

DOSAJE DE LA ERITROPOYETINA EN CULTIVO DE CELULAS ESPLENICAS DE RATONES ANEMICOS, DESPUES DE LA INCORPORACION DE 3H TIMIDINA

Aida Quintela*

La eritropoyetina (Epo) hormona glicoproteica de 34 Kd, controla la generación y la maduración de los eritrocitos a partir de los precursores hematopoyéticos. La causa para el origen de la producción de la Epo (1) es la hipoxia tisular y los sitios de síntesis están localizados en las células tisulares renales (2-3). Muy recientemente, técnicas de hibridación in situ han permitido en el ratón hipóxico revelar la presencia de ARNm específico en las células peritubulares renales (3-4).

Bajo condiciones experimentales o naturales (altura) de hipoxia, el primer mecanismo de compensación es manifestado por un aumento de la hemoglobina y los eritrocitos circulantes. Este aumento constituye el fenómeno clásico de la policitemia, que según Reynafarge, 1966 - Carmena y Rivas, 1971 - Garruto R.M., 1976 (5-6-7) el mecanismo que produce la policitemia de altura es una elevación de la secreción de Epo estimulada por la anoxia a nivel tisular que concierne las variaciones hematológicas ligadas a la altitud.

Este concepto clínico ha sido descrito en detalle por Monge C., 1929 (8) y Monge M. and Monge C., 1966 (9). Después Shooley, García, Cantor y Havins, 1968 (10) estudiaron un ratón tratado cada día por un anticuerpo anti-Epo y puesto durante 5 días a una altura de 5.400 m.. Ellos encontraron casi una completa inhibición de la respuesta policitémica. Stohlmann (11) y Albrecht (12) sugirieron que la policitemia de altura estaba ligada a una hipersecreción de Epo. Los trabajos de otros autores dieron un soporte suplementario a esta hipótesis observando la

relación que existe en los animales que sufren de hipoxia experimental, con las variaciones de la tasa de Epo plasmática. Para confirmar esta hipótesis son necesarios estudios complementarios para medir las variaciones de la eritropoyesis y de la Epo circulante sobre el mismo animal que sufre de hipoxia de altura.

El dosaje de la Epo en una muestra de suero, de extracto tisular o celular, o sobrenadante de medio de cultivo ha sido realizado primero por ensayos in vivo, después por ensayos in-vitro, largos y delicados de realizar y difíciles de interpretar.

Numerosos ensayos han sido llevados a cabo para encontrar una técnica rápida, específica y sensible.

La producción de la hormona por recombinación de ADN altamente purificado y disponible en gran cantidad va a permitir estudios precisos así como su empleo en el tratamiento de las anemias de la insuficiencia renal.

La Epo se encuentra en la circulación en concentraciones de 15 a 30 mU/ml de suero (14)

Existen tres métodos de dosaje: Dosajes biológicos in vivo (15-16); dosajes biológicos in vitro (17-18) y dosajes radioinmunológicos (19-20).

Una de las técnicas muy sensibles para la medida de la Epo humana es el bioensayo que utiliza la proliferación en 24 horas de células esplénicas de ratones tratados con fenilhidracina (después de 24 horas de cultivo). Esta última técnica se basa en la medida de la síntesis de ADN. Aunque no específica de una línea celular, esta medida toma un interés muy grande en presencia de suspensiones celulares e

* Departamento Biología Celular I.N.T.S.. París-Francia.

que los eritroblastos esplénicos se encuentran en mayoría. Nosotros hemos estudiado y profundizado esta técnica midiendo la actividad de la Epo sobre los eritroblastos esplénicos en cultivo según las respuestas en log-dosis.

Como hasta el momento no se sabe la tasa de Epo en el habitante de la altura, el objetivo del presente trabajo es el estudio de las posibles variaciones de la Epo sérica en la hipoxia de altura a fin de tener datos de referencia que permitan así la identificación de las poliglobulias patológicas en medio montañoso.

