

III. ACCION DE LA TESTOSTERONA EN LA PRODUCCION DE ERITROPOYETINA EXTRA RENAL*

Dr. E. Oscar Zangheri,** Profesor Adjunto efectivo.

Oswaldo I. López, Ayudante de 1ª.

Marta Rodríguez de Figueroa, Ayudante de 1ª.

Luis M. Puscama, Ayudante de 1ª.

Eduardo Reta, Ayudante de 1ª.

Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.
Centro Universitario. Parque General San Martín, Mendoza, Argentina.

* Trabajo realizado con subsidios del CIUNC (Universidad Nacional de Cuyo) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

** Miembro de la Carrera del Investigador Científico, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas.

RESUMEN

La testosterona tiene influencia estimulante de la eritropoyesis. Se han descrito dos tipos de mecanismo de acción. Uno directo sobre eritroblastos y, por otra parte, un aumento en la producción de eritropoyetina. La segunda de las acciones se ha comprobado en animales enteros, mientras que en animales anéfricos es tema de controversia. Con objeto de dilucidar este problema, se inyectó a ratones machos adultos de la cepa CFW/ep, ciclopentilpropionato de testosterona (CPT) en dosis de 3 mg día por medio, totalizando 12 mg. Los animales fueron luego nefrectomizados y estimulados por anemia (fenilhidracina) e hipoxia hipobárica (0,4 atm.). La actividad eritropoyética de los plasmas se determinó por ensayo biológico mediante la captación de ⁵⁹Fe en los nuevos eritrocitos formados en ratones policitémicos. Se comprobó un aumento de 3 a 4 veces en la producción de eritropoyetina extra renal en los ratones inyectados con testosterona, respecto de los controles que sólo recibieron el vehículo. Se descartó la acción directa de la testosterona que pudiera contener el plasma ensayado. Podemos afirmar que la acción se debió a eritropoyetina, ya que el anticuerpo específico anti-eritropoyetina suprimió toda acción eritropoyética del plasma problema.

SUMMARY

In this paper we report our studies on the influence of testosterone on extrarenal erythropoietin production.

Adult CFW/ep male mice were injected with 12 mg of testosterone cyclopentylpropionate divided in four doses. Afterward the animals were bilaterally nephrectomized and strongly stimulated to produce erythropoietin by anemia (phenylhydrazine) and hypobaric hypoxia (0.4 Atm.). The erythropoietic activity of plasmas was determined by the ⁵⁹Fe incorporation into the new red blood cells induced in ex-hypoxic polycythemic mice. It was found that the erythropoietic action in the plasmas of the experimental group was more than threefold when compared with the action of control mice plasmas submitted to the same treatment, except the testosterone injection. The erythropoietic effect was not due to testosterone possibly present in the assayed plasmas. Furthermore, the effect was abolished by a specific antibody against erythropoietin.

INTRODUCCION

Se ha comprobado que dosis farmacológicas de testosterona, así también como diversos esteroideos de acción predominantemente anabólica, estimulan la eritropoyesis.^(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) Se han postulado dos tipos de mecanismos de acción. Uno directo sobre la serie eritroblástica y sus predecesores, y otro, aumentando la producción de eritropoyetina. Respecto del segundo de los mecanismos mencionados, se ha obtenido una comprobación directa por perfusión de riñón aislado de perro.⁽¹⁸⁾ Sin embargo, no existen en el tema estudios sistematizados referentes a fuentes extra renales.

En este trabajo hemos estudiado la influencia de la testosterona sobre la producción de eritropoyetina extra renal.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa CFW/ep. Los animales se inyectaron con 4 dosis de 3 mg cada una de ciclopentil-propionato de testosterona (CPT) en aceite, día por medio por vía subcutánea. Junto con la última dosis también recibieron una inyección de 2 mg de fenilhidracina que se repitió al día siguiente, con el objeto de conseguir un grado relativo de anemia. Los ratones que se usaron como controles se inyectaron sólo con el vehículo (aceite) y con la misma dosis de fenilhidracina. Tres días después de la segunda inyección del anemizante, tanto los animales experimentales como los controles fueron nefrectomizados bilateralmente, anestesiados con éter. Inmediatamente después se sometieron a presión hipobárica a 304 mm Hg

(0,4 atm.), durante 5 horas, como estímulo adicional para forzar la producción de eritropoyetina extra renal. Finalizada la hipoxia, se sangraron por punción cardíaca con jeringa heparinizada y se separó el plasma de los diferentes grupos, conservándose en congelador hasta su empleo.

