Por lo menos 5 días antes del ensayo, ratones "donantes" fueron inyectados con 3 µCi de Fe⁵⁹ por vía intraperitoneal. La determinación de la volemia fue efectuada en ratones experimentales mediante la administración de 100 µl de sangre homóloga "marcada" con radioactividad conocida y posterior determinación de la radioactividad presente en 500 µl de sangre obtenida 10 minutos después de la administración de aquella. El valor de la volemia en ml se obtiene dividiendo la radioactividad inyectada por la radioactividad presente en 1 ml de sangre. La multiplicación de este valor por el hematocrito permite el cálculo indirecto de la MRC.

8. DROGAS UTILIZADAS

a. Eritropoetina humana recombinante. Eritropoetina humana recombinante (rHu-EPO) altamente purificada (3180000 U/mg) (HEMAX, Bio Sidas-Elanex) fue utilizada diluida en PBS + HSA (5 mg/ml). Fue obtenida a partir de una línea celular de riñón de hamster (HEp-2) transfectada de acuerdo con el método de Powell y col. (101).

b. Cobalto. Se utilizó Cl₂Co.6 H₂O obtenido de SIGMA.

c. Dexametasona. Se utilizó Decadron Shock, 20 mg/ml, cedido por Merck, Sharp & Dohme.

d. DL Isoproterenol HCl, adquirido en SIGMA.

e. Propionato de testosterona, cedida por Laboratorios Gador en solución oleosa.

9. ANALISIS ESTADISTICO

La comparación de valores individuales entre dos grupos fue realizada mediante la prueba t de Student. Cuando los grupos fueron tres o más con una variable independiente, se efectuó análisis de varianza. Cuando se halló relación estadísticamente significativa, la significación estadística de las diferencias entre los valores fue analizada mediante el test de NewmanKeuls.

CAPITULO 4. R E S U L T A D O S

Experimento no. 1

Efecto de la policitemia inducida por transfusión (ratón HT) o por exposición a hipobaría (ratón PH) sobre la eritropoyesis

Ratones HT y PH fueron inyectados con Fe⁵⁹ en los tiempos después de efectuada la segunda transfusión (HT) o de finalizado el periodo de exposición a hipobaría (PH) que figuran en la abscisa de la Figura 4. La determinación del %Fe⁵⁹ fue calculada 48 h después de su administración.

La figura muestra la declinación secuencial de la eritropoyesis que ocurre en los ratones HT a partir de la segunda transfusión y en los ratones PH a partir del momento de su retorno a presión barométrica normal. La figura también muestra que en ambos modelos, el valor de %Fe⁵⁹ es menor al 1 % al cuarto día de la experiencia, lo que sugiere que ambos métodos de inducción de policitemia inducen una depresión similar de la eritropoyesis.

Experimento no. 2

Efecto de la policitemia transfusional o hipóxica sobre la concentración plasmática de eritropoyetina

Con el objeto de determinar la concentración plasmática de EPO en ratones HT y PH, 10 animales de cada grupo fueron sanados mediante punción cardíaca durante el cuarto día post-transfusión o post-hipoxia. Ratones normocitémicos fueron considerados controles normales. La concentración de la hormona en plasma obtenido mediante centrifugación fue determinada mediante RIE.

Los valores promedio hallados fueron los siguientes: a) Controles = 22.5 ± 0.6 (ES) mU/ml; b) HT = 9.6 ± 0.5 mU/ml y c) PH = 9.3 ± 0.6 mU/ml. La diferencia entre los valores correspondientes a ambos grupos policitémicos y los correspondientes al grupo normocitémico es significativa ($p < 0.05$). La misma no es significativa cuando los valores correspondientes a ratones HT y PH son comparados entre sí.

Estos resultados demuestran que ambos tipos de policitemia inducen descensos significativos y similares de la concentración plasmática de inmuno-EPO. Merece destacarse la observación de una cantidad dosable de la hormona en la circulación pese a la detención casi total de la eritropoyesis (experimento 1).

Experimento no. 3

Respuesta eritropoyética a periodos crecientes de exposición a hipobaría en ratones PH y HT

Tres grupos de 30 ratones cada uno recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 0.3, 0.5 o 0.7 ml de una suspensión de eritrocitos homólogos al 80 % durante dos días consecutivos. Dieciocho ratones HT y 18

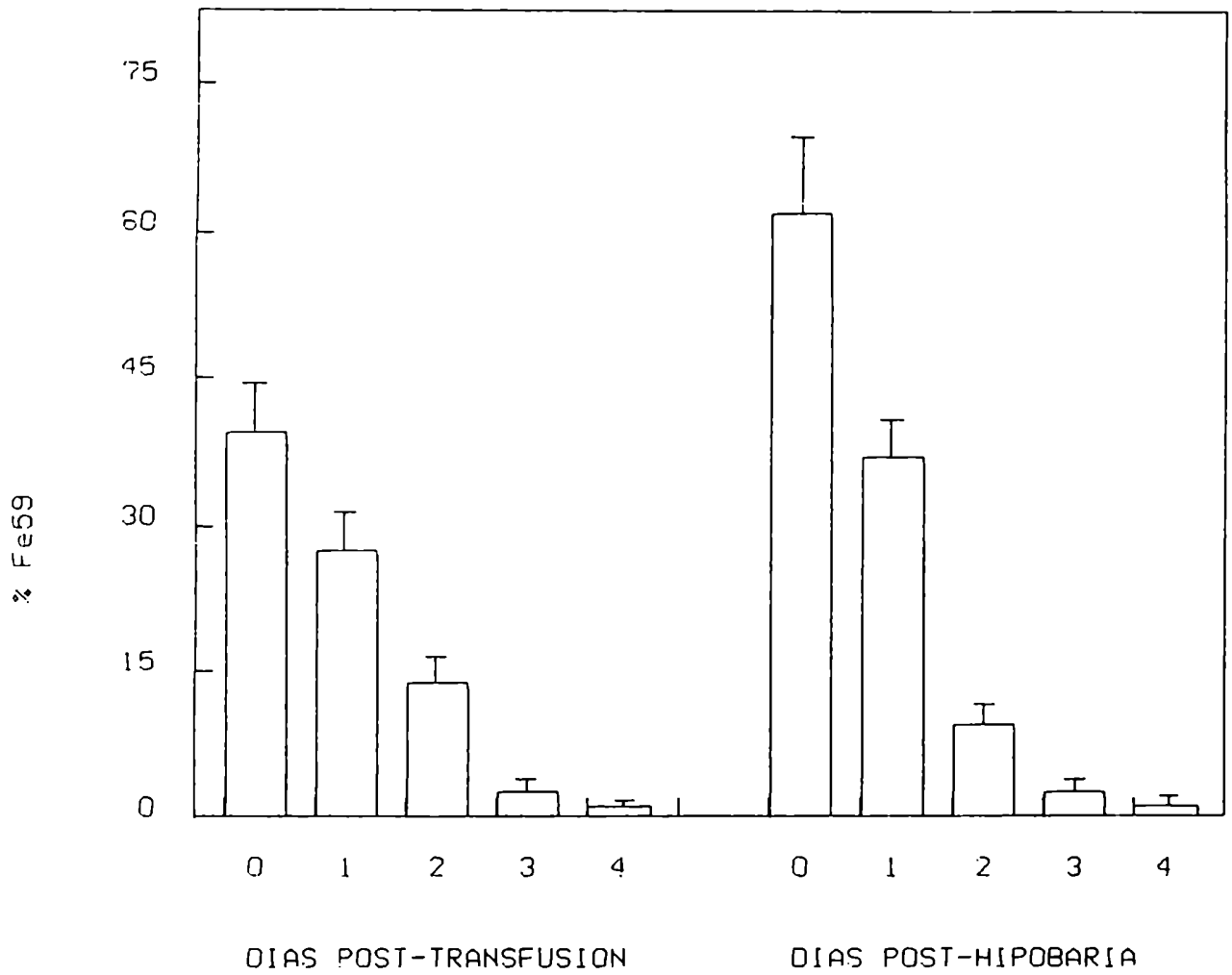


FIGURA 4 : Depresión de la eritropoyesis, medida como incorporación de Fe59 al eritrón circulante, en ratones con policitemia post-transfusional (HT) o post-hipóxica (HI), en función del tiempo transcurrido desde la segunda transfusión (ratones HT) o desde la finalización del período de condicionamiento hipóxico. Valores promedio y ES de 6 animales/grupo

posterior a la segunda transfusión (HT) o a la finalización del período de condicionamiento hipóxico (PH), momento en el cual, en un bioensayo standard, sería inyectada EPO. Los animales permanecieron en la cámara hipobárica durante períodos de 4-24 h. Con excepción de la sustitución de la inyección de EPO por la exposición a hipobaría, el ensayo de la respuesta eritropoyética siguió los lineamientos normales, con administración endovenosa de ^{59}Fe 48 h después de la iniciación de la exposición a hipobaría y determinación de la incorporación del isótopo al eritrón 48 h más tarde. Seis ratones de cada grupo no fueron expuestos a hipobaría, siendo considerados controles no expuestos. El volumen de la MRC fue determinado en los restantes animales de cada grupo en el momento de la autopsia de los animales expuestos.

La respuesta eritropoyética a períodos crecientes de exposición a hipobaría, a juzgar por la incorporación de ^{59}Fe al eritrón, fue claramente dependiente del grado de policitemia alcanzado por los animales HT en respuesta al volumen de eritrocitos inyectado (Figura 5). Los ratones que recibieron 1.4 ml de eritrocitos al 80 % mostraron un volumen de la MRC de 6.20 ± 0.19 ml/100 g peso corporal y un valor hematocrito igual a 72.1 ± 1.1 %. Cuando la policitemia fue inducida por exposición crónica a hipobaría, el volumen de la MRC fue 6.47 ± 0.40 ml/100 g, alcanzando el hematocrito promedio un valor de 70.8 ± 1.9 %. Por lo tanto, estos dos modelos de ratones, HT y PH, con grados similares de policitemia ($p > 0.05$) mostraron una profunda y significativa diferencia ($p < 0.05$) entre sus respuestas a la exposición a hipobaría, siendo el % ^{59}Fe 0.42 ± 0.03 en el grupo HT y 15.51 ± 3.1 en el grupo PH.

Experimento no. 4

Respuesta eritropoyética a EPO exógena en ratones con policitemia post-transfusional o post-hipóxica

Treinta y cinco ratones PH fueron preparados de acuerdo a lo descrito. El mismo número de ratones HT fue obtenido mediante administración de 2 inyecciones iv de 0.6 ml de eritrocitos al 80 %. Ambos grupos de ratones policitémicos fueron divididos en 5 subgrupos iguales. Tres de ellos recibieron volúmenes crecientes de "plasma anémico" con alto contenido en EPO (25 U/ml), como se muestra en la abscisa de la Figura 6, durante el 4o. día posterior a la segunda transfusión (HT) o de finalización del período de condicionamiento hipóxico. Otro grupo recibió solución fisiológica + HSA 5 mg/ml, siendo considerado como control no inyectado. El subgrupo restante fue utilizado para determinación del volumen de la MRC. Una dosis trazadora de ^{59}Fe fue inyectada por via iv 48 h después de la administración del plasma anémico, determinándose la incorporación del isótopo al eritrón 48 h más tarde.

La relación dosis-respuesta para plasma anémico (EPO) en ratones PH y HT se muestran en la Figura 6. El volumen de la MRC fue 6.10 ± 0.65 ml/100 g y 6.36 ± 1.19 en

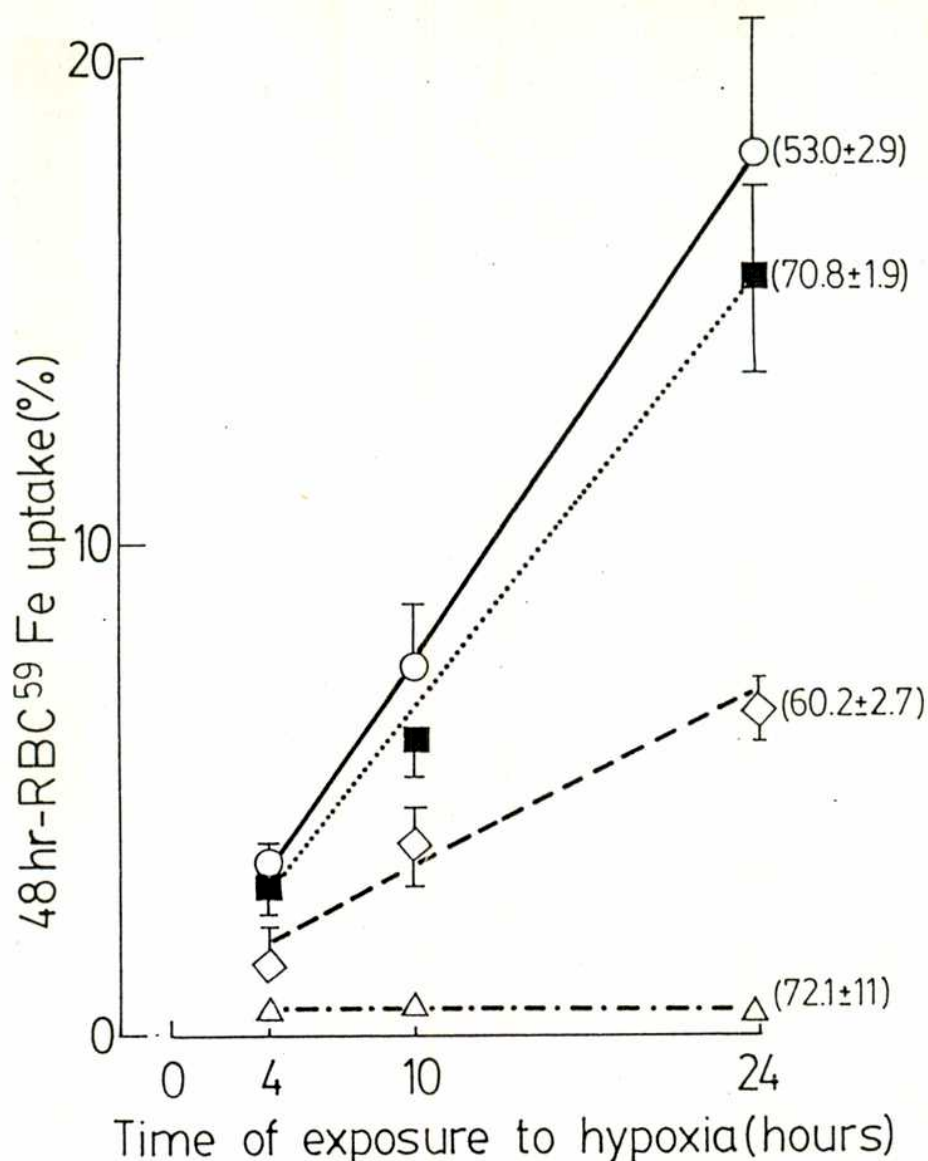


FIGURA 5 : Incorporación de Fe⁵⁹ al eritrón en función del tiempo de exposición a hipobaría en ratones PH v HT. Los ratones PH fueron expuestos a 456 mb 4 días después de finalizado el periodo de condicionamiento hipóxico, mientras que los ratones HT lo fueron 4 días después de la segunda transfusión. Radiohierro inyectado 48 h más tarde y determinación de %Fe⁵⁹ efectuada 48 h después. Cada punto representa el promedio \pm ES de 6 animales. Los números entre paréntesis indican el valor promedio del hematocrito. Círculos abiertos = ratones HT transfundidos con 0.6 ml; cuadrados abiertos = ratones HT transfundidos con 1.0 ml; triángulos abiertos = ratones HT transfundidos con 1.4 ml; Cuadrados negros = ratones PH
 Time of exposure to hypoxia (hours) = tiempo de exposición a hipobaría (horas); 48hrRBC ⁵⁹Fe uptake (%) = %Fe⁵⁹