MATERIAL Y METODOS

Ratones CDI de 26 y 32 g que resultaron anémicos por dos inyecciones intraperitoneales en dos días consecutivos de 70 mg/kilo de clorhidrato de fenilhidrazina (33). Solución preparada a razón de 7 mg/ml de RPMI 1640 (medio). El tercer día después de la segunda inyección, los ratones son matados por dislocación cervical. Se extrae el bazo que se coloca en una pequeña caja Petri que contiene RPMI, el mismo que es disociado gracias a pinzas curvas y la separación de las células se hace con ayuda de una jeringa estéril por aspiración y expulsión suave durante 5 minutos con una aguja de calibre 18 y otros 5 minutos con aguja de calibre 21. La suspensión de células se filtró con un filtro nylon de calibre 60 μ m, las células han sido lavadas tres veces con RPMI a 1.400 rpm; el paquete celular se suspendió en 10 ml de RPMI conteniendo 2 % de Hepes. El conteo ha sido efectuado por dilución 1/50 con azul tripan, en los 25 cuadrados cuadrículados de la cámara de Malassez para:

- a) evaluar la concentración celular y determinar el volumen de la suspensión a agregar al medio de cultivo (Tabla I).
- b) conocer el rendimiento celular, es decir el número de células por bazo.

La curva standard es preparada a partir de una solución standard de Epo de cerdo de 1,6 U/ml (Actividad específica 1.030 U.I./mg I.N.T.S.) calibrada frente a una Epo humana urinaria cedida por la OMS (Londres). Las diluciones de la curva standard se hacen en albúmina bovina (BSA) 10 mg/ml; en dosis de 16, 8, 4, 2 y 1 mU de Epo por pozo. La 3H Thimidina 1 uCi/ml en agua estéril ha sido obtenida de Amersham CD 4.600 (TRK-61); la fenilhidrazina

HCl (cat P 7126) y la BSA de Sigma; el suero fetal de ternero (cat 011-0629OH) de Gibco; alfa tioglicérol (lot 202220) de Calbichem 59525; la solución Instagel (6002173) de Packard Instruments; las placas Nunc (95 U) de Flow Laboratoires y los filtros de vidrio 934-AH8X- 10 pulgadas (cat No. 1827 866) de Whatman. Preparada la suspensión celular y los standards para la curva, se depositaron en los 4 primeros pozos de la placa de microtitulación 10ul de BSA que sirven como testigo, en los pozos siguientes los standards para la curva y los sobrenadantes de los productos para dosar en cantidad de 10 ul por pozo. Luego se agregó en todos los pozos 200 ul de suspensión celular preparada y las células en cultivo son incubadas a 37° C. durante 22 horas en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Se incorporó la 3H Timidina (preparada en medio de cultivo para dar una concentración final de 100 uCi/ml, que corresponde a 1 uCi/pozo en cantidad de 10 ul/pozo. La placa es reincubada a 37° C durante dos horas. Las células se recolectan en filtros de vidrio al mismo que se hace el lavado con ayuda del Skatron, los filtros se secan en estufa a 48 ° C durante 5 horas. Los discos que retienen la 3H timidina ligada al ADN son colocados en tubitos de scintilación a los que se agregó 0,5 de Instagel con el fin de determinar la radioactividad (Contador Beta Beckman-LKB 1212 RACKBETA).

RESULTADOS

1°) En función de la dosis de fenilhidrazina

Los ratones han sido inyectados con soluciones de fenilhidrazina de 60, 70 y 80 mg/kg. los bazos de los ratones fueron sacados el 3er. día que siguió este tratamiento para determinar la dosis apropiada. Nosotros hemos comparado la sensibilidad de la Epo para la formación de células eritroides inmaduras del bazo de ratón. Se ha observado que las curvas de respuesta a las dosis obtenidas para la curva standard de Epo mostraban inclinación lineal de 1 mU/ml a 16 mU/ml con 70 mg/kg que con 60 mg/kg. La dosis de 80 mg/kg era demasiado fuerte para los ratones. (Tabla II).

2°) En función del número de inyecciones

Se ha inyectado fenilhidrazina (70 mg/kg) en ratones durante 2 o durante 3 días consecutivos. En los dos casos, los ratones han sido sacrificados 3 días des-

pués de la segunda inyección. Se ha podido constatar que con dos inyecciones la relación de CPM en presencia y ausencia de Epo (+Epo/-Epo) expresa una curva conveniente en respuesta a la dosis de Epo. En cambio con 3 inyecciones de fenilhidracina (70 mg/kg) la relación de CPM es menos satisfactoria, posiblemente debida a la producción de Epo endógena muy aumentada. Con el protocolo de dos días de inyección de fenilhidracina, el número de células esplénicas aumenta de 2×10^8 células/bazo en un ratón normal a 700×10^6 células/bazo.