La actividad eritropoyética de cada mililitro de plasma se determinó por ensayo biológico en ratones policitémicos ex hipóxicos, por medio de la captación de ^{59}Fe en los nuevos eritrocitos formados en la forma ya descrita en detalle.⁽¹⁹⁾ Brevemente, 1 ml de plasma se inyectó por mitades, separadas por intervalo de 24 horas, comenzando el séptimo día de finalizada la hipoxia. Al día siguiente de la segunda dosis, se inyectó aproximadamente 0,2 μCi de ^{59}Fe como FeCl_3 en una vena de la cola, y 48 horas después se extrajo una muestra de sangre por punción cardíaca, midiéndose la radiactividad en 0,5 ml y expresando los resultados en por ciento de captación en el volumen sanguíneo total, calculando éste en 7 % del peso corporal.⁽¹⁹⁾

Con el objeto de comprobar si la actividad eritropoyética de los plasmas problemas se debía a la presencia de eritropoyetina o no, se incubó el plasma de ratones experimentales con anti-

cuerpo antieritropoyetina obtenida en conejo. Para neutralizar "in vitro" el probable exceso de la antieritropoyetina, se realizó una segunda incubación con suero antigammaglobulina de conejo obtenido en oveja. Como control positivo se utilizó una alícuota del mismo plasma, incubándolo solamente con el anticuerpo anticonejo.

Con el fin de descartar la acción eritropoyética directa de la testosterona que pudiere estar presente en los plasmas problemas, se realizaron experimentos adicionales inyectando una dosis total de 12 mg de CPT a ratones del bioensayo, con el mismo esquema de inyección que para los plasmas.

Los resultados se sometieron a estudio estadístico mediante la prueba "t" de Student.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La actividad eritropoyética del plasma de los grupos de ratones anéfricos inyectados con CPT y de los grupos controles se muestran en la figura 1. Como puede apreciarse, la actividad eritropoyética de los plasmas de ratones que se inyectaron con CPT es más de 3 veces mayor que el de los controles que sólo recibieron el vehículo.

TABLA I

Neutralización del efecto eritropoyético del plasma experimental por anticuerpo específico y acción de la testosterona en los animales utilizados en el ensayo biológico

Material inyectado	N	% Captación ^{59}Fe	Confrontación estadística Respecto de	P
Plasma ratón (CPT) nef + Anti-Ep	5	1,02 \pm 0,39	Solución NaCl	NS
Plasma ratón (CPT) nef	5	21,39 \pm 3,33	Plasma ratón (CPT) + Anti-Ep	< 0,001
Solución NaCl 0,9 %	5	0,46 \pm 0,16		
CPT 12 mg	7	0,57 \pm 0,29	Solución NaCl	NS
CPT 12 mg	8	0,58 \pm 0,36	Solución NaCl	NS
Solución NaCl 0,9 %	5	0,43 \pm 0,23		

nef = nefrectomía bilateral. Anti-Ep = antieritropoyetina. CPT = ciclopentilpropionato de testosterona. N = número de animales. Promedio \pm error estándar.

