

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

Efectos del ayuno proteico sobre la repoblación eritropoyética desde un fémur blindado en ratones irradiados

por

J. L. Scaro

(Recibido para publicar el 24 de septiembre de 1968)

El restablecimiento de la actividad eritropoyética en ratones con irradiación letal, en los cuales se ha protegido una porción de la medula ósea (un miembro posterior), se acepta que es el resultado de la emigración de precursores indiferenciados desde el sector protegido a los demás territorios de la eritropoyesis destruidos por la irradiación, en los que colonizan y por diferenciación dan lugar al restablecimiento de las distintas líneas hemopoyéticas (1, 2, 5, 9, 13). Por otra parte, la supresión de las proteínas en la dieta de pequeños roedores produce una rápida reducción de la actividad eritropoyética (4, 10, 11). Tal acción, que ha sido atribuida a una caída en la concentración de eritropoyetina, afecta en forma diferente las fracciones medular y esplénica de la eritropoyesis del ratón (16). Una falta de paralelismo en el comportamiento de ambos sectores de la eritropoyesis en esta especie ha sido asimismo observada en otras situaciones (7, 8, 17). La causa de este diferente comportamiento no es clara y

nosotros hemos sugerido que el mismo obedece al hecho de que las poblaciones de precursores indiferenciados, *stem cells*, en ambos sectores no son idénticas (16).

Con la intención de proveer mayor información sobre el mecanismo de la depresión eritropoyética ocasionada por el ayuno proteico, se ha procedido a estudiar los efectos de éste sobre los cambios que ocurren tanto en el sector medular como esplénico durante el curso de la repoblación endógena de la eritropoyesis en ratones irradiados, a partir de los elementos precursores conservados en un fémur protegido.

Material y métodos

Se utilizaron ratones hembras vírgenes de 9 a 12 semanas de edad con pesos entre 26 y 29 gramos, de la cepa de este Instituto. Todos los animales fueron primeramente expuestos a una dosis de 150 r en todo el cuerpo y de inmediato se procedió a blindar un miembro posterior por

medio de un espesor de 2,5 cm de plomo, aplicándose a continuación 750 r al resto del cuerpo. De esta manera la zona blindada recibió solamente 150 r y el resto del cuerpo un total de 150 r + 750 r, igual a 900 r. Las dosis de irradiación indicadas se efectuaron por medio de un rayo vertical de un aparato Stabilipan (Siemens) 250 kw a razón de 30 r por minuto, a una distancia de 50 cm usando un filtro de 0,5 mm de cobre. Los animales se dividieron en dos grupos, el grupo A recibió durante todo el período experimental una dieta normal (Forramez, Molinos Río de la Plata, Bs. As.). Al grupo B se le provió de una dieta desprovista completamente de proteínas (4). Ambos grupos se subdividieron en dos subgrupos AI y AII, BI y BII. Los grupos AII y BII recibieron diariamente a partir del día 5 después de la irradiación una dosis de 3 unidades B de eritropoyetina (EP) por vía subcutánea disuelta en 0,25 de solución salina normal que se reemplazó en los grupos AI y BI por igual volumen de solución salina. A partir del primer día después de la irradiación y hasta el día 11, ocho animales de cada subgrupo fueron separados diariamente e inyectados con 0,25 μC de $^{59}\text{FeCl}_3$ con una actividad específica de 0,7 $\mu\text{C}/1 \mu\text{g}$, en una solución amortiguadora de fosfatos, pH 3,5. Tres horas después de la inyección del trazador se sacrificó los animales, y se procedió a extraer el bazo y ambos fémures que fueron limpiados de todas sus partes blandas. En cada fémur por separado, como así también en el bazo, se midió la radiactividad presente, en un contador de centelleo, y ese valor se calculó como por ciento de la actividad de la dosis total administrada. Estas determinaciones fueron asimismo llevadas a cabo en un grupo de 30 animales normales sin ningún tratamiento y los valores encontrados en un fémur y en el bazo se utilizaron como valores comparativos, con los grupos sometidos a irradiación, estimándose los valores normales como 100 % de actividad. El hematocrito