3º) En función de la duración de la experiencia

Los ratones fueron inyectados con 70 mg/kg de fenilhidracina durante dos días consecutivos. Sus bazos sacados en distintos días que seguían al tratamiento para determinar el día en el cual las células daban una mejor respuesta in vitro por célula a la Epo. La figura 1 muestra que la mayor incorporación de 3H timidina por célula en respuesta a la Epo ocurre el 3er. día que sigue a la segunda inyección de fenilhidracina. La relación de CPM en presencia y ausencia de Epo (+Epo/-Epo) es también mostrada en esta figura y revela la inclinación óptima de la curva en respuesta a la dosis de Epo. Las flechas muestran los dos días consecutivos de inyección de fenilhidracina. Los números sobre los puntos de la curva +Epo representan la relación +Epo/-Epo.

Nosotros hemos hecho el estudio histoquímico de las células esplénicas y de acuerdo con Krystal (21) hemos encontrado 90 % pertenecientes a la línea eritroide, con una mayoría de proeritroblastos y eritroblastos basófilos.

OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

Estudios de concentración celular con células del 3er. día después de la segunda inyección de fenilhidracina han mostrado una relación lineal con la tasa de Epo, traducida por la incorporación de Timidina Triteriada obtenida en presencia de 2.25×10^6 , 2.35×10^6 , 2.50×10^6 células/ml. Nosotros hemos escogido la concentración final de 2.50×10^6 células/ml. Esta ha dado lugar según las experiencias realizadas de 2.000 a 30.000 CPM en ausencia de Epo y de 3.000 a 140.000 CPM en presencia de 16 mU de Epo/ml

(Figura 2). Los números sobre los puntos de la curva +Epo representan la relación +Epo/-Epo.

CALCULO DE LA CURVA DE RESPUESTA A LA DOSIS

Las curvas de respuesta a la dosis de los standards y de las muestras, se representan en función de los CPM. Las células testigo representan el 100 % de incorporación de 3H Timidina. Los valores de CPM varían de una experiencia a otra pero la inclinación de la curva queda constante en las mismas condiciones de trabajo. (Figura 3).

DISCUSION

Este estudio basado en la incorporación de la 3H Timidina en cultivo de 24 horas de eritroblastos esplénicos de ratones anémicos, es muy sensible a la Epo. De acuerdo con otros autores (21-22) la mayoría de las células parecen ser proeritroblastos y eritroblastos y por esto pueden contener un gran número de "cluster forming cells" descritas por Monette et al (23-24), lo que puede explicar la gran sensibilidad de este ensayo, ya que estos autores han reportado que las cluster forming cells son mucho más sensibles a la Epo que las menos diferenciadas CFUe (23).

Con el presente ensayo se pueden medir con bastante exactitud tasas de Epo en una gama situada entre 1 y 300 mU. Si se admite que las células no estimuladas corresponden a un porcentaje de CPM de 100 % la escala de variación de la respuesta de los eritroblastos a la Epo standard puede alcanzar de 400 a 600 % lo que permite obtener resultados precisos. Esta variación de CPM da como resultado una curva más inclinada con la 3H Timidina que con el Fe 59. Por esta razón, la gran reproductibilidad de la incorporación de 3H Timidina como punto final de la técnica ofrece una gran sensibilidad para la medida de la Epo. Este método por la abundancia de eritroblastos esplénicos y el empleo de 10 ul a 40 ul por pozo en las placas de microtitulación, tiene la ventaja de analizar un gran número de muestras por ensayo.

La incorporación de 3H Timidina menos específica que el empleo de Fe 59 para medir la síntesis de hemoglobina, constituye un método de fácil ejecución en presencia de la gran riqueza en eritroblastos de las

TABLA I

**REACTIVOS PARA 40 ml DE MEDIO DE CULTIVO DE
ERITROBLASTOS ESPLÉNICOS DE RATONES ANEMICOS**

REACTIVOS	CANTIDAD (ml)
Suero de ternero fetal inactivado 30' a 56° C	2,8
Vitaminas GIBCO	0,4
Gentamicina EUROBIO 10 mg/ml	0,4
MEN PIRUBATO (100 ml) GIBCO	0,8
GLUTAMINA (200 ml) GIBCO	0,76
TRANSFERRINA HUMANA PURIFICADA (4 mg/ml) CALBIOCHEM BEHRING	0,26
ALBUMINA BOVINA (22 mg/ml) SIGMA	10,00
ALFA THIGLICEROL EN RPMI (10 ⁻² M) CALBIOCHEM BEHRING	0,4
RPMI 1640 GIBCO qsp	40,00

