

Instituto de Biología de la Altura
Universidad Nacional de Tucumán
San Salvador de Jujuy
ARGENTINA

Umbral de hipoxia de la respuesta eritropoyética en la rata

por

J. L. Scaro

(Recibido para publicar el 26 de marzo de 1965)

Entre los ajustes fisiológicos de adaptación a la altura, figura entre los más conspicuos, un aumento de la masa sanguínea que se pone en evidencia algunas semanas después de iniciada la exposición a la hipoxia y que resulta claramente significativo a alturas de 3000 metros, o más, sobre el nivel del mar. Dicho aumento en la formación de eritrocitos, está relacionada con un aumento de la tasa de eritropoyetina (EP), cuya concentración en el plasma es dependiente del grado de hipoxia tisular (9, 10, 11, 14). Entre 0 y 2000 metros no se comprueban variaciones significativas en la volemia globular, que reflejen un aumento genuino de la eritroformación, no obstante que a este último nivel ya existe una reducción superior al 20 % en la tensión del O_2 en el aire inspirado.

A alturas comprendidas entre 2000 y 3000 metros, aparece primero una hemoconcentración ocasionada por una reducción de la volemia plasmática (13) a la que sigue un aumento real de la masa sanguínea como consecuencia de una estimulación de la eritroformación. No existe, sin embargo, acuerdo sobre cuál

es el grado mínimo de hipoxia capaz de desencadenar esta respuesta. En el presente trabajo hemos estudiado la respuesta eritropoyética a la hipoxia en ratas sometidas a alturas moderadas y de nivel creciente con la intención de determinar en esta especie cuál es el umbral de hipoxia capaz de traducirse en un estímulo genuino de la eritropoyesis. Tal determinación informará asimismo sobre los límites de eficiencia de los otros mecanismos que permiten compensar la reducción de la tensión de O_2 en el aire inspirado sin que se produzca una disminución del aporte del gas a los tejidos suficiente para poner en marcha el mecanismo responsable de la respuesta humoral de la eritropoyesis.

Material y métodos

En todos los casos se utilizaron ratas hembras del criadero de este Instituto con pesos entre 140 y 160 gr. El efecto de la reducción de la tensión de O_2 en el aire inspirado se midió: a) en experiencias crónicas determinando los efectos de una permanencia de 40 días a dis-

tintas alturas sobre la volemia sanguínea, y b) El efecto de distintos grados de hipoxia aguda sobre la ferroquinesis.

DETERMINACIÓN DE VOLEMIA. Grupos de 10 animales cada uno, fueron mantenidos durante 40 días a las siguientes alturas: 1) grupo control mantenido en el criadero de este Instituto, ubicado a 1270 metros sobre el nivel del mar; 2) a 1850 metros; 3) a 2000 metros; 4) a 2350 metros, y 5) a 3000 metros sobre el nivel del mar. Durante el período de permanencia en la altura, se mantuvo a los animales en la misma dieta habitual y se controlaron los factores ambientales de luz, humedad y temperatura. Al término de dicho período, se procedió a determinar las volemias sanguíneas utilizándose para ello una técnica combinada con T-1824 y eritrocitos marcados con Fe-59. La misma consistió esencialmente en la administración endovenosa (jeringa Beckton-Dickinson de 0,50 ml.) de 0,25 ml. de sangre entera conteniendo los eritrocitos marcados, sobre los que se cargaron 0,25 ml. de una solución de

alícuota de sangre entera, se midió la radioactividad en términos de radiación beta con un contador Geiger Muller, de ventana terminal extra fina, según la técnica descrita por Lowy y col. (8). Se determinaron asimismo los valores de hematocrito y hemoglobina, estos últimos por el método de la cyanmetahemoglobina. El resto de la sangre fue centrifugada para obtener plasma sobre el que se efectuó la lectura espectrofotométrica de la concentración del colorante a una longitud de onda de 620 μ m.