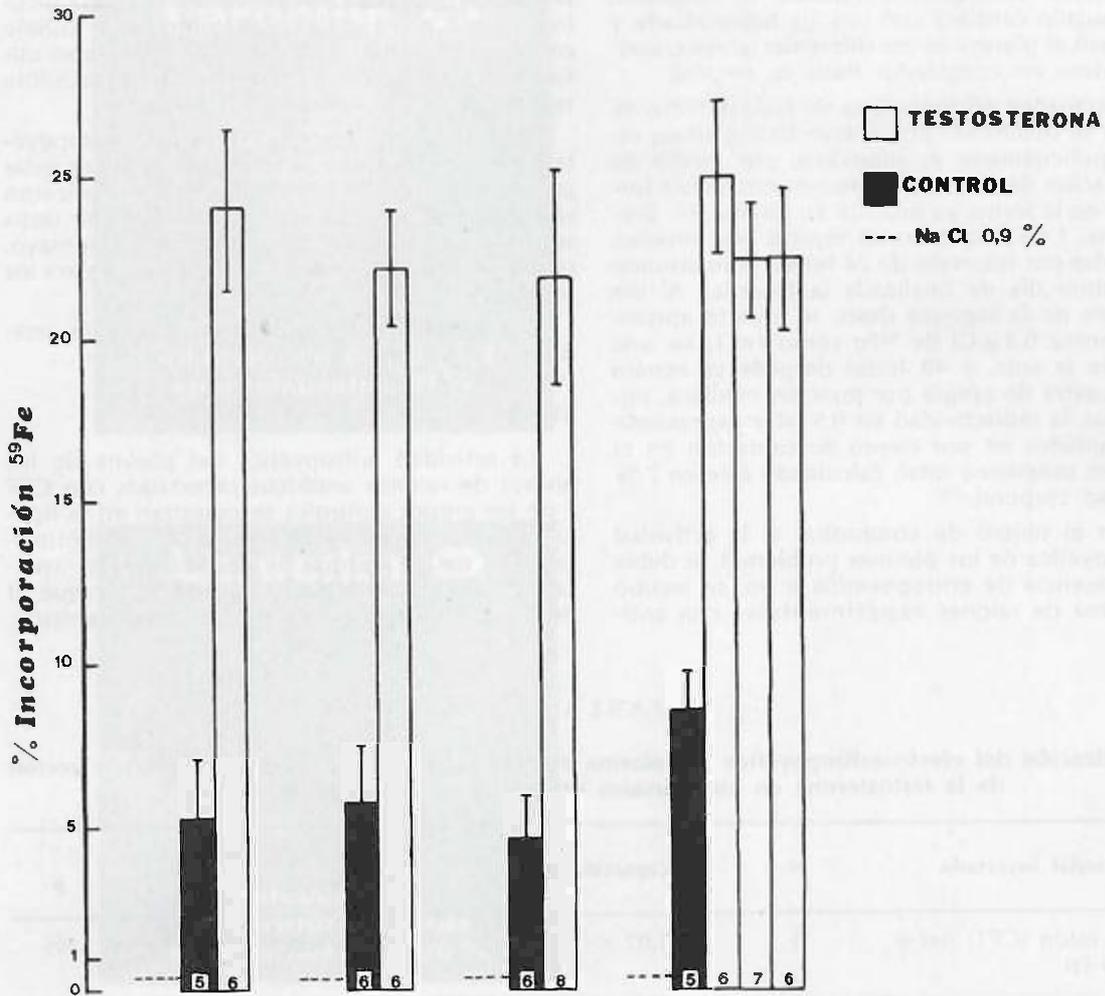
En la tabla I se dan los resultados obtenidos con el anticuerpo específico antieritropoyetina que inhibió la acción eritropoyética del plasma, y también se observa que en el tiempo en el cual transcurrió el ensayo biológico, una dosis tan elevada de CPT como el total recibido por los ratones experimentales (12 mg) no modificó la captación de ^{59}Fe .

Por las evidencias presentadas, podemos con-

cluir que la testosterona en dosis farmacológicas incrementa la producción de eritropoyetina extra renal.

Las barras representan el promedio de captación y las líneas verticales el error estándar. El número incluido en la parte inferior de cada barra es el número de animales inyectados. Cada grupo de barras corresponde a experimentos separados.

Figura 1. Acción eritropoyética del plasma de ratones anéfricos tratados con testosterona y controles en ratones policitémicos.



