

Mecanismos del efecto proliferativo de la eritropoyetina humana recombinante sobre las células endoteliales: papel de la endotelina-1

M. V. Alvarez Arroyo, M. A. Castilla, E. Bello, D. Tan, A. Riesco, F. R. González-Pacheco, S. Casado y C. Caramelo

Laboratorio de Nefrología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.

RESUMEN

La eritropoyetina humana recombinante posee efectos en otros tipos celulares además de los precursores eritroides. En el presente estudio hemos encontrado que la eritropoyetina humana recombinante favorece la proliferación de células endoteliales de aorta bovina pero solamente a altas concentraciones (> 5 U/ml). Contrariamente a lo sugerido por otros autores, nuestros hallazgos indican que el efecto de la eritropoyetina sobre las CEAB no depende de la endotelina-1. Estos hallazgos son de utilidad potencial para definir en qué circunstancias puede aparecer un efecto angiogénico relevante de la eritropoyetina.

Palabras clave: **Eritropoyetina. Célula endotelial. Endotelina-1.**

MECHANISMS OF PROLIFERATIVE EFFECT OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN ON ENDOTHELIAL CELLS: ROLE OF ENDOTHELIN-1

SUMMARY

Human recombinant erythropoietin has effects on cellular types other than the erythroid precursors. In the present study, we have found that human recombinant erythropoietin favors endothelial cells proliferation, albeit only at high concentrations (> 5 U/ml). In contrast to previous findings by other authors, our results suggest that the erythropoietin effect on BAEC is not dependent on endothelin-1. These findings are potentially useful to define when a prominent angiogenic effect of erythropoietin might appear.

Key words: **Erythropoietin. Endothelial cell. Endothelin-1.**

Recibido: 10-IX-97.

En versión definitiva: 18-XI-97.

Aceptado: 25-XI-97.

Correspondencia: Dr. C. A. Caramelo.

Universidad Autónoma de Madrid.

Fundación Jiménez Díaz.

Avda. Reyes Católicos, 2.

28040 Madrid.

INTRODUCCION

La eritropoyetina humana recombinante (RHuEPO) posee, junto a sus efectos sobre la producción eritrocítica, acciones sobre otros tipos celulares¹⁻⁶. Entre éstas, se ha observado que la RHuEPO es capaz de inducir proliferación de las células del endotelio vascular. Las vías de estimulación de esta proliferación son, sin embargo, desconocidas^{1,7}, aunque algunos autores han propuesto que la endotelina-1 (ET-1) es el mediador de los efectos vasculoproliferativos de la RHuEPO. Se ha referido que el tratamiento con RHuEPO aumenta los niveles circulantes de ET-1⁸⁻¹¹, pero este aumento no está relacionado necesariamente con la inducción de proliferación endotelial. La creciente aplicación terapéutica de la RHuEPO hace de importancia primordial el análisis de estos mecanismos. Por consiguiente, el propósito del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la RHuEPO sobre las células endoteliales, con particular referencia a la acción de la ET-1.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos de células endoteliales

Las células endoteliales de aorta bovina (CEAB) se obtuvieron y cultivaron según la técnica ya descrita en la literatura¹². La luz aórtica se incubó con 0,5 mg/ml de colagenasa tipo II (Sigma) a 37° C durante 20 min. Las células endoteliales se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, glutamina (5 mmol/l), penicilina (200 U/ml) y estreptomina (200 Fg/ml). Las células se utilizaron en la 1ª ó 2ª trypsinización. En todos los experimentos los estudios se hicieron en paralelo entre células control o expuestas a diferentes concentraciones de RHuEPO (1, 3, 5 y 20 U/ml).