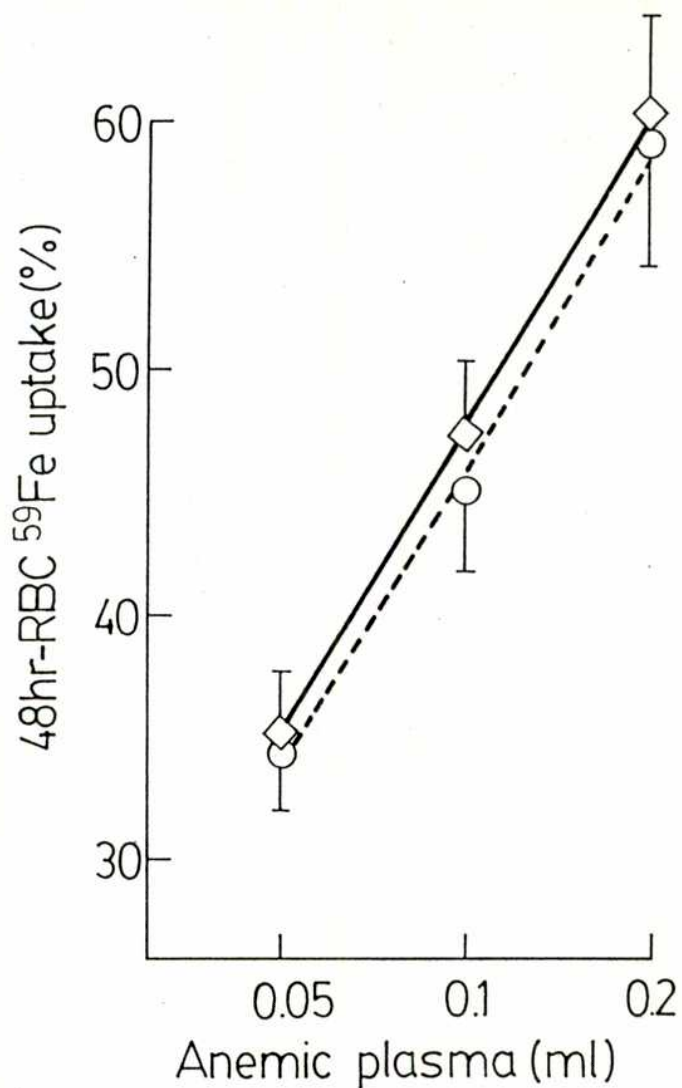


FIGURA 6 : Incorporación de Fe59 al eritrón (%Fe59) en ratones policitémicos en función del volumen de plasma anémico (EPO = 25 U/ml) administrado 48 h antes del radiohierro. Los símbolos representan el valor promedio de 7 animales por punto, mientras que las líneas verticales demuestran el ES. Las respuestas mostradas con rombos fueron obtenidas en ratones HT, mientras que las mostradas con círculos lo fueron en ratones PH. Anemic plasma (ml) = plasma anémico (ml): ordenada = %Fe59

valor promedio de %Fe59 en ratones inyectados con solución fisiológica fue $0,99 \pm 0,14$ y $1,04 \pm 0,26$ % en ratones HT y PH, respectivamente. El %Fe59 fue proporcional al log del volumen de plasma anémico inyectado, mostrando un rango entre 34,46 y 60,62 % en ratones HT y entre 34,21 y 60,37 % en ratones PH. Por lo tanto, curvas de relación dosis-respuesta casi idénticas fueron obtenidas para ambos grupos de ratones policitémicos.

Experimento no. 5

Determinación de la actividad eritropoyética presente en el plasma de ratones PH y HT expuestos a hipobaría

Veinte ratones PH y 20 ratones HT (0.6 ml x 2) fueron expuestos a 456 mb 4 días después de la finalización del período de condicionamiento hipóxico o de la segunda transfusión durante 24 h. Los animales de ambos grupos fueron sacrados por punción cardíaca inmediatamente después de finalizada la exposición, separándose plasma mediante centrifugación. Los plasmas obtenidos de los ratones pertenecientes a cada grupo fueron combinados para obtener así un volumen suficiente para efectuar la valoración biológica de los mismos mediante bioensayo en el modelo de ratón ex-hipóxico. Los animales de bioensayo fueron inyectados con 1,0 ml de esos plasmas combinados.

La actividad eritropoyética presente en el plasma de ratones HT y PH expuestos a hipobaría durante 24 h se presenta en la Figura 8. El hematocrito promedio fue $65,08 \pm 1,79$ % en donantes PH y $60,92 \pm 1,64$ % en donantes HT. Mientras que no se detectó actividad eritropoyética en el plasma de ratones HT expuestos a hipobaría, su valor superó las 200 mU/ml en los ratones PH.

Experimento no. 6

Respuesta eritropoética a hipobaría en ratones post-hipóxicos, hipertransfundidos, o post-hipóxicos-hipertransfundidos

Como se muestra en la Figura 9, fueron constituidos 4 grupos (G1-G4) de 22 ratones cada uno. G1 estaba formado por ratones PH. G2 estaba integrado por ratones HT "agudos", que recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 0.6 ml de eritrocitos al 80 % durante 2 días consecutivos. La segunda transfusión fue realizada durante el último día de exposición de los ratones pertenecientes al G1 a hipobaría. G3 estaba formado por ratones HT "crónicos", que recibieron 1 inyección semanal por vía intraperitoneal de 0.8 ml de eritrocitos al 80 % durante 3 semanas. La tercera transfusión fue efectuada durante el último día de exposición de los ratones pertenecientes a G1 a hipobaría. G4 estaba integrado por ratones PH-HT, resultado de la combinación de los tratamientos impuestos a los ratones de G1 y G3. Ocho ratones de cada grupo fueron expuestos a hipobaría (456 mb) 4 días después de la última transfusión o de terminado el período de condicionamiento hipóxico. En ese momento, en un bioensayo standard, hubiera sido inyectada EPO. Los

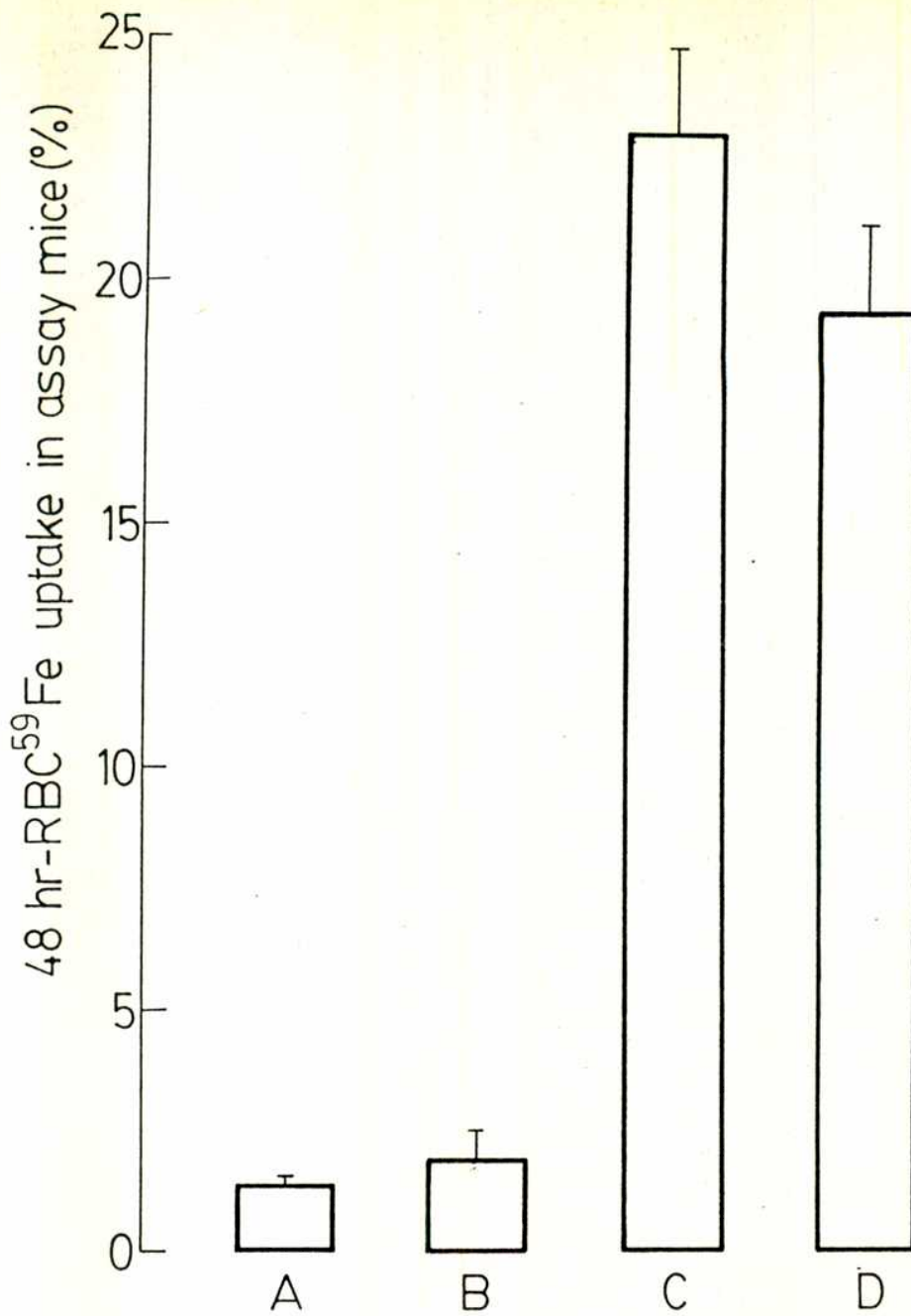


FIGURA 8 : Actividad eritropoyética presente en el plasma de ratones HT y PH expuestos a 456 mb durante 24 h. La actividad fue medida como %Fe⁵⁹ (ordenada) en ratones post-hipóxicos. Los ratones de bioensayo recibieron: Grupo A = solución fisiológica, Grupo B = plasma de ratones HT, Grupo C = plasma de ratones PH, Grupo D = 200 mU de EPO. Los valores son promedio y ES de 8-10 animales por grupo

animales permanecieron en la cámara hipobárica durante 24 horas. Con la excepción de la sustitución de EPO por hipoxia, el ensayo de la actividad eritropoyética siguió los pasos del protocolo standard, con inyección iv de ^{59}Fe 48 horas después de la iniciación de la exposición a hipobaría y determinación del $\%^{59}\text{Fe}$ 48 horas más tarde. Ocho ratones de cada grupo no expuestos a hipobaría fueron considerados como controles no-expuestos para cada grupo. El volumen de la MRC fue determinado en los restantes 6 ratones de cada grupo en el momento de la autopsia de los animales experimentales.

La respuesta eritropoyética a 24 horas de exposición a 456 mb, medida como $\%^{59}\text{Fe}$, en ratones PH (G1), HT "agudos" (G2), HT "crónicos" (G3) y ratones PH-HT (G4), se muestra en la Figura 10. El volumen de la MRC y el valor hematocrito no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre ratones PH y HT (G1 vs G2 y G3). A pesar de ello, el $\%^{59}\text{Fe}$ fue aproximadamente 25 veces mayor en los ratones PH que en ambos tipos de ratones HT, agudos y crónicos en respuesta a hipobaría. Además, los ratones PH-HT, que mostraron el mayor volumen de MRC y de valor hematocrito en comparación con los restantes grupos ($p < 0.05$) mostraron una respuesta eritropoyética no significativamente diferente ($p > 0.05$) de la observada en los ratones PH (G1 vs G4) y aproximadamente 20 veces mayor que la correspondiente a ratones HT "agudos" y "crónicos" (G4 vs G2 y G3).

Experimento no. 7

Efecto de la duración de la exposición previa a hipobaría sobre la respuesta eritropoyética a hipobaría de ratones HT

Para el presente experimento, fueron constituidos 8 grupos (G1-G8) de 14 ratones cada uno. Todos los animales recibieron dos inyecciones intraperitoneales de 0.6 ml de eritrocitos homólogos al 80 % durante 2 días consecutivos. Ratones pertenecientes a los grupos G3 a G8 habían sido previamente expuestos a 456 mb durante periodos variables, entre 6 y 216 horas. El último día de la exposición, en todos los casos, fue el día inmediatamente anterior a la primera transfusión. Ratones de cada grupo fueron expuestos a 456 mb durante 24 horas 4 días después de la última transfusión. Los animales fueron inyectados con ^{59}Fe 48 horas más tarde, determinándose $\%^{59}\text{Fe}$ 48 horas después. Los ratones pertenecientes a G1 no fueron expuestos a hipobaría. Los ratones pertenecientes a G2 fueron expuestos sólo después de haber sido transfundidos. El volumen de MRC fue determinado en los 6 animales restantes de cada grupo, en el momento de la autopsia de los animales experimentales.

La Figura 11 muestra el efecto de la duración de la exposición previa a hipobaría sobre la respuesta eritropoyética a 24 horas de exposición a 456 mb en ratones HT. Los animales HT no expuestos previamente a hipobaría (G2) mostraron un muy pequeño incremento, aunque significativo ($p < 0.05$) de $\%^{59}\text{Fe}$ en respuesta a la hipoxia. Un progresivo incremento de $\%^{59}\text{Fe}$ en respuesta a

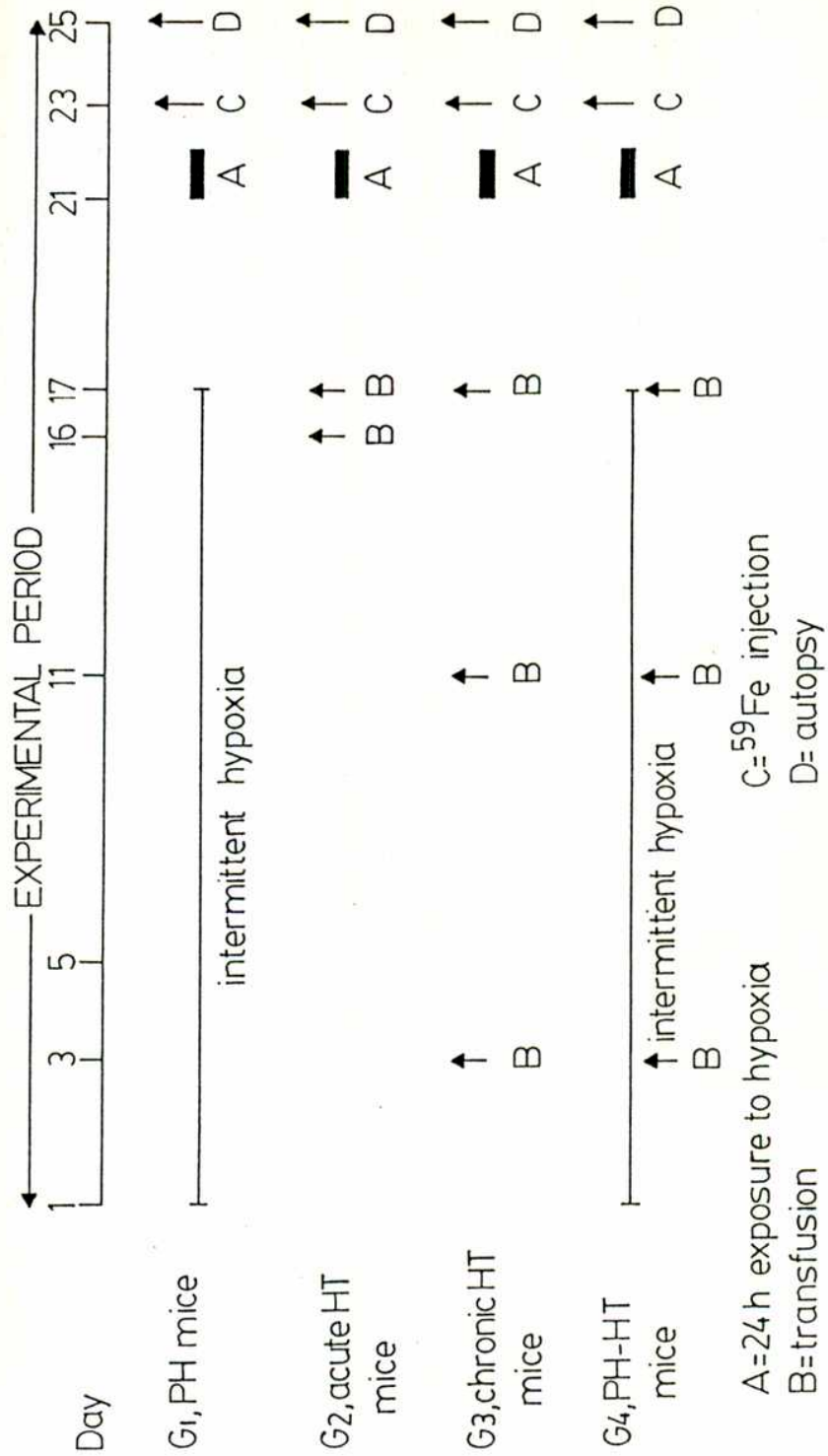


FIGURA 9 :Respuesta eritropoética a hipobaría en ratones post-hipóxicos (PH), hipertransfundidos (HT) o post-hipóxicos-hipertransfundidos (PH-HT). Diseño experimental