fue determinado por duplicado en todos los casos. Durante el período experimental los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida (clorinada y conteniendo 0,5 % de terramicina). La eritropoyetina utilizada fue obtenida por diálisis y liofilización de un filtrado hervido de plasma de conejo anémico (12), cuya actividad fue controlada contra una muestra de la Preparación Internacional de Referencia de Eritropoyetina (3).

Resultados

Como puede apreciarse en el gráfico 1 la irradiación produce una caída de los valores de incorporación de ^{59}Fe ya a las 24 horas en todos los sectores estudiados, fémur protegido (FP) 150 r, fémur irradiado (FI) 900 r, y bazo (B) 900 r.

La caída en el sector protegido, no obstante es sustancialmente menor que en las no protegidas. Este cuadro se mantiene sin variaciones hasta el día 7 a 8. En los grupos AI y AII se aprecia a partir del día 8 una recuperación en la zona medular protegida (FB) que supera ampliamente en el día 9 los valores de incorporación normal. En los días 9 y 11 ocurre una notable recuperación del sector esplénico el cual alcanza el día 11 un valor del 200 % del valor normal. La fracción medular irradiada se recupera pero sin alcanzar el valor normal. Un cuadro cronológicamente similar aparece en el grupo AII que recibió la inyección de eritropoyetina aunque los valores de la recuperación son mayores que en el grupo no inyectado con la hormona. El cuadro de recuperación varía notablemente en los grupos con ayuno proteico. El grupo AI muestra al término del período de observación una franca recuperación del fémur protegido y ninguna en el fémur no protegido como así tampoco en el bazo. En el grupo BII se observa un incremento de la respuesta del sector protegido, que va más allá del valor normal apreciándose solamente un pequeño incremento en los

TABLA I
Variación de los valores del hematocrito

| Días | Grupos | | | |
|------|--------------|------------|------------|------------|
| | AI | AII | BI | BII |
| 2 | 40,0 ± 2,8 * | 39,5 ± 3,0 | 40,9 ± 2,9 | 43,0 ± 2,0 |
| 4 | 37,3 ± 2,3 | 36,0 ± 3,9 | 39,6 ± 3,3 | 40,0 ± 3,9 |
| 6 | 33,4 ± 4,9 | 30,0 ± 4,4 | 41,3 ± 4,0 | 41,2 ± 3,9 |
| 8 | 29,0 ± 5,1 | 31,0 ± 5,3 | 38,1 ± 4,9 | 40,7 ± 4,0 |
| 10 | 37,8 ± 5,0 | 39,0 ± 4,9 | 40,7 ± 3,9 | 39,6 ± 4,4 |

* Valores medios de ocho animales con su desviación standard.

sectores irradiados tanto medular como esplénico. Los valores del hematocrito en los grupos AI y AII se reducen notablemente dando lugar a un estado anémico que resulta muy manifiesto en el 5 a 7 día. Esta reducción del Ht, en cambio, no es compartida en igual medida por los grupos BI y BII.

Discusión

La interpretación de los resultados que aquí presentamos requiere la consideración previa de los dos procesos que se estudian.

1) Análisis de los cambios que conducen a la repoblación eritropoyética a partir de la población de *stem cells* preservadas en el sector medular protegido, y 2) Mecanismo de la acción del ayuno proteico sobre esos cambios.

En el primer caso hay ya una amplia evidencia que muestra que las *stem cells* remanentes en el fémur que solamente recibió 150 r, son capaces de emigrar a los territorios irradiados donde colonizan y multiplican dando lugar por posterior diferenciación a elementos hemopoyéticos en forma de colonias que son fácilmente apreciables a simple vista en el bazo, cada una de las cuales deriva de la proliferación de una célula y constituye un verdadero colono (1, 2, 5, 13).