Medida de Ca⁺⁺ citosólico por fura2

La concentración de Ca⁺⁺ citosólico [Ca⁺⁺]_i se midió con fura2, como se ha descrito previamente^{13,14}. Las CEAB confluentes se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron con fura2/AM (2 µM, 60 min, 37 °C) en PSS-Ca⁺⁺ (ClNa 140 mM, ClK 2,25 mM, Cl₂Ca 2 mM, Hepes 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7,4). Al final de la incubación las células se lavaron 3 veces con PSS-Ca⁺⁺ a 37 °C. Las mediciones de fluorescencia se realizaron con un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS50B en una cubeta termostatazada (37 °C). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 340, 380 y 500 nm, respectivamente. La [Ca⁺⁺]_i se calculó usando la ecuación de Grynkiewicz y Tsien, previamente descrita¹³. La constante de diso-

ciación (Kd) del fura2 para el [Ca⁺⁺]_i a la fuerza iónica de los tampones empleados se consideró como de 224 nM a 37 °C. La R_{max} y la R_{min} se determinaron en cada experimento individual por la adición de Tritón X-100 (0,1%) y EGTA (10 mmol/l), respectivamente.

Unión de la endotelina-1

La unión específica de la H³-endotelina-1 (actividad específica 52 Ci/mmol) a los receptores de membrana de las células endoteliales se midió en placas de 24 pocillos. Las células se estudiaron uno o dos días después de haber alcanzado la confluencia. Para este experimento, las células se lavaron dos veces con 500 µl de solución de unión (hepes 25 mM, pH 7,4; Cl₂Ca, 0,2 mM; ClNa, 120 mM; BSA al 0,2%; bacitracina al 0,02%; leupeptina 10 Fg/ml y PMSF 0,1 mM) y se incubaron durante 30 min a 37° en 500 µl de solución de unión que contenía H³-endotelina-1 (1-10 nM). Tras la incubación, la reacción se paró aspirando el medio y las células se lavaron cinco veces con Cl₂Mg frío 0,1 M. Las células se lisaron en 1 ml de Na OH, 0,5 M. La unión específica de ET-1 marcada se calculó restando de la unión total las uniones no específicas en presencia de un exceso de ET-1 no marcada (1 µM). Los parámetros de unión se calcularon por la curva de Scatchard, usando un programa computarizado (Enzfitter, ILL, EEUU).

Proliferación celular

La síntesis de DNA se examinó midiendo la incorporación de [H³]-timidina ([H³]-Thy). Los experimentos se llevaron a cabo en células subconfluentes (2 días después del sembrado, 60-70% de confluencia), en placas de 24 pocillos. Para las medidas de proliferación, las CEAB se sincronizaron en fase quiescente durante 24 horas de incubación en RPMI 1640 con 0,5% de SBF. En este punto, se añadieron los diferentes agentes durante 24 horas en RPMI que contenía 2,5% de SBF. La incorporación de [H³]-Thy se determinó dando un pulso con 0,25 µCi/placa de [H³]-Thy diluida en RPMI sin SBF durante las últimas 4 horas de incubación. Tras lavar 3 veces con medio fresco, las células se lisaron en 1 ml de NaOH 0,1 M, dos horas. Después de ajustar el pH con ClH (0,1 M), la reactividad se midió en un contador beta. El número de células se valoró por conteo en cámara de Neubauer, tras trypsinización.

Estudio estadístico

Los resultados se expresaron como el valor de la media ± EEM. De no indicarse lo contrario, cada valor corres-

ponde a un mínimo de 6 experimentos; en el caso de los estudios de proliferación celular, estos experimentos se hicieron por triplicado. El nivel de significación comparativo se analizó por ANOVA o test de «t» de Student emparejado o no emparejado según fuese apropiado. Se usó el test de Scheffé para comparaciones múltiples para determinar el nivel de significación de la p. Se consideró como significativo el valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

La incubación con RHuEPO indujo una proliferación significativa de células endoteliales a partir de una concentración de 5 U/ml, objetivada tanto por número de células como por conteaje de ³H-Thy (figs. 1 y 2). Concentraciones menores no ocasionaron un aumento en el número de células o captación de timidina tritiada por encima del basal (datos no mostrados).