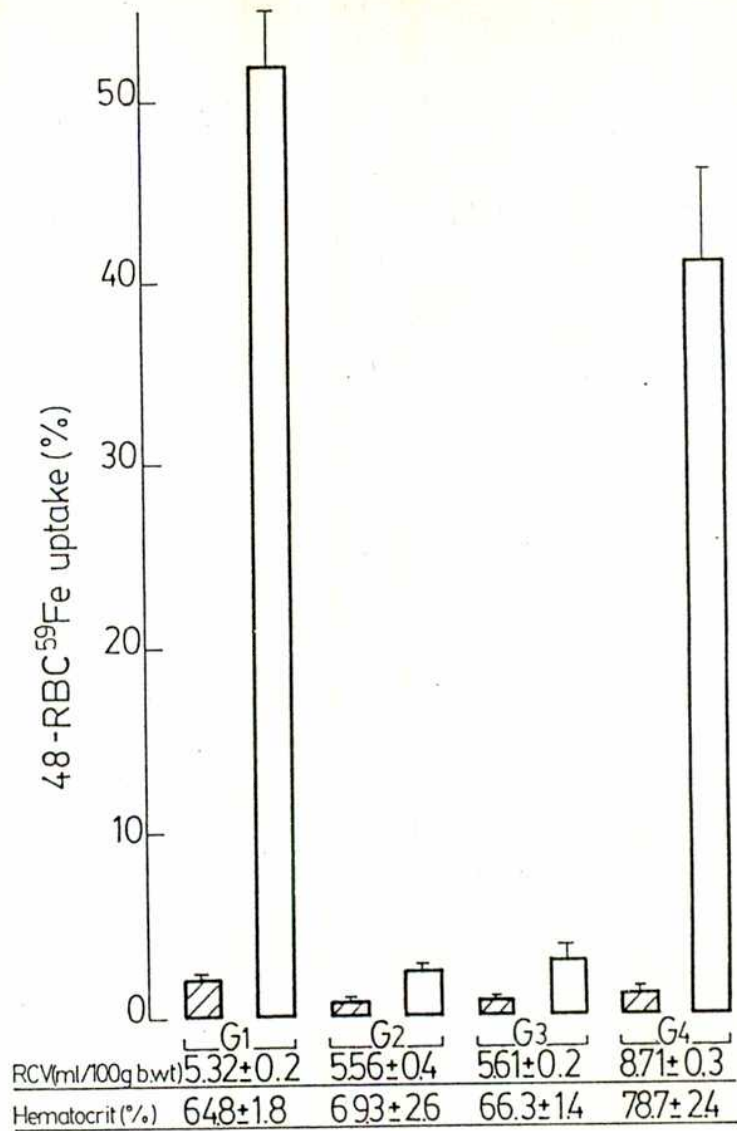


FIGURA 10 : Respuesta eritropoyética a hipobaría en ratones post-hipóxicos (PH, G1), hipertransfundidos "agudos" (HT, G2), hipertransfundidos "crónicos" (HT, G3) y post-hipóxicos-hipertransfundidos (PH-HT, G4). Los ratones PH fueron expuestos a 456 mb 4 días después de la finalización del período de condicionamiento hipóxico, mientras que los ratones HT lo fueron 4 días después de recibir la segunda transfusión. El ^{59}Fe fue inyectado 48 h después de iniciada la exposición a hipobaría y el % ^{59}Fe calculado 48 h más tarde. Barras blancas = ratones experimentales, barras rayadas = ratones no expuestos a hipobaría. Cada barra representa el valor promedio de 6-8 animales; las líneas verticales representan 1 ES. Ordenada = % ^{59}Fe ; RCV = masa roja circulante

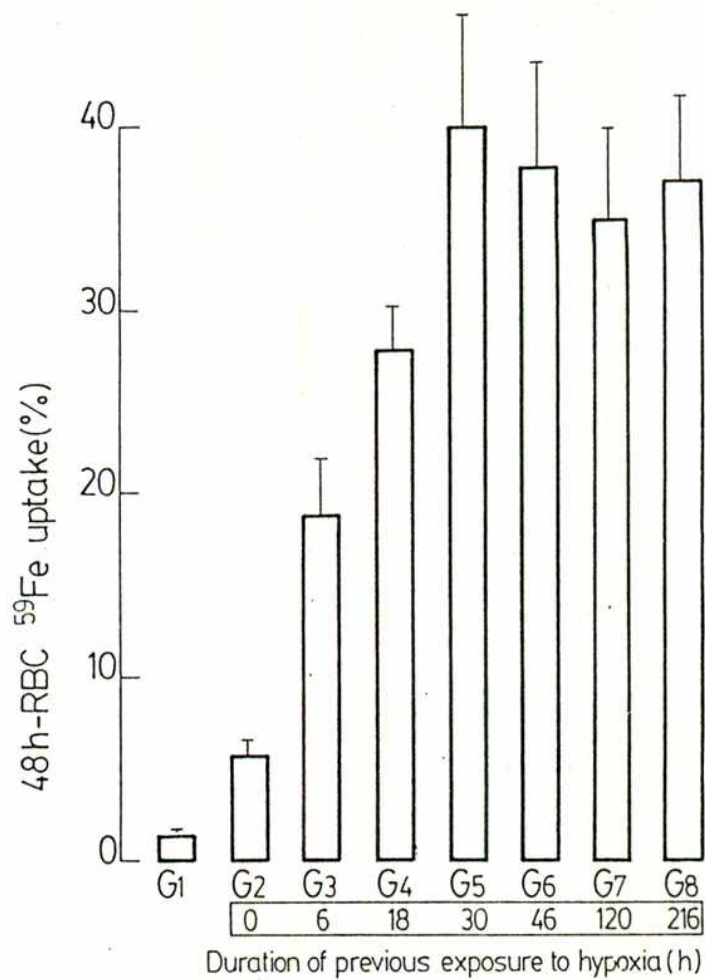


FIGURA 11 :Efecto de la duración de la exposición previa a hipobaría sobre la respuesta eritropoética de ratones hipertransfundidos (HT). Los ratones fueron expuestos a 456 mb 4 días después de efectuada la segunda transfusión. El Fe⁵⁹ fue inyectado 48 h después de iniciada la exposición a hipobaría y el %Fe⁵⁹ calculado 48 h más tarde. Los ratones pertenecientes a G2 a G8 habían sido expuestos a 456 mb antes de las transfusiones durante los tiempos indicados en la abcisa. Los ratones G1 son controles no expuestos a hipobaría ni antes ni después de las transfusiones. Promedio \pm ES de 6-8 animales
 Ordenada = %Fe⁵⁹: Abcisa = duración (h) de la exposición previa a hipobaría

expuestos previamente a hipobaría durante 6-30 horas. No se observaron incrementos mayores cuando la exposición previa a hipobaría fue de 46-216 horas.

Experimento no. 8

Respuesta eritropoyética a estímulos que inducen secreción de eritropoyetina endógena en ratones policitémicos hipertransfundidos o post-hipóxicos

Ochenta ratones HT y 80 ratones PH fueron divididos en grupos de 10 animales cada uno. Cinco días después de la última transfusión o de la finalización del período de condicionamiento hipóxico, grupos de ratones HT y PH recibieron uno de los siguientes tratamientos: (1) exposición a 456 mb durante 24 h; (2) inyección subcutánea de 0,5 mg de dexametasona; (3) inyección subcutánea de 50 mg/Kg de peso corporal de DL isoproterenol HCl; (4) inyección subcutánea de 2,5 mg de propionato de testosterona, que fue repetida 24 horas después; y (5) inyección subcutánea de 700 mU de EPO (en la forma de plasma anémico). El experimento fue también realizado comenzando los tratamientos descritos 4 días después de la segunda transfusión o de la finalización del período de condicionamiento hipóxico. Como los resultados obtenidos en ambos casos no difirieron en forma significativa, sólo serán considerados aquellos obtenidos en el primero de ellos. Los ratones expuestos a hipobaría o tratados con dexametasona, isoproterenol o EPO fueron inyectados por vía endovenosa con Fe⁵⁹ 48 horas más tarde, determinándose %Fe⁵⁹ 48 horas después. Los ratones tratados con testosterona recibieron el Fe⁵⁹ 96 horas después de la segunda inyección del esteroide, determinándose %Fe⁵⁹ 72 horas más tarde. Se realizó la determinación de la ferremia en plasmas de ratones HT y PH tomados al azar en el momento de la inyección del radiohierro. El volumen de la MRC fue determinado en el momento de la autopsia.

El volumen de la MRC en ratones PH fue 5.84 ± 0.6 ml/100 g de peso corporal, mientras que el valor fue 5.72 ± 0.3 ml/100 g en ratones HT ($p > 0.05$), lo que indica que ambos modelos policitémicos mostraban el mismo nivel de policitemia. Los niveles de ferremia fueron 2.53 ± 0.7 ug/ml y 2.79 ± 0.8 ug/ml en ratones PH y HT, respectivamente ($p > 0.05$).

El efecto de la exposición a hipobaría o de la administración de dexametasona, isoproterenol, testosterona o EPO sobre %Fe⁵⁹ (expresado en forma relativa en relación con el control específico no tratado) se muestra en la Figura 12. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores correspondientes a ratones PH y HT expuestos a hipobaría o inyectados con dexametasona, isoproterenol o testosterona, siendo los valores siempre superiores en los primeros que en los segundos. Por el contrario, la respuesta a EPO fue similar en ambos grupos.

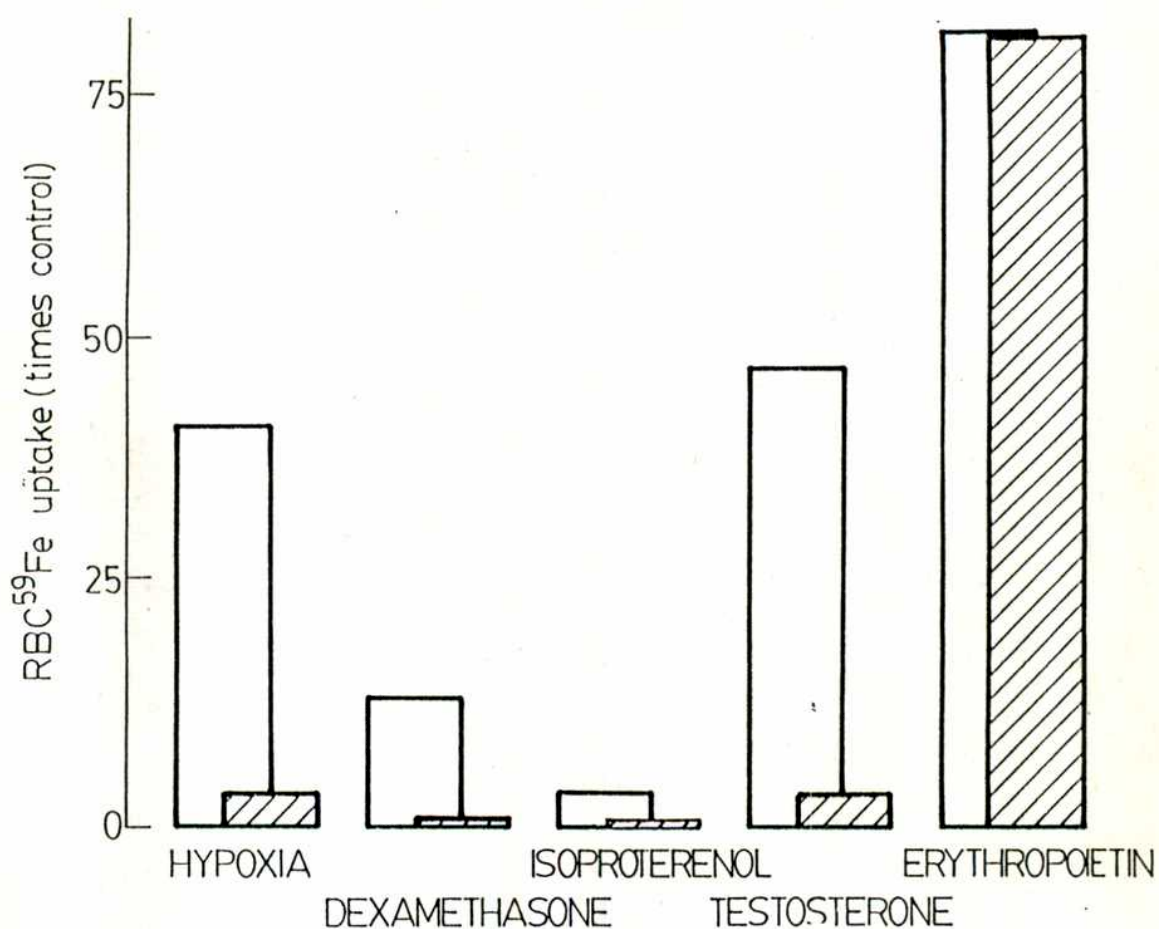


FIGURA 12 : Efecto de diferentes tratamientos sobre %Fe⁵⁹ (x valor control) en ratones post-hipóxicos (barras blancas) e hipertransfundidos (barras rayadas)
 Ordenada = %Fe⁵⁹

Experimento no. 9:

Producción de eritropoyetina renal y extra-renal en respuesta a hipoxia hipobárica en ratas post-hipóxicas o hipertransfundidas

a. Respuesta eritropoética a la exposición a hipobaría en ratas post-hipóxicas o hipertransfundidas

Siete ratas HT y 7 ratas PH fueron expuestas a 456 mb 4 días después de la segunda transfusión o de la terminación del período de condicionamiento hipóxico, respectivamente. Un número igual de ratas normales fueron también expuestas. La exposición a hipobaría duró 24 horas; dosis trazadoras de Fe59 fueron inyectadas a los animales por vía endovenosa 48 horas después de la iniciación de la exposición, determinándose %Fe59 48 horas más tarde. Siete ratas de cada grupo no fueron expuestas a hipobaría, siendo consideradas como controles no expuestos. El volumen de la MRC fue determinado en 5 ratas de cada grupo en el momento de la autopsia de los animales experimentales.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. Las ratas que recibieron 5.0 ml/100 g de peso corporal de una suspensión de eritrocitos homólogos con hematocrito = 80 % (ratas HT) mostraron un volumen de MRC = 4.68 ± 0.6 ml/100 g y un valor hematocrito = 67.2 ± 2.0 %. Cuando la policitemia fue inducida mediante exposición crónica a hipobaría (ratas PH), la MRC fue 4.32 ± 0.15 ml/100 g y el valor hematocrito = 64.3 ± 2.1 %. Estos dos tipos de animales con grados similares de policitemia mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sus respuestas a la exposición a hipoxia hipobárica, siendo el valor de %Fe59 = 11.24 ± 3.6 % en las ratas HT e = 69.6 ± 3.9 en las ratas PH. Por lo tanto, los cambios inducidos en %Fe59 por el estímulo hipóxico en ratas HT y PH fueron 2.63 y 13.67 veces el valor de su propio control, respectivamente. Ratas normocitémicas tratadas en forma similar y expuestas a hipobaría mostraron un %Fe59 1.34 veces superior al de su respectivo control no expuesto.

b. Concentración de eritropoyetina en extractos renales de ratas post-hipóxicas o hipertransfundidas expuestas a hipobaría

Cinco ratas PH y 5 HT fueron expuestas a 456 mb durante 6 horas, 4 días después de la segunda transfusión (HT) o de la finalización del período de condicionamiento hipóxico (PH). Cinco ratas normales fueron también expuestas y consideradas como controles. El período de exposición de 6 horas fue elegido teniendo en cuenta el patrón temporal de EPO renal en ratas expuestas a hipobaría. Al final del período hipóxico, los animales fueron anestesiados con éter, obteniéndose la mayor cantidad posible de sangre por punción de la aorta abdominal. A través de la misma aguja insertada en la arteria, y previa sección de la vena vular, los animales fueron perfundidos con solución fisiológica hasta

que se produjo el cese de la actividad cardíaca. La eficacia de la transfusión fue determinada en un grupo separado de ratas que fueron inyectadas con eritrocitos marcados con Fe59 por vía endovenosa. Todo el radiohierro inyectado fue recuperado en el líquido de perfusión. Los riñones de cada animal fueron extraídos y cortados en cuartos, los que fueron colocados en solución de buffer fosfato, pH 7.3, a razón de 12 riñones/ml de líquido. El conjunto fue colocado sobre hielo y homogeneizado durante 22 seg. La mezcla fue entonces centrifugada a 2.300 o durante 30 min, recogiendo el sobrenadante, que fue congelado hasta su ensayo en el ratón ex-hipóxico.