BRUCE y McCULLOCH (2) han propues-

to la existencia de dos clases de *stem cells*, la primera (Clase 1) estaría localizada en la medula ósea y tendría capacidad de formar colonias a partir de las cuales se restablecería la hemopoyesis en huéspedes con irradiación que de otra manera sería letal, y una segunda (Clase 2) que sería una progenie de la anterior y en la que ya se ha desarrollado la sensibilidad a la acción diferenciadora de eritropoyetina. STOHLMAN y col. (19) sugieren asimismo la existencia de una primera población de células primitivas totipotentes que se diferencian en una segunda, en la cual sus elementos estarían ya comprometidos a diferenciarse bajo un estímulo adecuado en elementos definitivos de las líneas megacariocítica, granulocítica o eritrocítica. Las células de la primera población serían las responsables de la formación de colonias. Los elementos de la segunda población serían en parte capaces de auto-mantenerse pero en períodos de demandas extremas requerirían el aporte de elementos de la población más primitiva. PORTEOUS y col. (15), sin embargo, al interpretar los resultados de sus observaciones objetan la existencia de dos poblaciones de precursores.

En lo que se refiere a la reducción de la eritropoyesis causada por el ayuno proteico, la misma ha sido atribuida a una menor concentración de eritropoyetina circulante, no habiéndose aportado evidencia

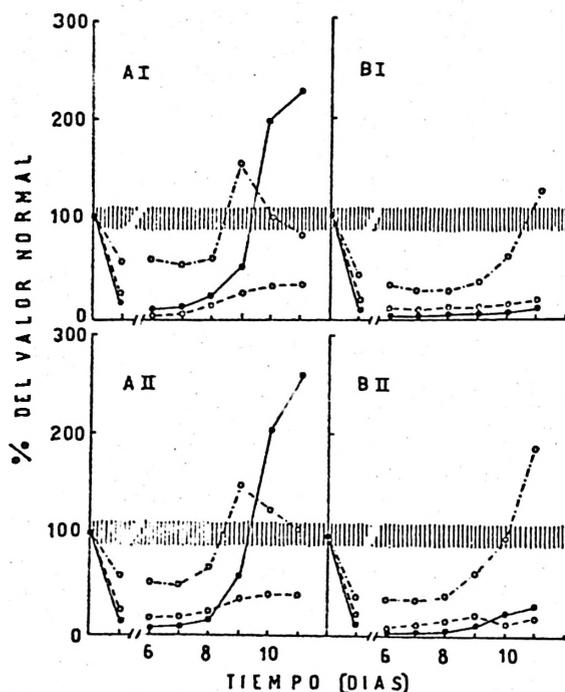


Fig. 1. Curso de la recuperación de la capacidad de incorporar ^{59}Fe por un fémur blindado (150 r) \circ — \circ — \circ ; un fémur irradiado (900 r) \circ — \circ — \circ y el bazo \bullet — \bullet — \bullet (900 r). La zona rayada indica los rangos de variación encontrados en 30 animales normales. Los valores hallados en los grupos irradiados se expresan en la ordenada como por ciento de los normales. En la abscisa se registran días después de la irradiación efectuada en día 0. Cada punto corresponde al promedio de valores encontrados en 8 animales. Condiciones experimentales de cada subgrupo, ver texto.

que indique que tal efecto pueda obedecer a otro mecanismo (4, 10, 11).

Los resultados que aquí comentamos muestran que el curso de la recuperación en animales con dieta normal, con o sin eritropoyetina es ya manifiesta en el día 8 y en el día 11 existe un *overshot* que lleva los valores de la actividad eritropoyética muy por encima de los normales. En nuestro estudio se agregan además los valores de la participación que tienen en esa respuesta los sectores estudiados. Ello per-

mite comprobar que la recuperación en el sector medular protegido supera ampliamente a la fracción medular irradiada. En contraste con la zona medular irradiada, la zona esplénica muestra una recuperación que adquiere una magnitud dominante y llega al término del período de observación a un valor de 200 % del normal, indicando que el proceso de emigración de elementos repobladores desde el sector protegido a las zonas destruidas por la irradiación y muy particularmente al bazo se cumple en una medida que permite la hiperplasia masiva observada en este órgano.