TABLA II

**DIFERENCIACION ERITROBLASTICA EN FUNCION
DE LA DOSIS DE FENILHIDRACINA**

Dosis Fenilhidracina mg/kg	Nº de células	% eritroblastos
60	14.969	87
70	107.861	90
80	-	90

Figura 1
EVOLUCION DEL CRECIMIENTO ERITROBLASTICO
EN FUNCION DEL TIEMPO

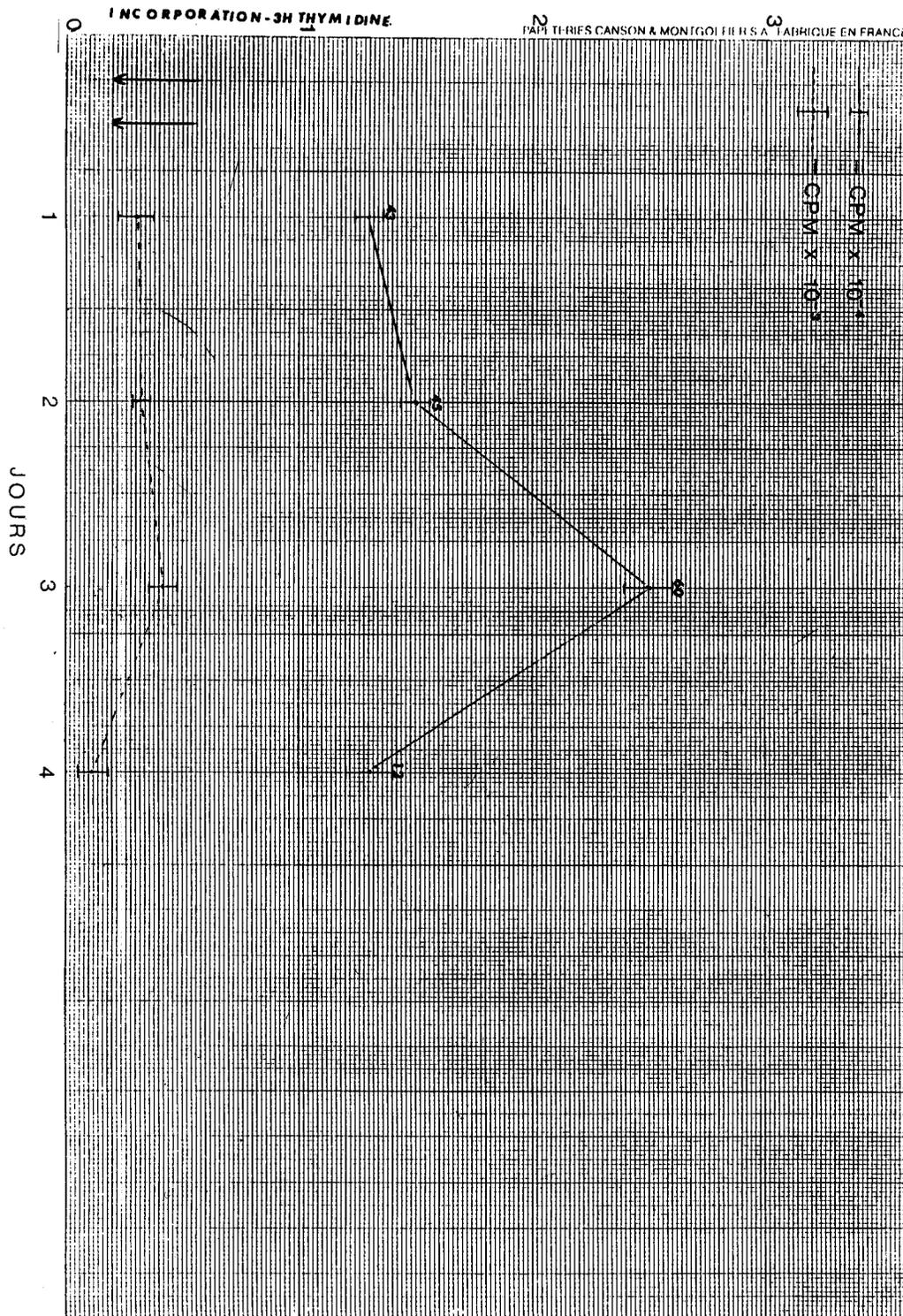