Los valores del hematocrito y de la radioactividad en la sangre fueron utilizados con la siguiente fórmula para el cálculo de la volemia globular:

$$V. G. = \frac{Ht}{100} \times \frac{\text{Total de cuentas de Fe-59 inyectadas}}{c/m \text{ en } 1 \text{ cm}^3 \text{ de sangre}}$$

Para la determinación de la volemia plasmática con el T-1824 se utilizó la siguiente fórmula:

$$V.P. = \frac{\text{Vol. del colorante inyec.} \times \text{lectura del tipo}^+ \times \text{diluc. del tipo}}{\text{lectura de la muestra corregida a tiempo } 0^+}$$

T-1824 a una concentración ajustada convencionalmente, de manera que la lectura de la densidad óptica del tipo estuviera alrededor de 0,400. Previamente se midió la radioactividad de una alícuota de la sangre marcada para utilizarse como standard. Asimismo se preparó un tipo para las lecturas de la concentración del colorante en el plasma, agregándose a 5 ml. de plasma de rata una dosis del colorante igual a la inyectada. Para evitar inconvenientes acarreados por los plasmas turbios, se procedió en todos los casos a ayunar los animales durante 12 horas.

Quince minutos después de la inyección se procedió a sangrar los animales bajo anestesia etérea liviana por vía aorta, con jeringa heparinizada. Sobre una

Para la corrección de la lectura a tiempo 0 se aplicó el factor 0,97 a las cifras del espectrofotómetro (3). Los valores de la volemia total se determinaron por la suma de las volemias globular y plasmática así encontradas.

FERROQUINESIS. Los efectos de la hipoxia de corta duración sobre la ferroquinesis se estudiaron en ratas normales. Lotes de 10 animales cada uno fue mantenido en cámara de hipopresión a alturas simuladas equivalentes a las utilizadas para la experiencia de larga duración, durante 72 horas. A continuación fueron inyectadas con 0,25 μ C de Fe-59 por vía endovenosa bajo anestesia

+ Densidad óptica.

sia etérea liviana y 90 minutos después sangradas por vía aorta sobre heparina. Se separó el plasma y sobre una alícuota se midió la radioactividad remanente en el plasma con la misma técnica descrita más arriba para medición de radioactividad en sangre entera. Dicha actividad se calculó en tanto por ciento de la inyectada por comparación con un Standard adecuadamente diluido.

Con el dato de la actividad total inyectada y la encontrada a los 90 minutos, se puede obtener gráficamente o por la correspondiente formulación matemática con el uso de las tablas exponenciales, el valor del tiempo medio de desaparición del Fe del plasma. Mientras los valores de Fe-59 son altos en el plasma, este procedimiento ha demostrado ser útil para la medición del tiempo medio del hierro plasmático en la rata (6).

Resultados

Cuando se estudió el efecto de la hipoxia sobre la velocidad de desaparición del Fe-59 en el plasma, se encontró que hasta el nivel 2000 metros inclusive, no existe ninguna variación significativa (Tabla II). No obstante, debe mencionarse que en el grupo de animales sometidos a ésta última altura, el promedio resulta ligeramente acortado en comparación con los controles, aunque la diferencia no tiene significación por cuan-

to los valores individuales encontrados en ese grupo muestran un amplio rango de variaciones. En el nivel 2350 metros, se encuentra, en cambio, una consisten-

TABLA II
Valores del tránsito del Fe-59 en el plasma de ratas sometidas a distintas alturas durante 3 días.

Altura sobre nivel del mar	Tensión O ₂ (mm Hg)	% Fe-59 Plasma (1,5 h.)	(minutos) T $\frac{1}{2}$
1250 (controles)	138,0	48,1 $\pm$ 3,1*	86,7
1850	127,2	46,2 $\pm$ 2,9	80,1
2000	125,0	45,2 $\pm$ 6,9	73,8
2350	119,2	25,0 $\pm$ 3,2	45,0
3000	109,0	14,8 $\pm$ 2,2	33,3

* Desviación estandard.

te reducción del tiempo de aclaramiento del hierro plasmático, que se hace mucho más evidente en el próximo escalón investigado (3000 metros). La medición del hematocrito a continuación del período de hipoxia, mostró a partir del escalón 1850 metros, un ligero aumento que estuvo presente en todos los niveles estudiados.

La Tabla I muestra el promedio de los valores de la Volemia globular. Hasta las alturas de 2000 metros inclusive no se presentan variaciones significativas, no obstante, encontrarse ya un aumento aunque sin valor estadística-

TABLA I
Valores de la volemia en ratas sometidas a distintas alturas sobre el nivel del mar durante 40 días.