Se realizaron estudios adicionales para analizar el posible papel de la ET-1 en el efecto proliferativo de la RHuEPO. En primer lugar, se observó la presencia

de un solo tipo de receptores de ET-1 en la CEAB. Las características cinéticas de este receptor indicaron una KD de 271 pM y una Vmax de 0,108 pmol/mg de proteína. La ET-1 indujo un aumento de las concentraciones de Ca⁺⁺_i en las CEAB (tabla I). En función de los resultados que mostraron la existencia de un solo tipo de receptor de ET-1, realizamos una serie de experimentos empleando un inhibidor específico de la unión de las endotelinas al receptor B, el IRL-1038¹⁵. Este compuesto a la concentración de 10⁻⁶ M, inhibió por completo la movilización de Ca⁺⁺ en las CEAB inducida por ET-1 (10⁻⁹ y 5 x 10⁻⁹ M). No se detectaron cambios debidos a IRL-1038 en los picos de [Ca⁺⁺]_i inducidos por otros agentes como ATP 10⁻⁴ M (datos no mostrados), indicando la especificidad de su efecto. La preincubación de las CEAB con IRL-1038 (10⁻⁶ M, 1 h) no produjo cambios significativos en el efecto proliferativo de la RHuEPO (fig. 3). En términos funcionales, la preincubación con RHuEPO no indujo cambios en la magnitud del cambio de [Ca⁺⁺]_i inducido por la ET-1 sobre las CEAB (tabla I).

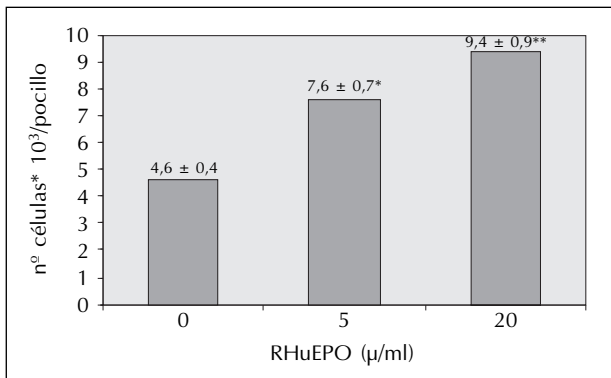


Fig. 1.—Cambios en el número de células inducidas por RHuEPO. Las incubaciones se realizaron durante 18 horas, en RPMI 1640 conteniendo 2,5% SBF.

* $p < 0,05$ con respecto al basal. ** $p < 0,01$.

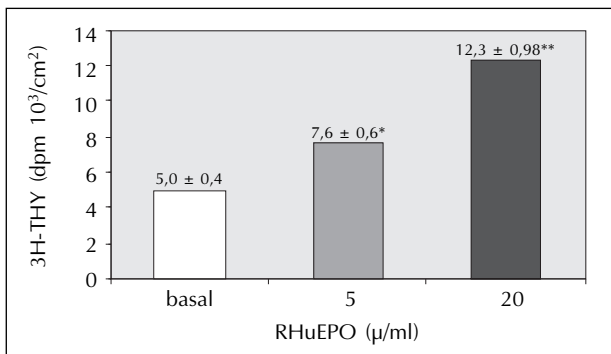


Fig. 2.—Cambios en la captación de timidina tritiada inducidos por RHuEPO. Las incubaciones se realizaron durante 18 horas, en RPMI 1640 + 2,5% de SBF.

Tabla I. Aumento de [Ca⁺⁺]_i con respecto al basal, medido por fura-2.

	CEAB Controles	CEAB TRATADAS con RHuEPO 20 U/ml
Tiempo	20 s	20 s
ET-1 (10 ⁻⁹ M) (n = 4)	160 ± 28	181 ± 33
ET-1 (10 ⁻⁹ M)+IRL-1038 (10 ⁻⁶ M) (n = 4)	12 ± 3 ^(*)	20 ± 2,4 ^(*)
ET-1 (10 ⁻⁸ M) (n = 5)	212 ± 21	223 ± 42

Las medidas de los efectos se expresan en los 20 s de la activación. ^(*) = $p < 0,001$ respecto a 10⁻⁹ M ET-1 en ausencia de IRL-1038.