BIBLIOGRAFIA

- Fried, W.; DeGowin, R.; Gurney, C. W.: "Erythropoietic effect of testosterone in the polycythemic mouse". *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 117, 839-842, 1964.
- Gurney, C. W.; Fried, W.: "Further studies on the erythropoietic effect of androgens". *J. Lab. Clin. Med.*, 65, 775-782, 1965.
- Mirand, E. A.; Gordon, A. S.; Wenig, J.: "Mechanism of testosterone action on erythropoiesis". *Amer. J. Physiol.*, 210, 315-320, 1966.
- Fried, C. W.; Gurney, C. W.: "Erythropoietic effect of plasma from mice receiving testosterone". *Nature (Londres)*, 206, 1160-1161, 1965.
- Naets, J. P.; Wittek, M.: "Mechanism of action of androgens on erythropoiesis". *Amer. J. Physiol.*, 210, 315-320, 1966.
- Reisner, E. H.: "Effect of steroid hormones on hematopoiesis in vitro". *Blood*, 27, 460-469, 1966.
- Schooley, J. C.: "Inhibition of erythropoietic stimulation by testosterone in polycythemic mice receiving anti-erythropoietin". *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 122, 402-403, 1966.
- Fried, W.; Marver, D.; Lange, R. D., y col.: "Studies on the erythropoietic stimulation factor in the plasma of mice after receiving testosterone". *J. Lab. Clin. Med.*, 68, 947-951, 1966.
- Duarte, L.; Sánchez Medel, L.; Labardini, L., y col.: "The erythropoietic effects of anabolic steroids". *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 125, 1030-1032, 1967.
- Gordon, A. S.; Katz, R.; Zanjani, E. D., y col.: "Renal mechanisms underlying actions of androgens and hypoxia on erythropoiesis". *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 123, 475-478, 1966.
- Alexanian, R.; Vaughn, W. K.; Ruchelman, M. W.: "Erythropoietin excretion in man following androgens". *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 772-785, 1967.
- Shirakura, T.; Azuma, M.; Maekawa, T.: "Studies on erythropoietic action of testosterone". *Acta Haemat.*, 38, 49-56, 1967.
- Shirakura, T.; Azuma, M.; Maekawa, T.: "Effect of androgen antagonist on erythropoietic action of testosterone". *Acta Haemat.*, 40, 299-304, 1968.
- Medlinsky, J. T.; Napier, C. D.; Gurney, C. W.: "The use of an antiandrogen to further investigate the erythropoietic effects of androgens". *J. Lab. Clin. Med.*, 74, 85-92, 1969.
- Bozzini, C. E.; Alippi, R. M.: "The erythrogenic effect of steroids with predominant anabolic or androgenic activity in the polycythemic mouse". *Horm. Metab. Res.*, 3, 52-54, 1971.
- Mori, M.; Chiba, S.; Suzuki, S., y col.: "Effect of metholone acetate on erythropoietin responsive cells in rat bone marrow". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 60, 281-287, 1974.
- Fisher, J. W.; Moriyama, Y.; Lertora, J. J. L.: "Mechanisms of androgen stimulated erythropoiesis and inhibitors of heme synthesis in uremia". *Blood Cells*, 1, 573-597, 1975.
- Paulo, L. G.; Fink, C. D.; Roh, B. L., y col.: "Effects of several androgens and steroid metabolites on erythropoietin production in the isolated perfused dog kidney". *Blood*, 43, 39-47, 1974.
- Zangheri, E. O.; López, O. J.; Parisi, J. M., y col.: "Dose response curves to a single dose of erythropoietin in polycythemic mice". *Acta Physiol. Lat.-Amer.*, 22, 181-186, 1972.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. J. Espada, Profesor de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medi-

cina de la U. N. N. E., la provisión del anticuerpo antieritropoyetina. También agradecemos la eficaz colaboración técnica de la Sra. A. B. de Pelli-za y del Sr. J. Fiorentini.