Altura sobre nivel del mar	Tensión O ₂ (mm Hg)	Volemia plasmática/100 g	Volemia globular/100 g	Volem. total/100 g	Hematocrito %	Hemoglobina g %
1250 (controles)	138,0	3,64 $\pm$ 0,11*	3,35 $\pm$ 0,23	6,99 $\pm$ 0,26	46,0 $\pm$ 1,2	15,4 $\pm$ 1,0
1850	127,2	3,54 $\pm$ 0,16	3,32 $\pm$ 0,18	6,86 $\pm$ 0,14	47,8 $\pm$ 1,8	16,0 $\pm$ 0,9
2000	125,0	3,57 $\pm$ 0,19	3,33 $\pm$ 0,22	6,90 $\pm$ 0,75	48,9 $\pm$ 1,3	16,7 $\pm$ 0,5
2350	119,2	3,68 $\pm$ 0,29	3,98 $\pm$ 0,30	7,66 $\pm$ 0,59	52,2 $\pm$ 1,7	16,9 $\pm$ 1,0
3000	109,0	3,68 $\pm$ 0,28	4,07 $\pm$ 0,26	7,75 $\pm$ 0,27	54,1 $\pm$ 1,8	17,1 $\pm$ 1,2

* Desviación estandard.

mente significativo en los valores de hemoglobina y hematocrito. En las alturas aludidas se encuentra un ligero descenso de la volemia plasmática que pueda estar estrechamente relacionado con los aumentos mencionados. En el siguiente escalón de altura investigado, 2350 metros, se comprueba ya un aumento genuino de la volemia globular cuya significación estadística es significativa ($P < 0,001$) y que se acentúa en el siguiente, ocurriendo lo mismo con los valores de hemoglobina y hematocrito. Estos incrementos, sin embargo, no se acompañan de modificaciones sustanciales de la volemia plasmática que a estas alturas permanece alrededor de los valores encontrados en los controles.

Discusión

Aunque existe una amplia literatura de los efectos de la hipoxia de las grandes alturas sobre los cambios hematólogicos, los efectos de las alturas moderadas no han sido ampliamente investigados.

Los estudios de los efectos de la hipoxia moderada sobre la volemia, en seres humanos no coinciden en fijar el nivel de iniciación de la respuesta eritroformadora. Algunos autores (15, 16) comunican que el nivel 1850 metros ya se encuentra en aumento genuino de la volemia globular, mientras otros (13) fijan para esta respuesta valores superiores a los 2200 metros sobre el nivel del mar.

TRIBUKAIT (17, 18) encuentra que los valores de la volemia sanguínea total en ratas, se modifican significativamente a alturas mayores que las encontradas por nosotros. En su trabajo comprobó que los animales de menor peso corporal mostraron las respuestas mayores. Aunque sin pretender explicar a través de ello la citada diferencia de resultados, debe mencionarse el hecho del menor

peso de los animales utilizados en nuestra experiencia.

Los resultados obtenidos en éste estudio, indican que la reducción de la tensión de O_2 existente a alturas moderadas, entre 2000 y 2350 m sobre el nivel del mar, es capaz de iniciar la respuesta eritropoyética en la rata. Se ha objetado que la velocidad de tránsito y renovación de hierro plasmático no constituye un índice confiable al ser utilizado para estimar cuantitativamente la actividad eritropoyética (2, 19). No obstante, los resultados aquí presentados pueden considerarse libres de tal limitación al haberse uniformado todas las demás condiciones experimentales. Asimismo es de notar el hecho de que a partir del nivel de 2350 metros, todos los casos de cada grupo sin excepción mostraron un acortamiento del T medio del Fe plasmático, lo cual agrega significación a tal variación. La comprobación del mencionado hallazgo al nivel 2350 coincide a su vez con un aumento de la volemia globular, comprobada en el grupo de animales mantenidos durante 40 días a ese nivel. La reducción de la volemia plasmática encontrada en los niveles inferiores con una consecuente policitemia relativa, ha sido interpretada como el primer mecanismo hemático de compensación de la hipoxia anóxica (1, 13). La citada reducción de la volemia plasmática desaparece al iniciarse el aumento genuino de la masa globular al nivel 2350, momento en que retorna a la normal, no mostrando incrementos ulteriores, lo cual contribuiría a evitar un agrandamiento excesivo del volumen sanguíneo total, al crecer la volemia globular.