La supresión de proteínas en la dieta modifica el curso de esa recuperación, la que sólo se manifiesta y es muy ostensible en el sector medular protegido. Tal modificación de la recuperación resulta muy notable a nivel del área esplénica cuya pobre respuesta contrasta visiblemente con la que ocurre en animales con dieta normal.

La menor recuperación observada en BI podría obedecer a la hemoconcentración relativa (tabla I), que aparece durante el curso del ayuno y a la que contribuye fundamentalmente la reducción proporcionalmente mayor del peso corporal sin una paralela disminución de la masa sanguínea (20). La anemia que se desarrolla como consecuencia de la irradiación y que ha sido estudiada con detalle por SCHOLEY (18) y O'GRADY y col. (14) queda parcialmente enmascarada y no conduciría al aumento de la EP endógena que ocurre en AI. Sin embargo, la adición de eritropoyetina en BII solamente incrementa los valores de la ya aumentada actividad de la zona protegida. Resulta así evidente que el ayuno por un mecanismo distinto a la reducción de EP previene de alguna manera la repoblación de las zonas irradiadas y este hecho es más notable en el bazo.

En otro lugar (16) hemos propuesto como explicación para la abolición de la actividad eritropoyética en el sector esplé-

nico, encontrada en ratones no irradiados y con ayuno proteico, la posibilidad de que la carencia de proteínas en la dieta, si bien no actuaría como factor limitante en la formación de eritropoyetina ni tampoco causaría una pérdida de la capacidad de respuesta de los precursores indiferenciados de la clase 2 (eritropoyetina-sensible), afectaría de alguna manera la cinética de las *stem cells* de la clase 1 (compartimento más primitivo). Desde que el bazo tendría solamente unos pocos elementos de esta clase el ayuno proteico podría producir a través de la acción mencionada un efecto más dramático en esta área de la eritropoyesis. Los resultados aquí presentados abogan en favor de un deterioro de la capacidad de emigración, colonización o diferenciación de los elementos normalmente encargados de repoblar las zonas destruidas por la irradiación (*stem cells* de clase 1). Dicho efecto se cumpliría sin daño de la capacidad de dicha población celular de dar lugar por diferenciación *in situ* de sus elementos a la progenie de la clase 2, como parece indicarlo la respuesta observada en la zona blindada en los grupos BI y BII.

Una explicación así encontraría refuerzo en la comprobación de una menor capacidad de formar colonias de las suspensiones de células esplénicas de animales con ayuno proteico. Un estudio de los efectos de la privación de proteínas en la dieta sobre la capacidad de formar colonias de suspensiones celulares de la médula ósea y del bazo utilizando la técnica de TILL y McCULLOCH (13) se encuentra en desarrollo y será objeto de una publicación separada.

* * *

Expresamos nuestro agradecimiento al Doctor Humberto Elías Salum por su cooperación en la ejecución de los procedimientos de irradiación.

Resumen

Se estudió el efecto del ayuno proteico sobre el curso de la repoblación eritropoyética a partir de un fémur protegido en ratones irradiados. Se observó que la privación de proteínas anula casi completamente la repoblación que aparece en las áreas irradiadas entre los días 7 y 11 y en particular en el bazo, en los grupos con dieta normal. Sin embargo, en la zona medular protegida, no obstante el ayuno, la recuperación es similar a la observada en ese sector en animales con dieta normal. Estos cambios se interpretan como el resultado de un daño en la cinética celular de la población más primitiva que se expresa por la seria limitación de su capacidad de reabastecer otros sectores destruidos por la irradiación. Esta acción debe ser tenida en cuenta al tratar de explicar los mecanismos por los que el ayuno proteico suprime la actividad eritropoyética.