Fig.1.- Evolution de la poussée érythroblastique en fonction du temps

Figura 2
**EFFECTO DE LA EPO SOBRE LA MULTIPLICACION DE
 LOS ERITROBLASTOS EN FUNCION DE LA CONCENTRACION CELULAR**

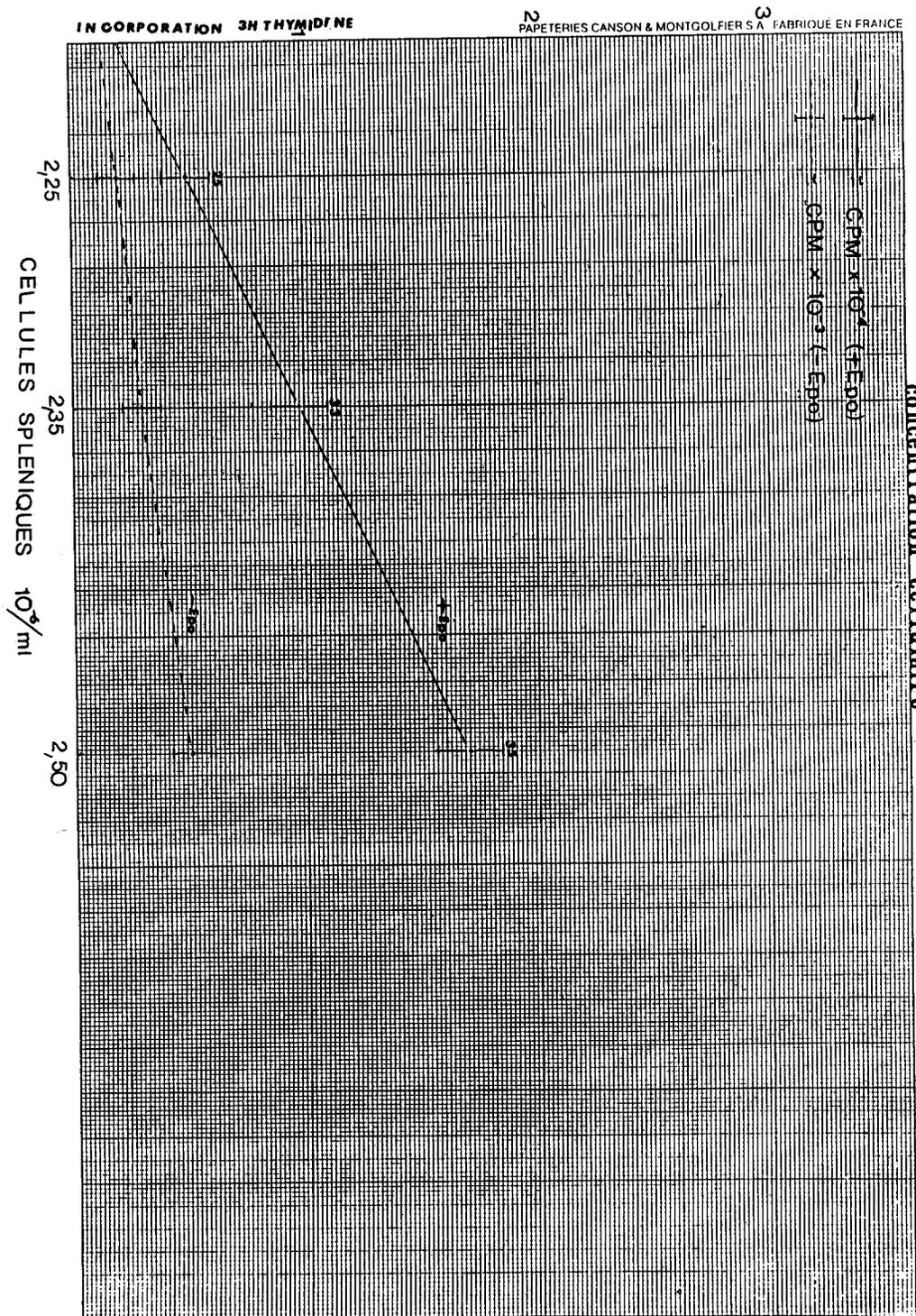
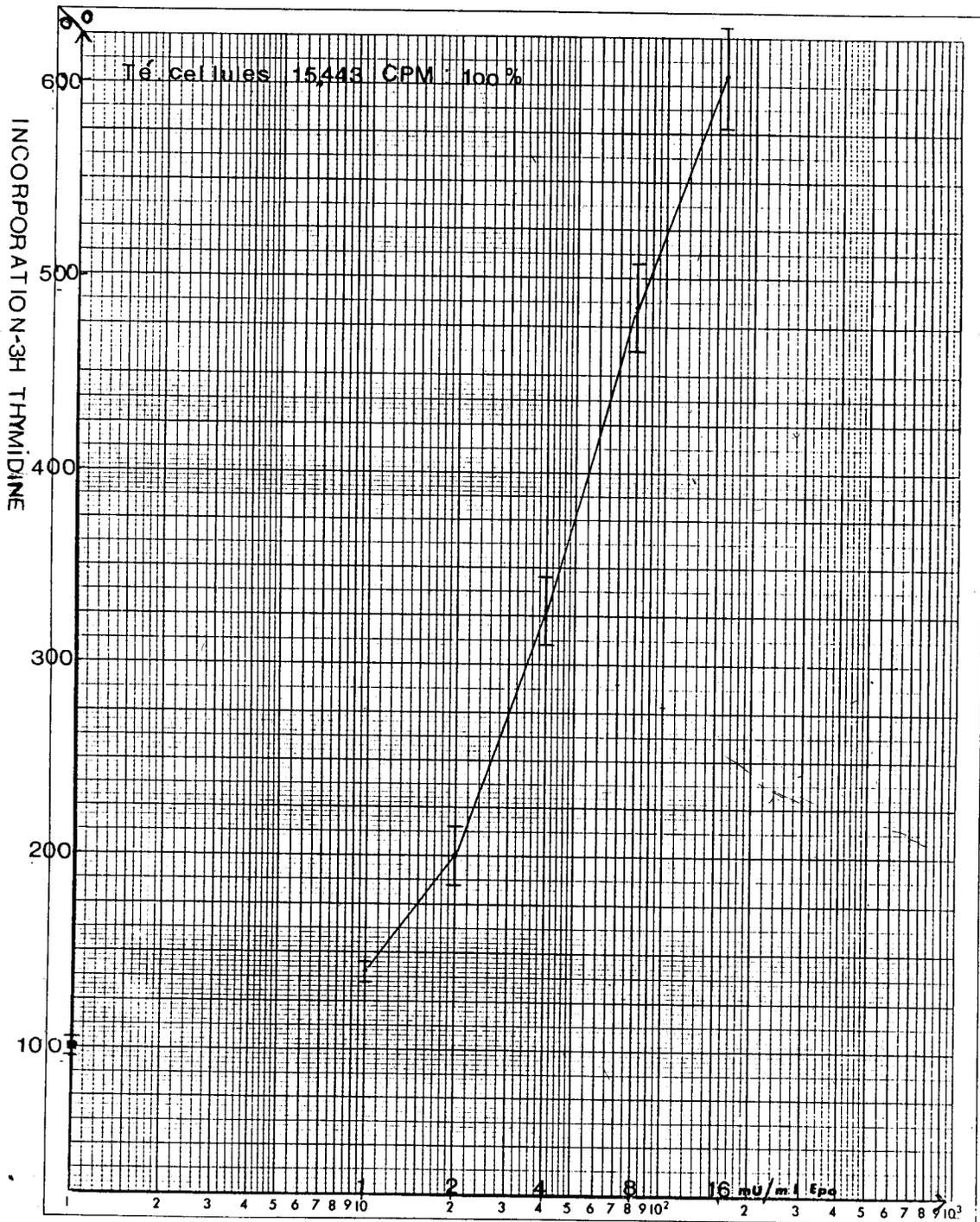


Figura 3
DOSAJE DE LA ERITROPOYETINA

Fig. 3.- DOSAGE DE L'ERYTHROPOIETINE



suspensiones celulares esplénicas. Este método queda sometido al efecto de los inhibidores presentes en el suero total, lo que exige una purificación previa de la Epo antes de su dosaje.