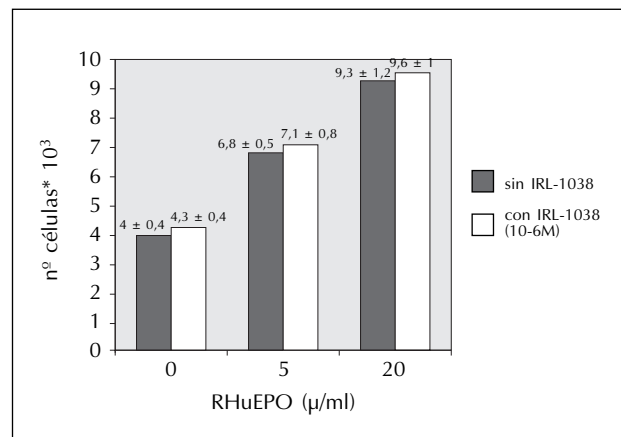


Fig. 3.—Ausencia de efecto del IRL-1038 sobre la proliferación de CEAB. No existen diferencias significativas entre las CEAB tratadas y no tratadas con IRL-1038. La significación respecto al basal fue idéntica a la observada en la figura 1.

El IRL-1038 no tuvo efectos *per se* sobre la proliferación de CEAB ni el $[Ca^{++}]_i$ (datos no mostrados).

DISCUSION

El presente estudio añade datos de utilidad potencial para entender el efecto de la RHuEPO sobre las células endoteliales. Los resultados indican la existencia de un efecto mitogénico de la RHuEPO sobre las CEAB, aunque sugieren que éste sólo ocurre a concentraciones elevadas de RHuEPO. Por otra parte, nuestros resultados contradicen lo reseñado en comunicaciones previas por Carlini y cols.⁷, y favorecen la posibilidad que la ET-1 no sea un factor relevante para el efecto proliferativo endotelial de la RHuEPO. Tanto los experimentos con el antagonista del receptor ETB, IRL-1038, como la ausencia de cambios debidos a RHuEPO en el pico de $[Ca^{++}]_i$ inducido por ET-1, favorecen esta falta de acción. La identificación de solo un tipo de receptor de ET-1 en las CEAB y los datos de la literatura en el mismo sentido¹⁶ dotan de mayor relevancia a estos resultados. Estos datos implicarían que la interpretación hecha por Carlini y cols.⁷ no debe considerarse como definitiva. En este sentido, si bien diversos autores han hallado un aumento de liberación de ET-1 en relación al tratamiento de humanos, animales de experimentación o células endoteliales con RHuEPO^{7,8,11}, no se ha hallado una correlación significativa entre el incremento de ET-1 y el aumento de proliferación de células endoteliales en cultivo debido a RHuEPO^{8,11}. Esta falta de correlación favorece la posibilidad de que ambos, aumento de ET-1 y proliferación, sean fenómenos simultáneos en el tiempo pero independientes entre sí en cuanto a estar enlazados en una secuencia de mecanismos. Más aún, observaciones realizadas por López Ongil y cols. sugieren que el incremento de producción de ET-1 no es un componente relevante de la respuesta endotelial a la RHuEPO¹⁷. Puesto que Carlini y cols.⁷ usaron anillos aórticos como modelo de proliferación endotelial, puede proponerse la hipótesis alternativa de que el efecto de la ET-1 observado en sus estudios se deba en realidad a crecimiento de pericitos o células de músculo liso vascular creciendo desde los explantes aórticos. En este sentido, se ha descrito recientemente que una parte importante de los fenómenos angiogénicos en el modelo de anillo aórtico pueden estar relacionados con el desarrollo de pericitos^{18,19}. Los hallazgos de nuestros experimentos permiten hipotetizar la posible existencia de dos efectos coexistentes de la RHuEPO sobre los vasos sanguíneos: uno dependiente de ET-1, que no provocaría proliferación endotelial sino