La concentración de EPO en homogenatos de riñones provenientes de ratas normales, PH y HT expuestas a 456 mb durante 6 horas se muestra en la Fig. 14. La concentración de EPO renal en los tres grupos de animales no expuestos a hipobaría fue inferior al límite detectable por el bioensayo (50 mU/ml). La misma aumentó en forma significativa en los animales normocitémicos y en los policitémicos durante la exposición a hipobaría. Sin embargo, el valor hallado en los animales PH fue significativamente ($p < 0,05$) mayor al correspondiente a los HT y aún a los normocitémicos. Por el contrario, la concentración de EPO en los homogenatos renales obtenidos de ratas HT fue inferior ($p < 0,05$) que el observado en los correspondientes a ratas normocitémicas.

c. Concentración de eritropoyetina en plasma de ratas nefrectomizadas, post-hipóxicas o hipertransfundidas, expuestas a hipobaría

Cinco ratas PH y 5 HT fueron sometidas a nefrectomía unilateral un día después de la finalización del período de condicionamiento hipóxico (PH) o de la segunda transfusión (HT). El riñón restante fue extirpado 3 días más tarde, inmediatamente antes de que las ratas fueran expuestas a hipobaría. Un grupo de 5 ratas normales y otro de ratas nefrectomizadas no policitémicas fueron también expuestas y considerados como controles. Se obtuvo sangre mediante punción cardíaca de los animales después de 8 horas de exposición, separándose el plasma mediante centrifugación, que fue conservado a -20°C hasta su ensayo en el ratón ex-hipóxico.

La concentración de EPO en ratas normales y nefrectomizadas normo- o policitémicas expuestas a hipobaría se muestra en la Figura 15. La concentración de EPO en plasma de ambos tipos de ratas policitémicas (HT y PH) fue significativamente menor ($P < 0,05$) que el valor correspondiente a ratas nefrectomizadas normocitémicas. No se encontraron diferencias significativas entre ratas PH y HT en lo referente a la concentración de EPO en plasma.

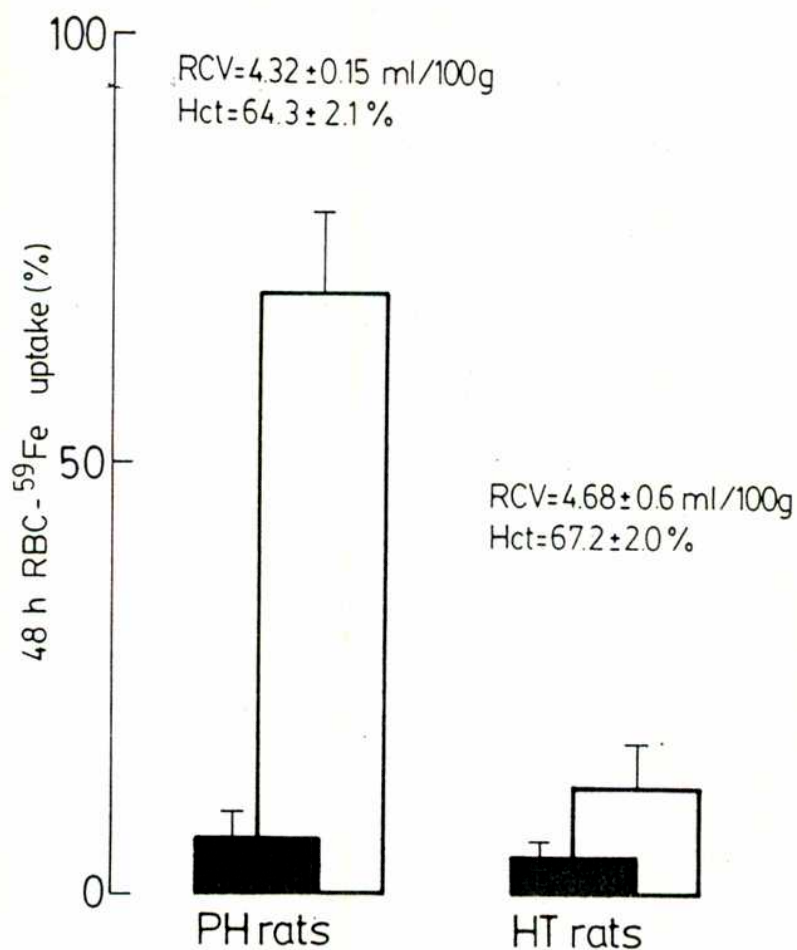


FIGURA 13 : %Fe⁵⁹ en ratas policitémicas post-hipóxicas o hipertransfundidas expuestas a hipoxia hipobárica durante 24 horas. Las barras blancas representan el valor promedio de ratas expuestas, mientras que las barras negras representan el valor correspondiente a ratas no expuestas. PH rats = ratas post-hipóxicas, HT rats = ratas hipertransfundidas. Promedio y ES
 Ordenada = %Fe⁵⁹; RCV = masa roja circulante

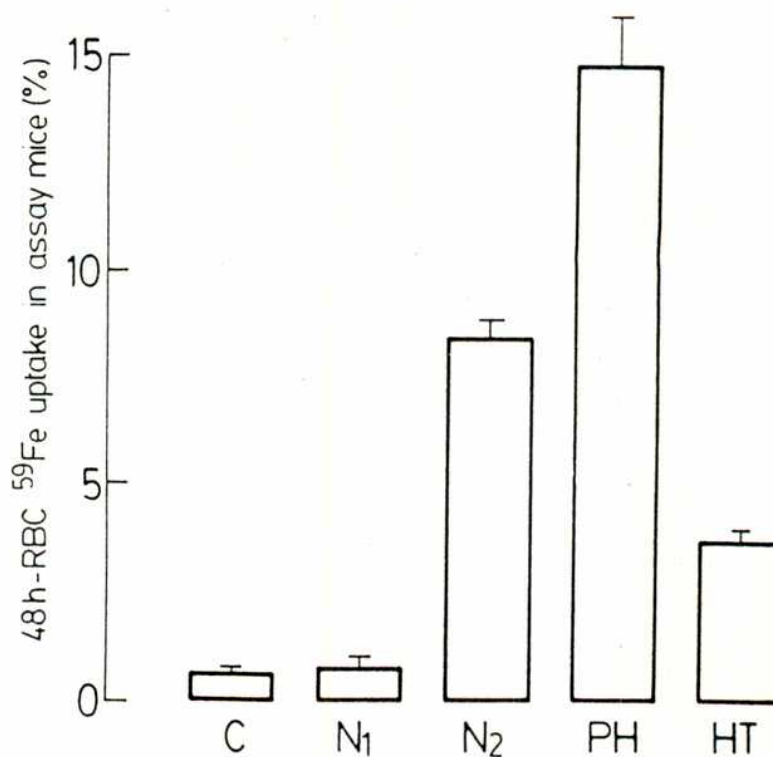


FIGURA 14 : Concentración de eritropoietina en homogenatos renales de ratas normo- y policitémicas expuestas a hipoxia hipobárica durante 24 horas. La concentración de la hormona se expresa como %Fe59 en ratones post-hipóxicos inyectados con los homogenatos. C = control inespecífico en el animal de bioensayo, N1 = homogenato de riñón de rata normocitémica no expuesta a hipobaría, N2 = idem de rata normocitémica expuesta a hipobaría, PH = idem de rata post-hipóxica, HT = idem de rata hipertransfundida. Promedio y error standard de cada grupo. Ordenada = %Fe59

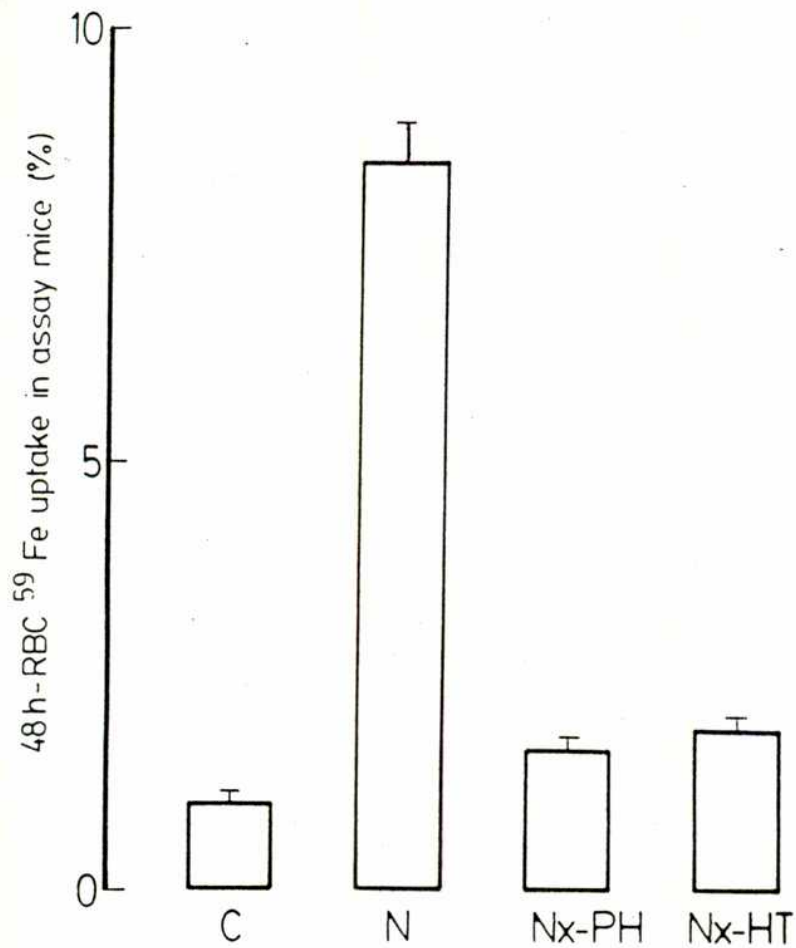


FIGURA 15 :Concentración de eritropoyetina plasmática en ratas normales (N) y nefrectomizadas policitémicas, post-hipóxicas (Nx-PH) o hipertransfundidas (Nx-HT) en respuesta a exposición a hipoxia hipobárica. La concentración de la hormona se expresa como %Fe⁵⁹ en ratones de bioensayo. C = control inespecífico del bioensayo. Las barras representan valores promedio y las líneas sobre las mismas el error standard
Ordenada = %Fe⁵⁹

Experimento no. 10:

Eritropoyesis y secreción de eritropoyetina en respuesta a la inyección de cloruro de cobalto en ratones con policitemia hipóxica (PH) o transfusional (HT)

Con el objeto de determinar la respuesta a cobalto de ratones PH y HT, 56 ratones de cada modelo fueron preparados según lo expuesto. Ambos grupos de ratones policitemicos fueron divididos en 7 subgrupos iguales. Cuatro de ellos recibieron diferentes dosis de rHu-EPO (entre 50 y 400 mU); otros 2 subgrupos fueron inyectados con Cl_2Co (4 y 8 μ moles); el subgrupo restante recibió solución fisiológica, siendo considerado como control no inyectado. Todas las inyecciones fueron realizadas 4 días después de la segunda transfusión en los ratones HT o de la terminación del período de condicionamiento hipóxico en los animales PH. La determinación de la tasa eritropoyética fue efectuada mediante cálculo del $\%Fe^{59}$ en la forma descrita.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. En la parte izquierda de la misma pueden observarse las respuestas de ambos modelos experimentales a dosis crecientes de rHu-EPO. La regresión de las relaciones dosis-respuesta fue paralela, confirmando una vez más que la respuesta a EPO exógena es semejante en ambos tipos de ratones policitemicos. La parte derecha de la figura muestra las respuestas a 4 y 8 μ moles de cobalto. Mediante comparación con la curva dosis-respuesta para rHu-EPO correspondiente a cada modelo, se determinó que las respuestas de los ratones PH fueron equivalente a 95 y 145 mU rHu-EPO, respectivamente. La respuesta de los ratones HT a 4 μ moles de cobalto no fue detectable; la respuesta a 8 μ moles fue equivalente a 52 mU rHu-EPO. Por lo tanto, la respuesta eritropoyética a 8 μ moles de cobalto fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ratones PH que en los HT.

Experimento no. 11:

Concentración plasmática de eritropoyetina endógena y tasa eritropoyética en respuesta a la inyección de cobalto en ratones normo- y policitemicos

Tres grupos de 40 ratones cada uno fueron establecidos con animales normocitemicos y policitemicos PH o HT. Cada grupo fue subdividido en 4 subgrupos iguales, 2 para la determinación de la tasa eritropoyética (control + experimental) y 2 para la estimación de la concentración plasmática de EPO (control + experimental). Los subgrupos experimentales recibieron una inyección de 8 μ moles de Cl_2Co mientras que los controles fueron inyectados con solución fisiológica. Un subgrupo experimental y otro control fueron sangrados mediante punción cardíaca 12 h después de la inyección de cobalto. El plasma de cada animal fue separado mediante centrifugación y conservado a $-20^{\circ}C$ hasta la

determinación de la concentración de EPO inmuno-reactiva mediante RIE. Los restantes subgrupos experimental y control recibieron una dosis trazadora de Fe59 48 h después de las inyecciones de cobalto o de solución fisiológica. La determinación del %Fe59 fue realizada 48 h más tarde.

La Figura 17 muestra las respuestas eritropoyéticas correspondientes a ratones normocitémicos y policitémicos en su parte izquierda y las concentraciones de iEPO en plasma en su parte derecha. El análisis de la misma indica que la respuesta eritropoyética a cobalto en los ratones HT fue extremadamente baja y significativamente diferente de la observada en ratones PH. La comparación entre las respuestas a cobalto de ratones normo- y policitémicos fue dificultada por el elevado valor basal de %Fe59 presente en los animales normocitémicos controles. La figura también muestra que los niveles en plasma de iEPO 12 h después de la inyección de cobalto no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre ratones normocitémicos y PH, sugiriendo que la producción de la hormona fue similar en ambos grupos. Por el contrario, la respuesta a cobalto de los ratones HT fue significativamente inferior ($p < 0.05$) que la correspondiente a ratones normocitémicos y PH.

Experimento no. 12:

Efecto de un estado hemolítico compensado sobre la respuesta eritropoyética a hipobaría de ratones con policitemia post-transfusional

El experimento fue realizado con el objeto de determinar si un estado hemolítico compensado, caracterizado por una producción de eritrocitos aumentada a pesar de una concentración casi normal de hemoglobina, es capaz de modificar la respuesta eritropoyética a hipobaría de ratones hechos policitémicos mediante hipertransfusión al término del período hemolítico. Cuarenta ratones fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno. Dos de ellos recibieron una dosis inicial de 4,0 mg/100 g peso corporal de fenilhidrazina (agente hemolítico, PHZ) durante el día 1 de la primera semana, la que fue seguida por dosis de 2,0 mg/100 g cada 7 días durante un total de seis semanas. Los animales inyectados con la droga más los integrantes de los dos grupos restantes, que no la recibieron, fueron transfundidos de acuerdo con lo explicado al término de las seis semanas. Un grupo de ratones no inyectados más otro de ratones inyectados con PHZ fueron expuestos a 456 mm durante 24 h en la cámara hipobárica. Los dos grupos restantes no fueron expuestos. La exposición fue iniciada 4 días después de la segunda transfusión. Los animales recibieron una dosis trazadora de Fe59 2 días después de iniciada la exposición a hipobaría, determinándose %Fe 2 días más tarde.