REFERENCIAS

1. CARNOT, P. and DELFLANDRE, C. Sur l'activité hématopoïétique des sérums au cours de la régénération du sang. Acad. Sci. M. 3: 384; 1906
2. STEPHEN, J.; SHUSTER, J.H. WILSON; ERSLEV, A.J. and CARO, J. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA Blood, 70: 316; 1987
3. LACOMKE, C.; DA SILVA J.L.; BRUNEVAL, P. et al Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. J.Clin. Invest 81: 620] 1988
4. KOURY, S.T.; BONDURANT, M.C. and KOURY, M.J. Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. Blood 71: 521; 1988
5. REYNAFARJE, C. Physiological patterns: hematological aspects. In "Life at high altitudes" pp 32-9. Scientific Publication N° 140, Washington, DC. Pan American Health Organization; 1966.
6. CARMENA, A.O. and RIVAS, E. Urinary excretion of delta-aminolaevulinic acid and phosphokinogen in young natives of 13.000 feet brought to sea level. Haematologia, Budapest 5: 3; 1971.
7. GARRUTO, R.M. Hematology. In man in the Andes. A multidisciplinary high altitude quechua. Ed. P.T. BAKER and M.A. LITTLE, pp 261-82. Stroudsburg Pa.: Dowden, Hutchinson and Ross, 1976.
8. MOGE, C. Les érythémies de l'altitude Paris, Masson et cie, 1929
9. MONGE, C.C. and MONGE C.C. Altitudes diseases Springfield III C.C. THOMAS; 1966
10. SHOOLEY, J.C.; GARCIA, J.F.; CANTOR, L. and HAVENS V.W. A summary of some studies on erythropoiesis using immune serum. Annals of the New York Acad. of Sci. 149: 266; 12968
11. STOHLMAN R.; RATH, C.E. and ROSE J.C. Evidence for a humoral regulation of erythropoiesis. Studies on a patient with polycythemia secondary to regional hypoxia. Blood 9: 721; 1954.
12. ALBRECHT, H.P. and LITTELL, K.J. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. Journal of Applied Physiology 32:54; 1972
13. LORD, B.I. and MURPHY, M.J. Hematopoietic stem cell regulation II. Chronic effects of hypoxic-hypoxia on CFU kinetics. Blood 42:89; 1973
14. COTES P.M. Immunoreactive erythropoietin in serum. Br. J. Haematol 50: 427; 1982
15. COTES, P.M.; and BANGHAM D.R. Bioassay of erythropoietin in mice male polycythemic by exposure to air at reduced pressure. Nature 191: 1065; 1961.
16. CAMISCOLI, J.P. and GORDON, A.S. Bioassay and standardization of erythropoietin. In Gordon A.S. (Ed). Regulation of hematopoiesis. Vol 1, New York. Appleton-Century-Crofts pp 369; 1970
17. DUNN, C.D.R.; JARVIS, J.H. and GREENMAN J.M. A quantitative bioassay for erythropoietin using mouse foetal liver cells. Exp. Hematol 3: 65; 1975
18. KRYSZAL, G.; EAVES, A.C. and EAVES C.J. A quantitative bioassay for erythropoietin using mouse bone marrow. J. Lab. Clin. Med. 97: 144, 1981.
19. GARCIA, J.F.; SHERWOOD, J. and GOLWASSER, E. Radioimmunoassay for erythropoietin Blood Cells 5:405; 1979
20. REGE, A.B.; BROOKINS, J. and FISCHER J.W. A radioimmunoassay for erythropoietin: serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. J. Lab. Clin. Med. 100: 829; 1982.
21. KRYSZAL, G. A simple microassay of erythropoietin based on 3H Thymidine in into spleen cells from phenylhydrazine treated mice. Exp. Hematol. 11: N° 7: 649; 1983
22. KRYSZAL G. Physical and biological characterization of erythroblast enhan (EEF), a late acting erythropoietic stimulator in serum disin erythropoietin Exp. Hematol 11:18; 1983
23. MONETTE, F.C.; WEINER, E.J. and FALETRA, P.P. The state of differentiation of erythroid cells forming cluste Exp. Hematol 9: 711; 1981
24. MONETTE, F.C.; OUELLETTE, P.L. and FALETRA, P.P. Characterization of murine erythroid progenitors with high ery sensitivity in vitro Exp. Hematol. 9: 249; 1981.