de otros tipos celulares de la pared vascular y uno independiente de ET-1, que sería responsable de la proliferación endotelial. Información obtenida recientemente en nuestro laboratorio sugiere que en este caso estaría involucrado un mecanismo dependiente de quinasas de tirosina (Alvarez Arroyo y cols., datos sin publicar). Por otro lado, es posible que un efecto logarítmico no lineal pueda pasar desapercibido al no estudiarse un número más elevado de experimentos. De todos modos, de existir tal efecto, su significación biológica sería marginal. Una última alternativa, que excede el marco del presente estudio, es que el efecto de la ET-1 pueda ser diferente dependiendo del tipo particular de célula endotelial; en este sentido, es conocida la heterogeneidad de los endotelios, especialmente entre pequeños y grandes vasos.

Los presentes resultados pueden contribuir a enmarcar los efectos de la RHuEPO sobre el endotelio vascular. En primer lugar, sugieren que sólo altas dosis de este agente tendrían una influencia significativa sobre la proliferación vascular. En este sentido, debe recordarse que en estudios farmacocinéticos con RHuEPO se han observado valores plasmáticos ligeramente superiores a 3 U/ml tras la administración endovenosa^{20,21}, mientras que sólo se alcanzan cifras de aproximadamente 10 veces menos en el caso de la aplicación subcutánea. Estas cifras llevan a que debemos considerar que la probabilidad que la RHuEPO empleada para el tratamiento de enfermos con anemia de la insuficiencia renal tenga acciones angiogénicas notables es, cuanto menos, remota. Los máximos aumentos de eritropoyetina endógena ocurren en anemias con inhibición de la producción medular o aumento de la destrucción periférica de hematíes, llegándose en raras ocasiones a valores cercanos a las 10 U/ml, que están en un rango similar al empleado en nuestro estudio y que podrían dar lugar a efectos angiogénicos²². Sin embargo, carecemos todavía de evidencias clínicas o experimentales acerca de estos posibles efectos *in vivo*, que nos permitan ilustrar la verdadera correlación con los niveles alcanzados y sería interesante que se realice un estudio en este sentido. Existe, sin embargo, una situación donde el efecto angiogénico de la eritropoyetina puede tener un interés especial: la producción de la misma por parte de células de tumores malignos (carcinoma de células renales, hepatomas, linfomas), en los que la eritropoyetina podría cumplir un papel favorecedor de la angiogénesis; en este sentido, parece tener interés especial la coexpresión de eritropoyetina y genes ligados a la producción de factores de crecimiento, como el caso de los tumores renales asociados a la enfermedad de Von Hippel Lindau^{23,24}.

Por último, queremos reflexionar sobre la posible aplicación de tratamientos con RHuEPO como favorecedores del desarrollo de vascularización, que abarcan la mejoría de las enfermedades con un componente de isquemia crónica. El aclarar estos aspectos requiere, sin embargo, de diseños experimentales y de investigación clínica específicos.