La evidencia para el establecimiento del estado hemolítico compensado en los animales inyectados con PHZ se obtuvo a partir del valor hematocrito y del recuento de

reticulocitos en sangre. El primero mostró su menor valor

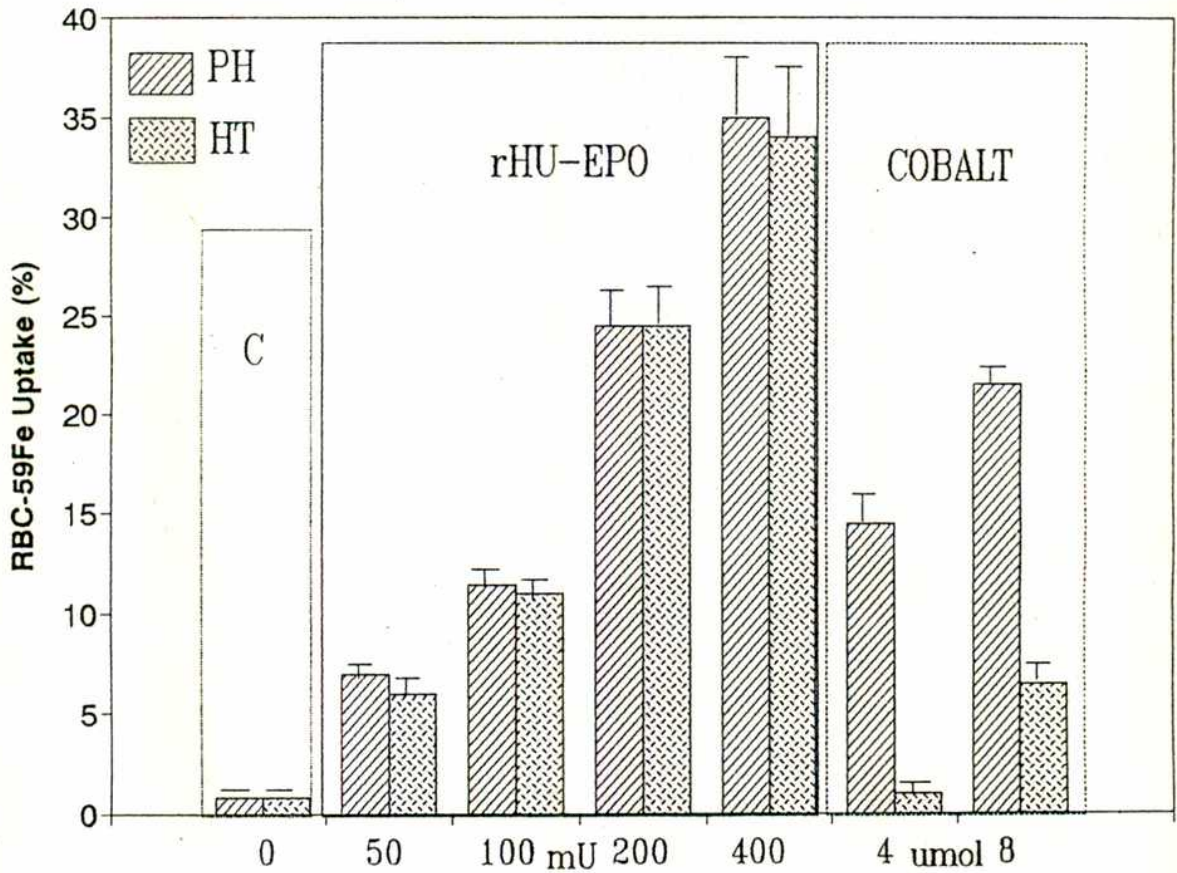


FIGURA 16 :Relación dosis-respuesta para rHu-EPO en ratones policitémicos post-hipóxicos (PH) o hipertransfundidos (HT) medida como %Fe59. Efecto de la administración de Cl2Co sobre el mismo parámetro y en los mismos modelos experimentales. Valores promedio y ES de 7 animales/grupo
Ordenada = %Fe59

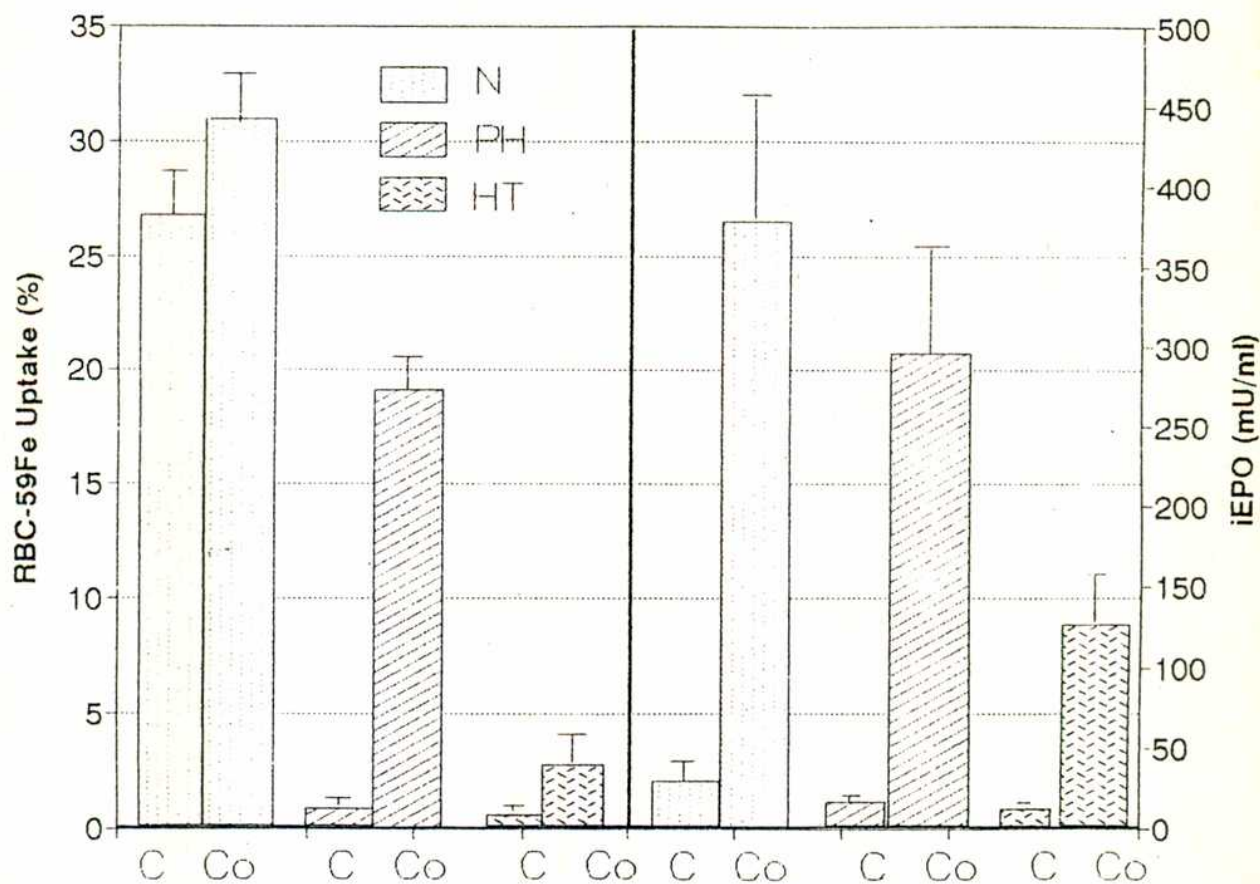


FIGURA 17 :Parte izquierda = Respuesta eritropoyética, medida como %Fe59, a la inyección de 8 μ moles de Cl_2Co en ratones normocitémicos (N) y policitémicos post-hipóxicos (PH) e hipertransfundidos (HT). Parte derecha = Concentración plasmática de eritropoyetina inmunoreactiva (iEPO) en grupos de animales similares 12 h después de la administración de la droga. C = ratones inyectados con solución fisiológica, Co = ratones inyectados con Cl_2Co . Valores promedio y ES de 10 animales/grupo. Ordenada izquierda = %Fe59; ordenada derecha = concentración plasmática de EPO (mU/ml)

dos días después de efectuada la primera inyección de PHZ. El hematocrito alcanzó su valor pre-tratamiento al finalizar la tercera semana del mismo. El recuento de reticulocitos en los animales tratados con PHZ mostró valores elevados durante todo el período de tratamiento.

La Figura 18 muestra que los ratones policitémicos sometidos previamente a un estado hemolítico durante 6 semanas respondieron al estímulo hipóxico incrementando el $\%R_{59}$ en forma significativamente mayor que ratones policitémicos sin estado hemolítico previo.

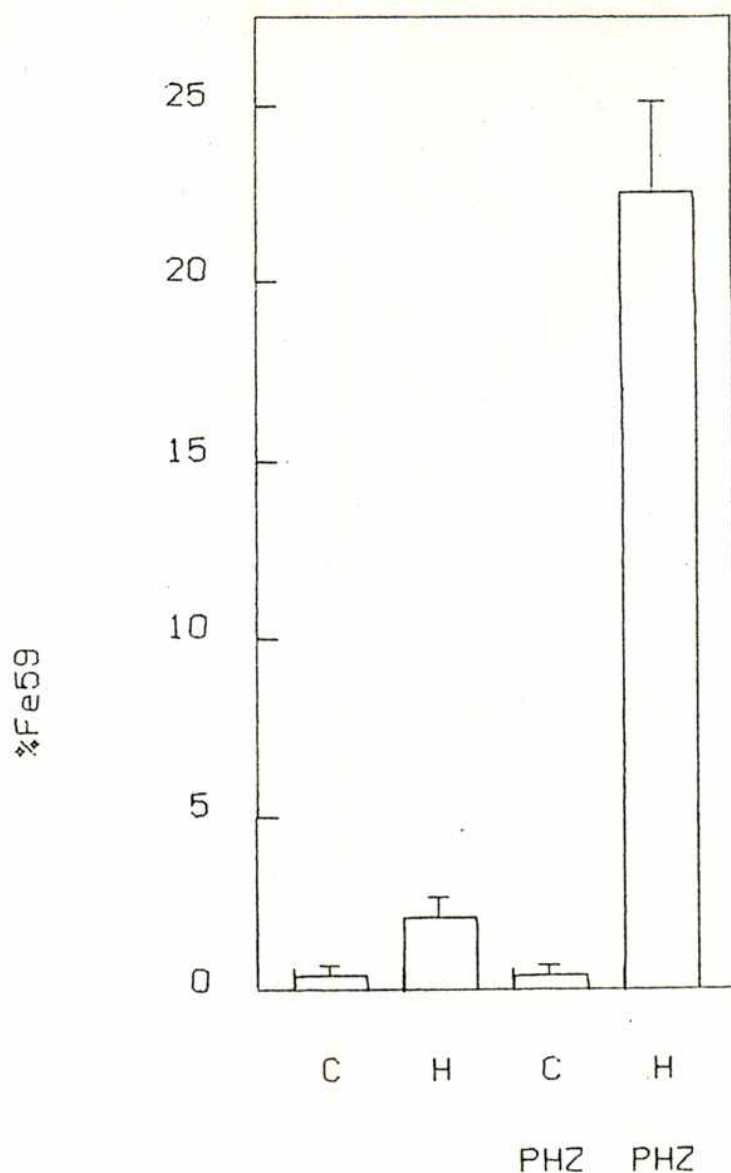


FIGURA 18: Respuesta eritropoyética en términos de %Fe59 en ratones policitémicos hipertransfundidos expuestos a hipoxia hipobárica durante 24 h. C = controles no expuestos, H = expuestos. PHZ = animales que fueron inyectados semanalmente con fenilhidrazina durante 6 semanas con el objeto de inducir un estado hemolítico compensado previamente a la hipertransfusión. La exposición de todos los grupos a hipobaría fue realizada 4 días después de efectuada la segunda transfusión. Valores promedio y ES de 10 animales por grupo

DISCUSION

La hipoxia tisular constituye el eje alrededor del cual se ubica el mecanismo de retroalimentación que opera controlando la producción de eritrocitos y adaptando el volumen de la masa roja circulante a la necesidad tisular de oxígeno (Figura 3). La importancia homeostática de este mecanismo en la corrección de la hipoxia anémica es evidente. Sin embargo, esa importancia ha sido cuestionada para la corrección de la hipoxia hipóxica. lo que ha llevado a considerar como inadecuada a esa respuesta (103, 104). Eaton, en un interesante artículo titulado "Low altitude hominids at high altitudes" (105), ha sugerido que la Naturaleza ha diseñado este mecanismo de control para contribuir a la supervivencia de los homínidos habitantes de las sabanas africanas, contribuyendo a la corrección de la hipoxia causada por las hemorragias producto de accidentes o peleas. Sin embargo, la Naturaleza no habría tenido en cuenta los efectos de la hipoxia hipóxica causada por la disminución de la presión atmosférica y experimentada por los homínidos que migraron hacia las alturas del Tibet o Los Andes. En éstos, como en los pacientes de enfermedades cardiopulmonares, la operación del mecanismo de control de la eritropoyesis induce el desarrollo de policitemia, con el consiguiente incremento de la viscosidad sanguínea. Este constituiría un efecto que causa detrimento del transporte de oxígeno e incrementa, más que corrige, la hipoxia tisular.

Cuando un humano o animal de experimentación son expuestos a la altura, el stress fisiológico por ella evocado es semejante al causado por la anemia. El contenido de oxígeno de la sangre desciende, como ocurre en la anemia, y las respuestas (particularmente aumento de la eritropoyesis y disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno) son las mismas que las experimentadas por individuos anémicos a baja altura. Estos ajustes homeostáticos están destinados a la corrección parcial de la capacidad disminuida del transporte de oxígeno. Durante un lapso breve, la disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno probablemente funciona para incrementar la cantidad de oxígeno liberado por la oxihemoglobina para una pO_2 tisular dada (106). El incremento de la eritropoyesis eventualmente corregirá el déficit del transporte de oxígeno al normalizar la masa roja circulante. Por lo tanto, el resultado neto de estas respuestas homeostáticas es la corrección de la oferta deficiente de oxígeno.

Sin embargo, cuando estas mismas respuestas operan en la altura, pueden ser contraproducentes. Podría ocurrir que el incremento de la masa roja circulante tuviera una utilidad mínima pese a incrementar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. Esto así sería porque a niveles de hematocrito por encima del valor 50-55 %, el beneficio del incremento de la capacidad de transporte de oxígeno sería anulado por el incremento de la viscosidad sanguínea. Por lo tanto, a partir de un valor dado, el incremento del hematocrito sería deletéreo para el

transporte de oxígeno (107). En efecto, la actividad eritropoyética excesiva y la consiguiente eritrocitosis pueden causar los síntomas de la enfermedad de Monge o Mal de Montaña Crónico (108). De manera similar, el hematocrito aumentado podría también explicar la descompensación gradual experimentada por los escaladores de montañas por encima de los 5000-6000 m (109).