La interpretación generalmente aceptada de la respuesta eritropoyética a la hipoxia anóxica, incluye una disminución de la tensión de O_2 a nivel de los tejidos. Tal situación ocurriría sólo después de haber sido superados los límites de eficiencia de otros mecanismos com-

pensadores (4, 5, 7, 12). Sin embargo, en los niveles considerados en éste trabajo, los mismos entrarían en acción sólo después que la disminución de la tensión de O_2 en el aire inspirado ha sido reducida sustancialmente. Tal circunstancia depende de la forma de la curva de disociación de la hemoglobina, la que en razón de ser asintótica en la región de las tensiones de O_2 consideradas, permite que la saturación de sangre arterial sea prácticamente normal al producirse caídas de la tensión de O_2 en el aire inspirado aún equivalentes o algo mayores al 20 % de la existente en el nivel del mar.

Resumen

Se investigó el umbral de hipoxia capaz de iniciar la respuesta eritropoyética en la rata.

Se midieron los efectos de la permanencia prolongada a distintas alturas sobre el nivel del mar, sobre la volemia sanguínea, como asimismo el efecto de permanencias de corta duración a las mismas alturas sobre la velocidad de tránsito y renovación del hierro plasmático.

Los resultados de ambas series experimentales coinciden en demostrar que el umbral se encuentra entre los 2000 y 2350 metros.

Summary

Hypoxic threshold of the erythropoietic response in the rat.

The hypoxic threshold of the erythropoietic response in the rat was investigated.

The effects on the blood volumen of a long term permanency at different altitudes above sea level and the effects of acute exposition to the same degrees of hypoxia upon the plasma iron $T_{1/2}$ were studied.

The results in both series of experiments are coincident and prove that the falls in the O_2 tension which take place at altitudes in between 2000 and 2350 meters above sea level are able to initiate the erythropoietic response as can be seen through the shortening of the plas-

ma iron $T_{1/2}$ and the increases of the blood volumen which take place at those altitudes.

Bibliografía

- (1) ASMUSSEN, E. and CONSOLAZIO, F. C. : *Am. J. Physiol.*, **132**, 555, 1941.
- (2) BOTHWELL, T. H., HURTADO, A. V., DONAHUE, D. M. and FINCH, C. A. : *Blood*, **12**, 409, 1957.
- (3) DACIE, J. V. and LEWIS, S. M. : *Practical Hematology*, London J. & A. Churchill Ltda. 1963, pág. 285.
- (4) DRIPPS, R. D. and COMRAE, J. H., JR. : *Am. J. Physiol.*, **149**, 277, 1947.
- (5) FELDMAN, M., J. V. ROBBARD, S. and KATZ, L. N. : *Am. J. Physiol.*, **154**, 391, 1948.
- (6) HOGSDON, G., ESKUCHE, I., FISHER, S. and PERRETA, M. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 441, 1960.
- (7) KREUZER, F., TENNEY, S. M., ANDRESEN, D. C., SCHREINER, B. F., NYE, JR., R. E., MITHOEFFER, J. C., VALTIN, H. and NAITOVE, A. : *J. Applied Physiol.*, **15**, 796, 1960.
- (8) LOWY, P., KEIGHLEY, G., BORSOOK, H. and GRAYBIEL, A. : *Blood*, **14**, 262, 1959.
- (9) NAETS, J. P. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **112**, 832, 1963.
- (10) PRENTICE, T. C. and PILIERO, E. A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **106**, 501, 1961.
- (11) PRENTICE, T. C. and MIRAND, E. A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **595**, 633, 1957.
- (12) RAHNS, H. and OTIS, A. : *Am. J. Physiol.*, **157**, 445, 1949.
- (13) SÁNCHEZ-MEDALL, L., MOYADO, H., RODRÍGUEZ, Q. DE E. y PIZAUTO, J. : *Le Sang*, **31**, 311, 1960.
- (14) STOLHMAN, F. and BRECHER, G. : *J. Lab. and Clin. Med.*, **49**, 890, 1957.
- (15) TERZIOGLU, M. and TUND, N. : *J. Applied Physiol.*, **6**, 417, 1954.
- (16) TERZIOGLU, M., F. OZER and N. GOKHAN : *J. Applied Physiol.*, **6**, 423, 1954.
- (17) TRIBUKAIT, B. : *Acta Physiol. Scand.*, **57**, 1, 1963.
- (18) TRIBUKAIT, B. : *Acta Physiol. Scand.*, **58**, Suppl. 208, 1963.
- (19) WASSERMANN, L. R., RASHKOFF, I. A., LEAVITT, D., MAYER, J. and PORT, S. : *J. Clin. Invest.*, **31**, 32, 1952.