Notas y agradecimientos

MVAA es una investigadora postdoctoral de la Comunidad Autónoma de Madrid/Fundación Renal Alvarez de Toledo. MAC es becaria de la Fundación Conchita Rábago. DT es un *fellow* de la International Society of Nephrology. AR es becaria del Ministerio de Educación y Ciencia y EB es becaria del Ministerio de Sanidad. Los investigadores quieren agradecer a Boehringer Mannheim, al Instituto Reina Sofía de Investigaciones Renales y a Caramelo S.A. por su ayuda para la financiación de este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M: Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87: 5978, 1990.
- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT: Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91: 3974, 1994.
- Sterin-Borda L, Wald M, Gutnisky A, Casanova M, Arana R, Borda E: Myocardial mitogenic effect of erythropoietin through the activation of Na⁺-K⁺ ATPase activity. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 44: 1, 1994.
- Gogusen J, Zhu DL, Heremert T, Ammar Guejjat F, Marche P, Dveke T: Effect of erythropoietin on DNA synthesis, protooncogene expression and phospholipase C activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 977, 1994.
- Ling BN, Li B, Marrero MB: Erythropoietin-induced tyrosine phosphorylation stimulates phospholipase-C-1 and Ca²⁺ channels in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 7: 1681, 1996 (abstract).
- Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F: Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth cells. *Atherosclerosis* 78: 225, 1989.
- Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M: Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 47: 740, 1995.
- Carlini RG, Dusso AS, Obialo CL, Alvarez UM, Rothstein M: Recombinant human erythropoietin increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 43: 1010, 1993.
- Bode-Boger SM, Boger RH, Kuhn M, Radermacher J, Frolich JC: Endothelin release and shift in prostaglandin balance are involved in the modulation of vascular tone by recombinant erythropoietin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2220: 525, 1992.
- Buemi M, Morabito M, Palella S: Influence of recombinant erythropoietin on the production of endothelin-1 from human umbilical artery. *Nephron* 64: 165, 1993.
- Nagai T, Akizawa T, Nakashima Y, Kohjiro S, Nabeshima K, Kanamori N, Takayama K, Kinugasa E, Koshikawa S: Effects of RHuEPO on cellular proliferation and endothelin-1 production in cultured endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 10: 1814, 1995.
- López Farr JA, Riesco A, Espinosa G, Digjuni E, Cernadas MR, Alvarez V, Montón M, Rivas F, Gallego MJ, Egido J, Casado S, Caramelo C: Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 88: 1166, 1993.
- Okada K, Caramelo C, Tsai P, Schrier RW: Effect of inhibition of Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase on vascular action of arginine-vasopressin. *J Clin Invest* 86: 1241-1248, 1990.
- Caramelo C, Tsai P, Okada K, Briner V, Schrier RW: Mechanisms of rapid desensitization of arginine vasopressin in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 260 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 29): F36, 1991.
- Urade Y, Fujitami Y, Oda K, Watakabe T, Umemura I, Takai M, Okada T, Sakata K, Karaki H: An endothelin B receptor-selective antagonist: IRL 1038 (Cys¹¹-CYS¹⁵)-endothelin-1 (11-21). *FEBS* 311: 12-16, 1992.
- Morbideilli L, Orlando C, Maggi CA, Ledda F, Ziche M: Proliferation and migration of endothelial cells in promoted by endothelins via activation of ETB receptors. *Am J Physiol* 269 (Heart, Circulatory and Cardiovascular Physiol 33) H686-H693, 1993.
- López Ongil S, Saura M, Lamas S, Rodríguez M, Rodríguez Puyol D: Recombinant human erythropoietin does not regulate the expression of endothelin-1 and constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Exp Nephrol* 4: 37, 1996.
- Nehls V, Schuchardt E, Drenckhahn D: The effect of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and pericytes on sprout formation of endothelial cells in a fibrin gel angiogenesis system. *Microvasc Res* 48: 349, 1994.
- Nicosia RF, Villaschi S: Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 73: 658, 1995.
- MacDougall IC, Neubert P, Coles GA: Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Lancet* 8635: 425-427, 1989.
- Neumayer HH, Brockmüller J, Fritschka E, Roots Y, Scigalla P, Watenberg M: Pharmacokinetics of human recombinant erythropoietin after subcutaneous administration and in long term intravenous treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contr Nephrol* 76: 131-142, 1989.
- Erslev AJ, Wilson J, Caro J: Erythropoietin titers in anemic, non-uremic patients. *J Lab Clin Med* 109: 429-433, 1987.
- Mukhopadhyay D, Knebelman B, Cohen HT, Sukhatme VP: The Von Hippel-Lindau gene product interacts with Sp 1 to repress vascular endothelial growth promoter activity. *J Am Soc Nephrol* 7: 1662, 1996 (abstract).
- Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleen B, Martiny-Banon G, Marme D: Evidence of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56: 2299, 1996.