La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno disminuye en los nativos de o en los recién llegados a la altura. Esto, como ha sido ya señalado, ocurre probablemente porque la hipoxia de altura se asemeja a la causada por anemia a baja altura. Este descenso ha sido interpretado como una respuesta adaptativa que permite una mayor oferta de oxígeno a los tejidos. Sin embargo, el problema primario en la altura no es la liberación de oxígeno por la hemoglobina sino la toma del gas por el pigmento respiratorio en un ambiente con pO_2 disminuida. Podría pensarse que la disminución de la afinidad que ocurre es contraproducente en estas condiciones. Aun a alturas moderadas (3000 m) ella contribuiría algo a la desaturación de la sangre arterial. Esta desventaja del descenso de la afinidad se apoya en observaciones efectuadas en humanos con hemoglobinas anormales caracterizadas por su alta afinidad. Tales individuos no son afectados por alturas moderadas (110) y los animales en los que la afinidad por el oxígeno es artificialmente aumentada muestran mayor sobrevida en la altura extrema (111, 112). Por lo tanto, por lo menos dos de las respuestas que los humanos (y los animales no adaptados a la altura) experimentan frente a la hipoxia de altura - incremento de la eritropoyesis y disminución de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno - son de escaso beneficio y posiblemente contraproducentes.

La determinación directa de la viscosidad ha brindado evidencias experimentales en apoyo de este comentario. Además, si la oferta de oxígeno a los tejidos es calculada como el producto del flujo por la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, puede observarse que la oferta del gas disminuye rápidamente cuando el hematocrito sobrepasa el valor 50 % (107). Observaciones sobre el flujo sanguíneo cerebral (113) han también indicado que el aporte de oxígeno al cerebro disminuye moderadamente a valores de hematocrito superiores a 45 %, lo que da un nivel de seguridad estrecho o inexistente, considerando que el hematocrito normal en el hombre muestra un rango de 40-52 %.

Sin embargo, el problema no parece claro. Si la policitemia de altura fuera totalmente inapropiada causaría más hipoxia debido al incremento de la viscosidad asociado, lo que induciría un círculo vicioso de incremento de la secreción de EPO, aumento de la eritropoyesis, elevación de la viscosidad e incremento de la hipoxia tisular hasta que los individuos sucumbieran por enfermedad de Monge. Esto, en la mayoría de los individuos, no ocurre. La policitemia de altura es una condición estacionaria, que puede durar toda la vida, más que un proceso progresivo. Por lo tanto, debería admitirse que, dentro de un amplio rango de hematocrito, el

servomecanismo que controla la eritropoyesis pareciera estabilizar el tamaño de la masa roja circulante, manteniendo aparentemente una pO_2 tisular constante y a un nivel funcional.

Además, se ha demostrado que la hipertransfusión incrementa la pO_2 tisular en "bolsillos de gas" subcutáneos e intraperitoneales (114), indicando que la eritrocitosis incrementa el transporte de oxígeno a los tejidos. Este incremento, sin embargo, presenta un máximo, por lo que la eritrocitosis inducida sobre un cierto nivel ocasiona disminución de la pO_2 en los bolsillos citados.

Se ha demostrado experimentalmente que un incremento isovolumétrico del hematocrito no incrementa la pO_2 en los bolsillos de gas subcutáneos, pero sí lo hace un incremento hipervolémico (114). Pareciera que el flujo de oxígeno está estrechamente correlacionado con la hipervolemia y que existe un desplazamiento de los valores

óptimos para el flujo de oxígeno hacia mayores valores de hematocrito a mayores valores de volemia. Pese a la ausencia de incremento de la pO_2 tisular en respuesta a aumento isovolémico del hematocrito, estudios efectuados en nuestro laboratorio han demostrado una disminución de la producción de EPO durante exposición a hipoxia hipobárica en ratas con policitemia hipovolémica (115), lo que sugiere otro tipo de control de la secreción hormonal independiente de la pO_2 tisular. Lo mismo ha sido observado en ratas con policitemia inducida por eritrocitos incapaces de transportar oxígeno (116).

De lo expuesto surge que la policitemia hipervolémica moderada (hematocrito = 50-55 %) incrementa la pO_2 tisular, mientras que niveles superiores causan aparente hipoxia tisular. A pesar de ésta, a niveles extremos de eritrocitosis, ratones con valores de hematocrito entre 65 y 75 % muestran una supresión de la eritropoyesis similar o aún mayor que ratones con hematocrito entre 55 y 60 %. Esta supresión de la eritropoyesis mediante un mecanismo aparentemente "todo o nada" por encima de un valor hematocrito superior a 53 % sugiere la existencia de una influencia del mismo sobre el mecanismo de control de la secreción de EPO, aparentemente oxígeno-independiente. Este mecanismo, sin embargo, no ha sido todavía explorado en profundidad, por lo que la teoría oferta/demanda de oxígeno aparece como la mejor conocida para explicar el control de la secreción de EPO.

En el estudio presente, el estado de hipervolemia policitémica ha sido inducido mediante dos mecanismos totalmente diferentes, dando lugar a la obtención de los dos modelos de ratones utilizados, el "hipertransfundido" (HT) y el "post-hipóxico" (PH).

En el ratón HT, la hipervolemia policitémica se logró mediante dos transfusiones sucesivas de una suspensión de eritrocitos homólogos en solución fisiológica. Por lo tanto, la masa roja circulante fue artificialmente incrementada mediante el aporte de eritrocitos "exógenos". En el ratón PH, por el contrario, la hipervolemia policitémica fue inducida mediante estimulación crónica

del mecanismo secretor de EPO por hipoxia de altura (simulada). En este caso, por lo tanto, la masa roja circulante fue incrementada mediante un mecanismo fisiológico que se tradujo en el aporte de eritrocitos "endógenos".

Fese al distinto origen de los eritrocitos responsables del estado policitémico, se observó disminución de la eritropoyesis (medida como %Fe59) en ambos modelos experimentales en función del tiempo post-transfusión (ratones HT) o post-hipoxia (ratones PH) (Figura 4). La supresión de la eritropoyesis fue comparable en ambos grupos a partir del 4o. día experimental. Otros estudios han demostrado que tal estado de supresión de la eritropoyesis se extiende, por lo menos, hasta el día 10o. (99). Los resultados obtenidos en el experimento no. 2 muestran que la principal causa de la supresión de la eritropoyesis citada sería la disminución de la producción de EPO, revelada en este caso por una disminución de la concentración de la hormona circulante. Los valores de EPO plasmática mostrados son coincidentes con los obtenidos por Moccia y col. en otra cepa de ratones hipertransfundidos (117). Es de destacar la falta de supuesta correlación entre el grado de supresión de la eritropoyesis, que puede ser completa cuando el valor hematocrito es elevado, y el de la producción de EPO, cuyo nivel plasmático en los ratones policitémicos muestra una disminución de aproximadamente un 60 % en relación con el valor correspondiente a animales controles normocitémicos. Este aparentemente diferente grado de supresión no puede ser explicado satisfactoriamente. Podría existir una tasa "constitucional" de secreción de EPO, cuyo nivel plasmático sería así mantenido en niveles subnormales, que no serían suficientes para iniciar el proceso de la eritropoyesis. En este caso, existiría un nivel "umbral" de concentración hormonal en plasma para iniciar la producción de eritrocitos. Sin embargo, no existe prueba alguna para explicar esta observación, por lo que la explicación sugerida es sólo especulativa y considerada como futura hipótesis de trabajo.

Del análisis de los resultados presentados en la Figura 5, que muestra el efecto del grado de policitemia sobre la respuesta eritropoyética a la exposición a hipoxia hipobárica en ratones HT y PH, surgen dos observaciones de enorme importancia: 1) la respuesta de ratones HT a períodos crecientes de hipoxia está inversamente relacionada con el grado de policitemia alcanzado por los animales en respuesta al volumen de eritrocitos transfundido, y 2) ratones HT y PH con grados comparables de policitemia difieren marcadamente en sus respuestas eritropoyéticas a la hipoxia hipobárica, siendo la respuesta en los últimos significativamente mayor que en los primeros.

La primera observación podría ser explicada de acuerdo con la observación original de Fried y col. (118) que sugiere que la producción de EPO está regulada por la pO₂ titular. En los ratones HT, el incremento de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, en relación con el volumen de eritrocitos transfundido,

podría moderar el grado de hipoxia tisular causado por la exposición a hipobaría. Por lo tanto, podría esperarse que la producción de EPO y la respuesta eritropoyética estuvieran relacionadas negativamente con el estado policitémico de los animales.

La significativamente mayor respuesta eritropoyética observada en los ratones PH en relación con los HT durante la exposición a hipobaría, ambos con niveles similares de policitemia, podría teóricamente ser el resultado de un aumento de la respuesta eritroide a EPO endógena o a una mayor producción de la misma en los ratones PH.

La respuesta a EPO fue determinada en ratones HT y PH 4 días después de la segunda transfusión o de la terminación del período de condicionamiento hipóxico (Figura 6). El estado policitémico fue de magnitud similar en ambos tipos de animales. Además, el grado de supresión eritropoyética en el momento de la inyección de EPO, a juzgar por el %Fe59 en los controles inyectados con solución fisiológica, no fue significativamente diferente entre ratones PH y HT, lo que sugiere que las concentraciones de EPO endógena eran similares en ambos modelos. La inyección de EPO exógena permitió la inducción de niveles de EPO similares sobre un amplio rango de concentraciones. En cada nivel inducido, el %Fe59 en los ratones PH fue casi idéntico con el correspondiente a los HT. Si valores similares de %Fe59 pueden ser interpretados como respuestas eritropoyéticas también similares, es posible postular que en las dosis de EPO usadas en este experimento las respuestas eritropoyéticas de ratones HT y PH a la hormona fueron similares.

La actividad eritropoyética presente en el plasma de ratones PH y HT con grados similares de policitemia en respuesta a la exposición a hipoxia hipobárica mostró una marcada diferencia entre ambos tipos de animales policitémicos, siendo el nivel de EPO encontrado superior a 200 mU/ml en los ratones PH y no detectable (< 50 mU/ml) en los HT (Figura 7).

Estos resultados brindan evidencia de que los ratones HT no responden a la hipoxia hipobárica cuando la policitemia es lo suficientemente intensa, mientras que los ratones PH, con un grado de policitemia similar, responden a ella en forma casi semejante a la observada en ratones normocitémicos. El hallazgo de niveles elevados de EPO en el plasma de los ratones PH en respuesta a hipoxia hipobárica y su ausencia en los ratones HT sugiere que el incremento de la producción de EPO es la causa de la mayor respuesta eritropoyética observada en los ratones PH que en los HT.

Esta sugerencia requiere una explicación. La concentración de EPO en plasma, como la de cualquier otra hormona, depende del balance entre las tasas de ingreso al y egreso del compartimiento plasmático. La extrapolación de los datos de concentración plasmática a la tasa de secreción hormonal se basó en los siguientes hallazgos: 1) resultados obtenidos en nuestro laboratorio en 1966 (130) han demostrado que la sobrevida de EPO exógena en el compartimiento plasmático de perros es independiente de la

actividad eritropoyética de la médula ósea. resultados confirmados y ampliados recientemente por Piroso y col. (119); y 2) se ha observado una excelente correlación entre la concentración de EPO en el plasma de ratones anémicos y la concentración de células sintetizadoras de EPO en el mismo órgano. Por lo tanto, la supendencia de que una concentración plasmática de EPO elevada signifique producción aumentada de la hormona tiene un sólido apoyo experimental.

La o las razones que determinan mayor producción de EPO en respuesta a hipoxia hipobárica en los ratones PH que en los HT no son evidentes. Ambos presentan el mismo nivel de policitemia, muestran idéntica $p50$ (120) y el mismo grado de supresión de la eritropoyesis en el momento en que son sometidos al estímulo hipóxico. Además, y como resultado de las tres semanas de exposición previa a hipobaría, el ratón PH ha desarrollado otros mecanismos compensatorios a la hipoxia que obviamente no posee el ratón HT, como son ajustes hemodinámicos y respiratorios (121) y modificaciones metabólicas a nivel tisular (122). Estos mecanismos de compensación desarrollados deberían determinar que el ratón PH fuera "menos hipóxico" que el ratón HT (que sólo posee policitemia como supuesto mecanismo de aclimatización) cuando ambos son sometidos al estímulo hipóxico. En este caso, y si no existieran otras razones, el ratón HT debería producir más EPO que el ratón PH por experimentar mayor grado de hipoxia. Que las cosas ocurran realmente en forma opuesta constituye un hecho conflictivo. Cuál es la causa que determina que la policitemia sea capaz de anular la secreción de EPO cuando es inducida por transfusión de eritrocitos "exógenos" y que sea total o parcialmente ineficaz cuando es inducida por formación de eritrocitos "endógenos"?

La diferencia probablemente radica en la forma de inducción de la policitemia. La policitemia por transfusión suprime la formación de EPO endógena y la eritropoyesis mediante la inyección de eritrocitos exógenos. La policitemia a través de la exposición discontinua a hipobaría ocurre a través de un mecanismo totalmente opuesto. Los ratones son estimulados para incrementar la producción de eritrocitos endógenos en respuesta a niveles aumentados de EPO endógena, que ocurren como resultado de la exposición a hipobaría. Cuando estos animales concluyen su periodo de exposición y son retornados a pO_2 atmosférica normal, la eritropoyesis se detiene hasta que la masa roja circulante disminuya hasta alcanzar un nivel compatible con pO_2 normal. Por lo tanto, la transfusión resulta en supresión de la eritropoyesis, mientras que la hipoxia causa primero una estimulación eritropoyética seguida por una supresión al término de la exposición a hipobaría. Este periodo de hipersecreción de EPO podría determinar un incremento de la sensibilidad del sistema operativo que conduce a la síntesis y secreción de EPO, lo que explicaría la mayor formación de EPO en los ratones PH que en los HT.

Por lo expuesto, en cuanto al desarrollo de la policitemia se refiere, es obvio que los ratones PH y HT difieren en por lo menos dos características en el momento

en que son expuestos a hipobaría durante el cuarto día post-hipoxia o post-transfusión: 1) los ratones PH han sido policitémicos durante un tiempo más prolongado que los ratones HT. Si bien el desarrollo de la policitemia durante la exposición a hipobaría es gradual, al cabo de una semana los animales muestran ya un hematocrito superior a 55 %. Suponiendo que el estado policitémico se iniciara en ese momento (fin de la primera semana de condicionamiento hipóxico) y considerando que el período de condicionamiento hipóxico dura tres semanas y que el estímulo hipóxico es aplicado cuatro días después de finalizado, se podría concluir que la duración de la policitemia en los ratones PH es de, por lo menos 19 días. En los ratones HT, en cambio, la policitemia se inicia horas después de la primera transfusión, lo que sugiere que duración de la misma será de aproximadamente 6 días; y 2) los ratones PH han sido expuestos a una marcada estimulación de la eritropoyesis en respuesta a la hipersecreción de EPO durante las tres semanas de exposición a hipobaría, cosa que no ha ocurrido en los ratones HT. Una o ambas diferencias entre ambos modelos podría ser responsable de la diferente producción de EPO observada en ellos durante la estimulación hipóxica.

Los resultados obtenidos en el experimento no. 6 y presentados en la Figura 10 indican que la duración del estado policitémico no explica el fenómeno en estudio, dado que los ratones HT "agudos" y "crónicos" responden a la exposición a hipobaría con similares y muy pequeños aumentos de la eritropoyesis. Por el contrario, ratones HT crónicos, mantenidos bajo el mismo régimen de condicionamiento hipóxico que los ratones PH, responden a la re-exposición a hipobaría elevando la eritropoyesis hasta un nivel comparable con el de los ratones PH a pesar de presentar mayor grado de policitemia que éstos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la exposición previa a hipobaría es la diferencia entre los ratones PH y HT que determina mayor producción de EPO en los primeros cuando son expuestos a hipobaría. El progresivo aumento de la respuesta eritropoética en respuesta al estímulo hipóxico observado en ratones HT previamente expuestos a hipoxia hipobárica entre 6 y 30 horas (Figura 11) apoya esta sugerencia.

Varias drogas y hormonas poseen la propiedad de estimular la eritropoyesis en varios modelos experimentales. Entre ellas, glucocorticoides (123, 124), andrógenos (125, 126) y un agonista beta-adrenérgico (127) estimulan la producción de eritrocitos en forma indirecta, incrementando la producción de EPO. Por lo tanto, si la hipótesis desarrollada en la presente discusión que supone que la exposición a hipoxia hipobárica modifica el sistema de control de la secreción de EPO es válida, la respuesta eritropoética de ratones PH a aquellos estímulos eritropoéticos debería ser superior a la observada en ratones HT.