Summary

Effects of protein deprivation on the erythropoietic repopulation from a shielded femur in irradiated mice

In this work are studied the effects of protein deprivation on the course of the endogenous erythropoietic restoration from a shielded femur in heavily irradiated mice. The animals were given 150 rad total body x-irradiation which was followed by 750 rad with a hind limb shielded. The ^{59}Fe uptake capacity in the shielded and unshielded femur and in the spleen as well, was used as a parameter of the erythropoietic recovery. On day 7 to 8 the animals fed with a normal diet showed a clear recovery in the shielded medullary area followed on day 9 to 11 of a striking recovery in the spleen. The administration of daily injection of erythropoietin only caused an increase in these values without changes in the chronology of the erythroid repopulation.

Protein deprivation in the diet caused a change in this pattern of response. Although the shielded femur followed a similar course of recovery and proved able

to respond to erythropoietin stimulation, a lack of restorations of ^{59}Fe up take capacity was observed in the unshielded areas which was particularly noticeable in the spleen. This lack of recovery in the heavily irradiated areas is interpreted as a damage caused by protein starvation on the emigrating, colonizing or differentiating potentials of stem cells preserved in the shielded medular fractions.

Bibliografía

1. BECKER, A. J., E. A. McCULLOCH y J. E. TILL: *Nature*, **197**, 452, 1963.
2. BRUCE, W. R. y E. A. McCULLOCH: *Blood*, **23**, 216, 1964.
3. COTES, P. M.: *Ann. New York Acad. Scienc.*, **149**, Art. I, 12, 1968.
4. DUARTE, L., L. SÁNCHEZ MEDAL, J. LABARDINI y L. ARRIAGA: *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **125**, 1030, 1967.
5. FRIED, W., M. WEISMAN, D. MARTINSON y C. W. GURNEY: *J. Lab. & Clin. Med.*, **71**, 422, 1968.
6. FRUHMANN, G. J.: *Zeitschrift für Zellforschung*, **75**, 258, 1966.
7. FRUHMANN, G. J.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **124**, 728, 1967.
8. FRUHMANN, G. J.: *Blood*, **27**, 363, 1966.
9. HANKS, G. E.: *Nature*, **203**, 1313, 1964.
10. ITO, K., K. R. REISSMANN: *Blood*, **27**, 343, 1966.
11. ITO, K., J. W. SCHMAUS y K. R. REISSMANN: *Acta haemat.*, **32**, 257, 1964.
12. LOWY, P. H. y BORSOOK, H.: En *Erythropoietin*. L. O. JACOBSON, M. A. DOYLE, Grune & Stratton. N. Y. 1962, pág. 33.
13. TILL, J. E. y McCULLOCH, E. A.: *Radiat. Res.*, **14**, 213, 1961.
14. O'GRADY, L. F., J. P. LEWIS, R. D. LANGE y F. E. TROBAUGH: *Am. J. Physiol.*, **215**, 176, 1968.
15. PORTEOUS, D. D. y L. G. LAJTHA: *Brit. Haemat.*, **12**, 177, 1966.
16. SCARO, J. L.: *Acta Physiol. Latino Americana*. (En prensa.)
17. SCARO, J. L.: *Ann. New York Acad. Sc.*, **149**, 229, 1968.
18. SCHOOLEY, J. C.: *J. Cell. Physiol.*, **68**, 249, 1966.
19. STOLHMAN, F., Jr., S. EBBE, B. MORSE, D. HOWARD y J. DONOVAN: *Ann. New York Acad. Scie.*, **149**, 156, 1968.
20. WOHL, H. y MERSKEY, C.: *Am. J. Physiol.*, **206**, 762, 1964.