En el estudio efectuado (Experimento no. 8) se observó que las respuestas de ratones HT y PH a 700 mU de EPO (en la forma de "plasma anémico") eran similares. Estos resultados sugieren que el tamaño del compartimento de

células progenitoras eritrocíticas EPO-sensibles era similar en ambos tipos de animales policitémicos. Por lo tanto, fue posible considerar como válido que la respuesta a EPO endógena sería también similar. Como en experimentos previos ya citados se había demostrado la existencia de correlación entre el contenido de EPO en plasma y el nivel de ^{59}Fe , fue posible considerar como válido que la respuesta eritropoética estaba relacionada con la producción de EPO.

En el presente estudio, se observó diferencia significativa entre las respuestas de ratones PH y HT a la inyección de testosterona, dexametasona e isoproterenol, el ^{59}Fe siendo siempre muy superior en los ratones PH que en los HT, lo que sugiere mayor producción de EPO en los primeros que en los últimos.

Los resultados sugieren nuevamente que los ratones PH han sido condicionados por la exposición a hipobaría en una forma tal que los hace más sensibles a por lo menos algunos tipos de estímulos eritropoéticos. Como los estímulos utilizados incrementan la producción de EPO endógena, la sensibilidad incrementada debe ocurrir a nivel del mecanismo que regula la síntesis y/o secreción de la hormona.

EPO es sintetizada en células endocrinas renales y extra-renales. Uno o ambos tipos celulares podrían haber sido condicionados por la exposición a hipobaría y volverse más sensibles a la acción de estímulos eritropoéticos conocidos por su capacidad de incrementar la producción de la hormona. El estudio siguiente, por lo tanto, fue realizado con el objeto de determinar si la exposición a hipoxia hipobárica sensibiliza a uno o a ambos sitios de producción de EPO. La producción de EPO renal fue investigada midiendo los niveles hormonales en extractos de tejido renal. La producción extra-renal fue estudiada midiendo la concentración de EPO en plasma de animales nefrectomizados luego de la exposición al estímulo hipóxico.

Como se utilizaron ratas como animales experimentales, fue necesario conocer primero si el fenómeno observado en ratones era extrapolable a la rata. Los resultados mostrados en la Figura 13 indican que la respuesta al estímulo hipóxico fue 6 veces superior en ratas PH que en ratas HT, extendiéndose así la observación hecha en ratones a ratas.

Considerando que EPO es sintetizada de novo frente al estímulo hipóxico (129) y que la concentración renal de EPO alcanza un máximo entre 6 y 7 horas después de su iniciación (129), puede inferirse que la determinación de la concentración de EPO en homogenatos renales 6 horas post-iniciación del estímulo hipóxico constituye una medida real de la magnitud de síntesis de la hormona. Cuando ratas PH y HT, así como ratas normocitémicas, fueron expuestas durante 6 horas a 456 mb, dos observaciones deben destacarse: 1) la concentración de EPO en homogenatos renales de ratas PH fue significativamente mayor que la observada en homogenatos renales de ratas HT.

ambas mostrando el mismo nivel de policitemia, y 2) la concentración de EPO en homogenatos renales de ratas PH fue aún mayor que el correspondiente de ratas normocitémicas. Estos resultados sugieren sensibilización por hipoxia hipobárica del mecanismo renal involucrado en la secreción de EPO.

Por el contrario, los niveles plasmáticos de EPO en ratas PH y HT nefrectomizadas expuestas durante 8 horas al estímulo hipóxico no mostraron diferencia significativa, hecho que sugiere que el mecanismo extra-renal de producción de EPO no fue condicionado como el renal por la exposición a hipobaría.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que la exposición a hipoxia hipobárica induce sensibilización del mecanismo renal, aunque no del extra-renal, involucrado en la síntesis y/o secreción de EPO.

La exposición a hipoxia hipobárica induce secreción aumentada de EPO, responsable del desarrollo de policitemia. La administración crónica de PHZ, droga hemolítica, permitió incrementar la secreción de EPO con el objeto de mantener el volumen de la masa roja circulante dentro de límites aproximadamente normales a pesar de la disminución de tiempo de vida eritrocitaria. Cuando ratones mantenidos durante 6 semanas en estado hemolítico fueron hipertransfundidos para convertirlos en policitémicos y, cuatro días después expuestos al estímulo hipóxico, la respuesta eritropoética fue significativamente mayor que la observada en ratones hipertransfundidos no sometidos previamente al estado hemolítico. Estos resultados demostraron claramente que la mayor secreción observada en el ratón PH en relación al HI está relacionada con el periodo de condicionamiento hipóxico a través de la hipersecreción de EPO que ocurre durante el mismo, con el incremento sostenido de la eritropoyesis, y/o con la hipoxia per se.

Habiendo establecido la hipersensibilidad del mecanismo secretor de EPO al estímulo hipóxico en el ratón PH, fue importante establecer si esa hipersensibilidad se manifestaba frente a otro tipo de estímulo. El cobalto (Co) constituye un bien estudiado estimulante de la eritropoyesis (131, 132). Aunque su mecanismo de acción a nivel celular no ha sido precisado con exactitud, se ha demostrado que Co incrementa el EPO-mRNA a nivel renal (48) y la concentración plasmática de EPO (133).

Los experimentos realizados en el presente estudio demostraron que la producción de EPO es similar en ratones normocitémicos y policitémicos PH, siendo ambos valores significativamente mayores que los observados en ratones HI, cuando los animales fueron inyectados con 4 y 8 μ moles de cloruro de cobalto hexahidratado.

Kunst y col. (134) observaron que los niveles séricos de EPO 12 horas después de la administración de Co en ratones normales era similar a los observados en ratones policitémicos que habían sido previamente expuestos durante 15 días a hipoxia normobárica. Estos resultados,

que concuerdan perfectamente con los nuestros en relación con ratones normocitémicos y PH, llevaron a esos autores a sugerir que el Co. contrariamente a la hipoxia, podría actuar sobre un sitio distal al mecanismo que monitorea la pO_2 renal, considerando que el efecto del Co no fue inhibido por el incremento de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. Nuestros hallazgos que señalan que el aumento de la capacidad transportadora de oxígeno de la sangre, cuando es inducida mediante hipertransfusión en vez de exposición crónica a hipobaría, efectivamente deprime la producción de EPO en respuesta a Co, hacen que aquella sugerencia sea inválida. Los mismos también sugieren que hipoxia y Co probablemente estimulen la secreción de EPO a través de un mecanismo, por lo menos parcialmente, común.

El hallazgo de hiposecreción de EPO en respuesta a Co en ratones policitémicos cuando la policitemia es inducida mediante transfusión pero no cuando es inducida por exposición a hipobaría es tan conflictivo como la diferencia observada al estímulo hipóxico. No puede ser fácilmente explicada sobre la base de dos recientes propuestas sobre el mecanismo de acción de Co, como el bloqueo del influjo de calcio en las células productoras de EPO (134) o la transformación de una proteína hémica que posiblemente actuara como sensor de oxígeno en su forma activa (135).

Ha sido demostrado previamente que la exposición a hipobaría, la anemia o la administración de Co inducen un incremento significativo de la concentración renal de EPO-mRNA, así como reclutamiento de células productoras de EPO (138). De acuerdo con esto, mayor número de células productoras de EPO a nivel renal debería haber sido reclutado en ratones PH que en ratones HT en respuesta a una dosis similar de Co o a la exposición a un estímulo hipóxico de igual intensidad, por lo que la producción de EPO debería también haber sido mayor en los primeros que en los segundos. Los resultados presentados en el presente estudio demuestran que, efectivamente, los ratones PH secretan mayor cantidad de EPO que los ratones HT frente a estímulos iguales. Mayor información, que indudablemente aparecerá en el futuro inmediato, sobre los mecanismos de monitoreo de la pO_2 renal y la subsiguiente transcripción genética y modulación de la síntesis y secreción de EPO, es necesaria para explicar la naturaleza del efecto condicionante de la hipoxia hipóxica o anémica que hace que un animal se vuelva hipersensible a estímulos que inducen secreción de EPO.

Hasta que ese momento llegue, queda descrito un fenómeno de enorme interés e importancia que está en oposición aparente con algunos principios aceptados. Su explicación tal vez permita conocer los mecanismos que conducen a policitemia excesiva frente a desaturación intermitente de la hemoglobina y a los que inducen la aparición del Mal de Montaña Crónico o enfermedad de Monge.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de los distintos experimentos que integran el presente trabajo indican o sugieren que:

1) La policitemia endógena, inducida en ratones por exposición intermitente (18 h/día) y crónica (3 semanas) a hipobaría, y la policitemia exógena, inducida por administración de una suspensión de eritrocitos homólogos al 80 %, producen un descenso progresivo de la eritropoyesis (medida como incorporación de Fe^{59} al eritrón), la que alcanza su mínimo valor a partir del cuarto día desde la finalización del período de exposición a hipobaría o de la segunda transfusión. La depresión de la eritropoyesis observada, similar para ambos modelos policitémicos, es causada principalmente por hiposecreción de eritropoietina.

2) La respuesta eritropoyética de ratones HT con policitemia exógena a períodos crecientes de exposición a hipobaría está inversamente relacionada con el valor hematocrito, que representa el grado de policitemia alcanzado por los animales en respuesta al distinto volumen de suspensión de eritrocitos inyectado.

3) La respuesta eritropoyética de ratones PH con policitemia endógena de igual grado que la presente en ratones HT con policitemia exógena es significativamente mayor en los primeros que en los segundos.

4) Considerando que las respuestas de ambos modelos policitémicos a EPO exógena son similares y que la concentración de EPO en plasma en respuesta al estímulo hipóxico es significativamente mayor en los ratones PH con policitemia endógena que en los HT con policitemia exógena, se concluye que la mayor respuesta eritropoyética al estímulo hipóxico observada en los primeros es el resultado de una mayor tasa de secreción de EPO.

5) Ratones HT con policitemia exógena expuestos a hipobaría durante tres semanas, en un régimen idéntico al seguido por los ratones PH con policitemia endógena, reaccionan al estímulo hipóxico posterior en forma similar a estos últimos. Este hallazgo significa que la exposición a hipobaría transforma a un ratón HT en otro PH, no importa el grado de policitemia alcanzado, lo que podría interpretarse como si la exposición a hipobaría modificara la sensibilidad del mecanismo secretor de EPO, que se haría más sensible al estímulo hipóxico. El umbral del fenómeno se ubica alrededor de las 30 horas de exposición.

6) La sensibilización del mecanismo secretor de EPO por exposición a hipobaría se manifiesta al observarse una mayor respuesta eritropoyética en los ratones PH con policitemia endógena que en los HT con policitemia exógena a la administración de dexametasona, testosterona e isoproterenol, agentes capaces de estimular la eritropoyesis mediante inducción de secreción de EPO endógena.

7) La sensibilización por exposición a hipobaria del mecanismo secretor de EPO se manifiesta a nivel del mecanismo renal y no del extra-renal de producción de la hormona.

8) La sensibilización por exposición a hipobaria del mecanismo secretor de EPO no sólo se manifiesta frente al estímulo hipóxico sino que también lo hace frente a sales de cobalto, que poseen la capacidad de estimularlo.

9) La sensibilización del mecanismo secretor de EPO ocurre no sólo en respuesta a hipoxia hipobárica, sino que también se desarrolla en respuesta a hipoxia anémica.

10) Los resultados obtenidos sugieren que la hipoxia sostenida es capaz de condicionar al mecanismo secretor de EPO de manera tal que reaccionará con mayor secreción hormonal frente a un nuevo estímulo eficaz. Tal condicionamiento, teóricamente, podría efectuarse sobre el hipotético sensor de oxígeno renal, sobre la relación entre el sensor de oxígeno y el proceso de transcripción que induce acumulación de EPO-mRNA o mediante modificaciones del reclutamiento de células sintetizadoras de EPO. El avance incesante del conocimiento permitirá, sin lugar a dudas, que resultados de futuros estudios arrojen luz sobre la naturaleza del fenómeno descrito en el presente trabajo.

11) La sensibilización del sistema secretor de EPO que se observa en el ratón FH determina que su especificidad como animal de bioensayo de EPO sea menor que la presente en el ratón HT, por lo que este último deberá ser considerado a partir de ahora como el animal de elección para ese procedimiento. Se sugiere, además, que el ratón HT sea utilizado para la valoración de la actividad eritropoyética de líquidos, como el plasma, que pueden contener sustancias que induzcan secreción de EPO por el animal inyectado. Sin embargo, el ratón FH, lo mismo que el HT, conserva su utilidad como animal de bioensayo de muestras de EPO recombinante para determinar la actividad biológica del producto final y/o monitorear los diversos pasos de su purificación.

H. Hoffmann

[Signature]

BIBLIOGRAFIA

1. Bozzini CE (1988) Fisiología del eritrón. en Fisiología Humana. HE Cingolani v AB Houssay. Eds. El Ateneo. Buenos Aires, p. II-11
2. Bozzini CE. Barrio Rendo ME, Devoto FCH. Epper CE (1970) Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse. Am J Physiol 219: 724
3. Bozzini CE. Barrio Rendo ME (1967) Mecanismo mediante el cual la eritropoyetina aumenta la producción de eritrocitos en la rata. Acta I Congreso Latinoamericano de Biología y Medicina Nuclear, p. 74
4. Gurney CP. Fan C (1958) Studies on erythropoiesis IX. The mechanism of decreased erythropoiesis in experimental polycythemia. Proc Soc Exp Biol Med 98: 789.
5. Krantz SB, Goldwasser E (1984) Specific binding of erythropoietin to spleen cells infected with the anemia strain of Friend virus. Proc Natl Acad Sci USA 81: 7574
6. Reissmann KR (1950) Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. Blood 5: 372
7. Erslev AJ (1953) Humoral regulation of red cell production. Blood 8: 349
8. Fried W. Plzak LF, Jacobson LD, Goldwasser E (1957) Studies on erythropoiesis. III. Factors controlling erythropoietin production. Proc Soc Exp Biol Med 94: 237
9. Browne JK. Cohen AM, Egrie JC, Lai PH, Lin FK, Strickland I, Watson E, Stebbing N (1986) Erythropoietin, gene cloning, protein structure and biological properties. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 51: 693
10. Borsook HA, Gravhiel A, Keighlev G et al (1954) Polycythemic response in normal adult rats to a non-protein plasma extract from anemic rabbits. Blood 9: 734
11. Plzak LF, Fried W, Jacobson LD (1955) Demonstration of stimulation of erythropoiesis by plasma from anemic rats using Fe59. J Lab Clin Med 46: 671
12. Graber SE, Krantz SB (1978) Erythropoietin and the control of red cell production. Ann Rev Med 29: 51
13. Suivak JL (1986) The mechanism of action of erythropoietin. Int J Cell Cloning 4: 139
14. Jacobs K. Shoemaker C, Rudersdorf R (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 313: 806
15. Lin FK, Suggs S, Lin CH (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7580

16. Goldwasser E, Kung CKH (1971) Purification of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci USA 68: 697
17. Espada E, Gutnisky A (1970) A new method for concentration of erythropoietin from human urine. Biochem Med 3: 475
18. Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. J Biol Chem 252: 5558
19. Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E (1985) The role of carbohydrate on erythropoietin action. Endocrinology 116: 2293
20. Goldwasser E (1975) Erythropoietin and the differentiation of red blood cells. Fed Proc 34: 2285
21. Goldwasser E, Kung CKH, Eliason J (1974) On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action. J Biol Chem 249: 4202
22. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW (1986) Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6465
23. Lai PH, Everett R, Wang FF (1986) Structural characterization of human erythropoietin. J Biol Chem 261: 3116
24. Rechy MA, Scoble HA, Kim Y (1987) Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. J Biol Chem 262: 17156
25. Sasaki H, Bothner B, Dell A (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. J Biol Chem 262: 12059
26. Kazal LA, Erslev AJ (1975) The measurement of erythropoietin. Ann Clin Lab Sci 5: 91
27. Dunn CDR, Jarvis JH, Greenman JM (1975) A quantitative bioassay for erythropoietin using mouse fetal liver cells. Exp Hematol 3: 65
28. Goldwasser E, Eliason JF, Sikkema D (1975) An assay for erythropoietin in vitro at the milliunit level. Endocrinology 97: 315
29. McLeod DL, Schreeve MM, Axelrad AA (1974) Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. Blood 44: 517
30. Krystal GA (1983) A simple microassay for erythropoietin based on 3H-thymidine incorporation into spleen cells from phenylhydrazine-treated mice. Exp hematol 11: 649

31. Cotes PM (1987) The estimation of erythropoietin (EPO): principles, problems and progress. En Rich IN (ed): Molecular and Cellular Aspects of Erythropoietin and Erythropoiesis. NATO ASI Series H: Cell Biology, vol. 8. Berlin. Springer-Verlag, p. 377
32. Sherwood JB, Goldwasser E (1979) A radioimmunoassay for erythropoietin. Blood 54: 885
33. Garcia JF, Sherwood J, Goldwasser E (1979) Radioimmunoassay of erythropoietin. Blood Cells 5: 405
34. León-Velarde F, Monge C, Vidal A, Carcagno N, Criscuolo M, Bozzini CE (1991) Serum immunoreactive erythropoietin in high altitude natives with and without excessive erythrocytosis. Exp Hematol 19: 257
35. Cotes PM, Das REG, Tam RC (1987) The use of ¹²⁵I recombinant DNA derived human erythropoietin as a replacement for ¹²⁵I human urinary erythropoietin as tracer antigen in a radioimmunoassay for human erythropoietin. En Rich IN (Ed): Molecular and Cellular Aspects of Erythropoiesis and Erythropoietin. NATO ASI Series H: Cell Biology. vol. 8, Berlin. Springer-Verlag. p. 389
36. Egnie JC, Cotes PM, Lane J (1987) Development of radioimmunoassays for human erythropoietin using recombinant erythropoietin as tracer and immunogen. J Immunol Meth 99: 235
37. Sherwood JB, Carmichael LD, Goldwasser E (1988) The heterogeneity of circulating human serum erythropoietin. Endocrinology 122: 1472
38. Eaves AC, Eaves CJ (1984) Erythropoiesis in culture. Clinics Haematol 13: 371
39. Krantz SB, Jacobson LO (1970) Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis. Chicago. University of Chicago Press. p. 11
40. Cotes PM, Bangham DR (1966) The International Reference Preparation of Erythropoietin. Bull WHO 35: 751
41. Annable L, Cotes PM, Musset NV (1972) The second International reference Preparation of Erythropoietin. human, urinary, for bioassay. Bull WHO 47: 99
42. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W (1957) Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin. Trans Assoc Am Physicians 70: 305
43. Denny WF, Flanigan WJ, Zukoski CF (1966) Serial erythropoietin studies in patients undergoing renal homotransplantation. J Lab Clin Med 67: 386
44. Kuratowska Z, Lewantowski B, Michulak E (1961) Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. Blood 18: 527

45. Burlington H, Cronkite EP, Reinle V (1972) Erythropoietin production in cultures of goat renal glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 3547
46. Zanjani ED, McLaurin WD, Gordon AS (1971) Biogenesis of erythropoietin: role of the substrate for erythropoietin. *J Lab Clin Med* 77: 757
47. Peschle C, Condorelli M (1975) Biogenesis of erythropoietin: evidence for pro-erythropoietin in a subcellular fraction of the kidney. *Science* 190: 910
48. Beru N, McDonald J, Lacombe C (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 6: 2571
49. Bondurant MC, Koury MJ (1986) Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 6: 2731
50. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J (1987) Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 70: 316
51. Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO (1959) Studies on erythropoietin. XI. Reticulocyte response of transfusion-induced polycythemic mice to anemic plasma from nephrectomized mice and to plasma from nephrectomized rats exposed to low oxygen. *Blood* 14: 635
52. Alvarez Ugarte CA, Soriano G, Giglio MJ, Bozzini CE (1976) Effect of parasympathetic denervation or duct ligation of rat submandibular gland on extrarenal erythropoietin production. *J Endocr* 70: 309
53. Naets JP, Wittek M (1968) Presence of erythropoietin in the plasma of one anephric patient. *Blood* 31: 249
54. Mirand EA, Murphy GP, Steeves RA (1968) Extrarenal production of erythropoietin in man. *Acta Haemat* 39: 359
55. Fried W (1972) The liver as a source of extrarenal erythropoietin. *Blood* 40: 671
56. Naughton BA, Kaplan SM, Roy M (1977) Hepatic regeneration and erythropoietin production in the rat. *Science* 196: 301
57. Zanjani ED, Foster J, Burlington H (1977) Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med* 89: 640
58. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806
59. Koury MJ, Bondurant MC, Graber SE (1988) Erythropoietin messenger RNA levels in developing mice and transfer of ¹²⁵I-erythropoietin by the placenta. *J Clin Invest* 82:154
60. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K (1989) Receptors for

erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 74:106

61. Giglio NJ, Hozzini CE, Barcat JA, Arrizurieta E (1986) Relationship between severity of renal damage and erythropoietin production in uranyl nitrate-induced acute renal failure. *Exp Hematol* 14: 257

62. Caro J, Erslev AJ (1984) Biologic and immunologic erythropoietin in extracts from hypoxic rat kidney and in their glomerular and tubular fractions. *J Lab Clin Med* 103: 922

63. Fisher JW, Taylor G, Porteous D (1965) Localization of erythropoietin in glomeruli of sheep kidney by fluorescent antibody technique. *Nature* 205: 611

64. Kurtz A, Jelkman W, Sinowatz F (1983) Renal mesangial cell cultures as a model for study of erythropoietin production. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4008

65. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood* 71: 524

66. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P (1988) Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest* 81: 620

67. Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988) Interstitial cells produce erythropoietin in both liver and kidneys of mice: correlation between number of erythropoietin producing cells and the degree of anemia by in situ hybridization. *Exp Hematol* 16: 541

68. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE (1989) Quantitation of erythropoietin producing cells in kidney of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA and serum erythropoietin concentration. *Blood* 74: 645

69. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC (1990) The biogenesis of erythropoietin in vivo, in Erslev AD, Adamson JW, Eschbach JW, Winemans CG (Eds.): *Erythropoietin*, Baltimore, MD, Johns Hopkins University (in press)

70. Koury ST, Thamer SL, Koury MJ, Bondurant MC (1989) Erythropoietin-producing cells are primarily found adjacent to proximal tubules in murine kidneys. *Blood* 74: 18a (abst.)

71. Eckardt KU, Kurtz A, Bauer C (1989) Regulation of erythropoietin formation is related to proximal tubular function. *Am J Physiol* 256:F942

72. Rich IN, Hert W, Kubanek B (1982) Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 60: 1007

73. Johnson CS, Marcelletti J, Furmanski P (1984) Stimulation of normal erythropoiesis in vitro by macrophages from erythroleukemic mice. *J Natl Cancer Inst*

74. Maxwell AP, Lapin TRJ, Johnston CF, Bridges JH, McGeown MG (1990) Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Brit J Haemat* 74: 535
75. Fried W, Barone Varelas J, Morley C (1984) Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 10: 287
76. Sherwood J, Goldwasser E (1978) Extraction of erythropoietin from normal kidneys. *Endocrinology* 103: 866
77. Kurtz A, Eckardt KU, Tannahill L (1988) Regulation of erythropoietin production. *Contr Nephrol* 66: 1
78. Rodgers GM, Fisher JW, George WJ (1975) Increase in hematocrit, hemoglobin and red cell mass in normal mice after treatment with cyclic AMP. *Proc Soc Exp Biol Med* 148: 380
79. Gross DM, Brookins J, Fink GD, Fisher JW (1976) Effect of PGA₂, E₂ and F₂alpha on erythropoietin production. *J Pharmacol Exp Ther* 198: 489
80. Mujovic VM, Fisher JW (1975) Effects of indomethacin on erythropoietin production following hypoxia in dogs. *Life Sci* 16: 463
81. McGonigle RJS, Brookins J, Pegram BL, Fisher JW (1987) Enhanced erythropoietin production by calcium entry blockers in rats exposed to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 241: 428
82. Filmanowicz E, Gurney CW (1961) Studies on erythropoiesis XVI. Response to a single dose of erythropoietin in polycythemic mouse. *J Lab Clin Med* 57: 65
83. Till JE, McCulloch EA (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14: 213
84. Stephenson JR, Axelrad AA (1971) Separation of erythropoietin-sensitive cells from hematopoietic colony-forming cells of mouse fetal liver by unit gravity sedimentation. *Blood* 37: 417
85. Stephenson JR, Axelrad AA, McLeod DL (1971) Induction of colonies of hemoglobin synthesizing cells by erythropoietin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1542
86. Iscove NN, Sieber F, Winter KH (1974) Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow. Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol* 83: 309
87. Sawada K, Krantz SB (1989) Human colony forming-unit-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I

- and/or insulin for erythroid development. *J Clin Invest* 1989. 83: 1701
88. Graber SE, Krantz SB (1989) Erythropoietin: biology and clinical use. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 3: 369
89. Bozzini CE (1965) Decrease in the number of erythrogenic elements in the blood forming tissues as the cause of anemia in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 77: 977
90. Bozzini CE, Barrio Rendo ME, Kofoed JA (1969) The effect of radiothyroidectomy on blood volume, red cell survival and iron kinetics in puppies. *Experientia* 25: 861
91. Giglio MJ, Alippi RM, Barceló AC, Bozzini CE (1979) Mechanism of the decreased erythropoiesis in the water deprived rat. *Brit J Haemat* 42: 93
92. Bozzini CE, Niotti HF, Barrio Rendo ME (1969) The erythropoietic and calorogenic effects of isomeres of triiodothyronine. *Acta Physiol Latinoam* 29: 309
93. Alippi RM, Giglio MJ, Bozzini CE (1977) Erythrocyte volume and body composition in oxymetholone-treated hypophysectomized rats. *Horm Met Res* 9: 246
94. Alippi RM, Barceló AC, Bozzini CE (1983) Erythropoietic response to hypoxia in mice with polycythemia induced by hypoxia or transfusion. *Exp Hematol* 11: 122
95. Schofield R (1975) Measurement of erythropoiesis by radioiron incorporation: influence of iron and cell kinetic changes. *Exp Hematol* 3: 22
96. Berlin NI, Van Dyke DC, Huff RL, Hennessey TG (1949) The blood volume of the adult rat, as determined by Fe59 and P32 labeled red cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 71: 176
97. Wright EM (1964) Apparatus for exposing animals to reduced atmospheric pressure for long periods. *Brit J Haemat* 10: 75
98. Alippi RM, Barceló AC, Rio ME, Bozzini CE (1983) Growth retardation in the early developing rat exposed to continuous hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Latinoam* 33: 1
99. Camiscoli JF, Gordon AS (1970) Bioassay and standardization of erythropoietin, en Gordon AS (Ed) *Regulation of Hematopoiesis. Vol I. Red Cell Production.* Appleton-Century-Crofts, New York, p 369
100. Garcia JF, Ebbe SN, Hollander L, Cuttino HO, Miller NE, Cronkite EP (1982) Radioimmunoassay of erythropoietin: circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J Lab Clin Med.* 99: 624
101. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, Adamson JW (1986) Human erythropoietin gene: high level expression in

- stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6465
102. Tambourin PE, Wendling F, Gallien-Lartigue O, Hualme D (1973) Production of high plasma levels of erythropoietin in mice. *Biomedicine* 19: 112
103. Smith EE, Crowell JW (1963) Influence of hematocrit ratio on survival of unacclimatized dogs at simulated high altitude. *Am J Physiol* 205: 1172
104. Aggio MC, Montano MJ, Bruzzo MT, Giusto N (1972) Possible inefficacy of polycythemia in tolerance to high altitude. *Acta Physiol Latinoam* 22: 123
105. Eaton JW (1981) Low altitude hominids at high altitude. *Blood Cells* 7: 509
106. Brewer GJ, Eaton JW (1971) Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport. *Science* 171: 1205
107. Erslev AJ, Caro J (1984) Secondary polycythemia: a boon or a burden? *Blood Cells* 10: 177
108. Winslow RM, Monge-C C (1984) Hypoxia, Polycythemia and Chronic Mountain Sickness. The John Hopkins University Press, Baltimore, USA
109. West JB (1984) Human physiology at extreme altitudes on Mount Everest. *Science* 223: 784
110. Hebbel RP, Eaton JW, Kronenberg RS, Zanjani ED, Moore LG, Berger EM (1978) Human llamas: adaptation to altitude in subjects with high hemoglobin oxygen affinity. *J Clin Invest* 62: 593
111. Eaton JW, Skelton TD, Berger E (1974) Survival at extreme altitude. Protective effect of increased hemoglobin-oxygen affinity. *Science* 183: 743
112. Eaton JW (1974) Oxygen affinity and environmental adaptation. *Ann NY Acad Sci* 241: 491
113. Thomas DJ, Marshall J, Ross-Russell RW, Wetherly-Mein G, Duboulay GH, Pearson TC, Symon L, Zilka E (1977) Effect of hematocrit on cerebral blood-flow in man. *Lancet* 2: 941
114. Thorling EB, Erslev AJ (1968) The "tissue tension" of oxygen and its relation to hematocrit and erythrocytosis. *Blood* 31: 332
115. Rizzini CE, Alippi RM, Martinez MA (1971) The inhibitory effect of relative polycythemia on erythropoietin production in response to hypoxic hypoxia. *Acta Physiol Latinoam* 21: 293
116. Kilbridge TM, Fried W, Heller P (1969) The mechanism by which plethora suppresses erythropoiesis. *Blood* 33: 104
117. Moccia G, Miller ME, Garcia JF, Cronkite EP (1980) The effect of plethora on erythropoietin levels. *Proc Soc*

118. Fried W, Plzak L, Jacobson LO, Goldwasser E (1956) Studies on erythropoiesis. II. Assay of erythropoietin in hypophysectomized rats. Proc Soc Exp Biol Med 92: 203
119. Piroso E, Erslev AJ, Flaharty KK, Caro J (1991) Erythropoietin life span in rats with hypoplastic and hyperplastic bone marrows. Am J Hemat 36: 105
120. Erslev AJ (comunicación personal)
121. Van Liere EJ (1964) Resistance to hypoxia. Archs Intern Med 113: 418
122. Simhadri P (1970) Survival time of mice in simulated high altitude. Indian J Med Res 58: 1244
123. Peschle C, Zanjani ED, Sasso GF, Rappaport IA, Gordon AS, Condorelli M (1972) Mechanisms underlying 6-methylprednisolone influences on erythropoiesis. Scand J Haemat 9: 442
124. Gordon AS, Mirand EA, Zanjani ED (1967) Mechanisms of prednisolone action on erythropoiesis. Endocrinology 81: 363
125. Fried W, Gurney CW (1965) Erythropoietic effect of plasma from mice receiving testosterone. Nature 206: 1160
126. Mirand EA, Gordon AS, Wenig J (1965) Mechanism of testosterone action in erythropoiesis. Nature 206: 270
127. Fink GD, Fisher JW (1977) Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists. II. Mechanism of action. J Pharmacol Exp Ther 209: 199
128. Schooley JC, Mahlmann LJ (1973) Evidence for the novo synthesis of erythropoietin in hypoxic rats. Blood 40: 662
129. Jelkmann W (1982) Temporal pattern of erythropoietin titers in kidney tissue during hypoxic hypoxia. Pfluggers Arch 393: 88
130. Bozzini CE (1966) Influence of the erythroid activity of the bone marrow on the plasma disappearance of injected erythropoietin in dogs. Nature 209: 1140
131. Berlin NI (1951) The polycythemia produced in the rat by cobalt. Acta Haemat 5: 30
132. Oskarsson A, Reid MC, Sunderman FW (1981) Effect of cobalt chloride, nickel chloride, and nickel subsulfide upon erythropoiesis in rats. J Lab Clin Med 11: 165
133. Goldwasser E, Jacobson LO, Fried W, Plzak LF (1958) Studies on erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin. Blood 13: 55
134. Kurtz A, Eckardt KU, Tannahill L, Bauer C (1988) Regulation of erythropoietin production. Contr Nephrol 66:

135. Goldberg AA, Dunning SP, Bunn HF (1988) Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science 242: 1412