



## Artículo Original

# Expresión diferencial de isoformas del factor inducible por hipoxia (hif-1 $\alpha$ y hif-2 $\alpha$ ) en bazo y médula ósea en un modelo murino

Todaro, Juan S.; Stoyanoff, Tania R.; Conti, María I.; Aguirre, María V.

## RESUMEN

Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) regulan la adaptación a la hipoxia (H) y protegen a las células induciendo la transcripción de múltiples genes. Se propone estudiar la expresión de las isoformas HIF1 $\alpha$  y HIF2 $\alpha$  en tejidos hematopoyéticos MO y Bz durante 15 días de Hipoxia Hipobárica (HH) relacionarlos con la cinética de expresión de EPO-R y factores determinantes de la eritropoyesis GATA-1 y NFE2. Se utilizaron ratones CF1, sometidos a HH 0,4 atm de 0 a 15 días. A cada tiempo, se extrajeron fémures y Bz para la obtención de extractos, fraccionamiento proteico e inmunoblotting. Se determinaron parámetros hematológicos standard. La apoptosis fue cuantificada por TUNEL. HIF $\alpha$  fue evaluado en sus dos isoformas. En MO y Bz el factor de transcripción aumenta y es mayor desde el día 1 de HH en Bz. Niveles máximos de HIF1 $\alpha$  se verifican al día 3 en MO y a partir del día 5 en Bz. HIF2 $\alpha$  en MO presenta expresión máxima al día 2 con posterior descenso, donde la MO retoma el control de la eritropoyesis. En Bz, HIF2 exhibe patrón irregular, conservando aumentos de su inmunodetección en función de la H. Epo-R se expresa desde día 1 en MO y Bz en un patrón similar de comportamiento a GATA-1. NFE2 tiene una cinética diferencial con progresión de ascenso en MO conforme aumentan los días de H observándose un máximo al día 15 mientras que el Bz muestra paulatino descenso en función de la adaptación medular a la H. Esto sugiere que en el Bz y MO se verifican procesos adaptativos coexistentes de expansión/sobrevivencia y apoptosis de progenitores eritroides. En Bz predomina una eritropoyesis compensatoria. En MO por el contrario predomina apoptosis temprana con posterior recomposición y control de la expansión del compartimiento eritroideo. HIF1 y HIF2 se sobreexpresan en ambos tejidos, sin embargo la eritropoyesis esplénica está ligada al control de HIF1 $\alpha$  ya que aparentemente HIF2 $\alpha$  estaría asociada a la supervivencia de otros tipos celulares esplénicos durante el estrés hipóxico

Palabras clave: Hipoxia hipobárica; Factores Inducibles por Hipoxia; Eritropoyesis

## INTRODUCCION

La hipoxia tisular se produce cuando hay un desequilibrio entre la oferta y el consumo de oxígeno. La creciente evidencia de estudios experimentales y clínicos señala el papel fundamental en los cambios inducidos por la hipoxia fisiológicamente en la eritropoyesis, la angiogénesis, la proliferación y la diferenciación y en situaciones fisiopatológicas en el cáncer, isquemia/reperfusión y los accidentes cerebrovasculares<sup>1</sup>.

En un estado homeostático la eritropoyesis es constante y la producción de nuevos eritrocitos en su mayor parte se limita a la médula ósea. Ante condiciones de hipoxia se activan una serie de eventos adaptativos para aumentar el suministro de oxígeno. En el ratón adulto, la eritropoyesis se produce en el bazo frente al estrés hipóxico<sup>2</sup>. Los factores inducibles por Hipoxia (HIFs) regulan la adaptación celular a la hipoxia y protegen a las células induciendo la transcripción de múltiples genes<sup>3</sup>.

### OBJETIVO

Estudiar la expresión de las isoformas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en tejidos hematopoyéticos Médula Ósea (MO) y Bazo (Bz) durante 15 días de Hipoxia Hipobárica (HH) y relacionarlos con la cinética de expresión de EPO-R y factores determinantes de la eritropoyesis (GATA-1 y NF-E2)



## MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones CF-1, de 3 meses de edad fueron sometidos a hipoxia hipobárica 0,4 atm correspondiente a 5800 mts en cámara durante 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 días. Al término de cada tiempo experimental, seis ratones por lote fueron sacrificados bajo anestesia por dislocación cervical extrayéndose fémures y bazos para la obtención de suspensiones de células.

Fueron extraídos los bazos (Bz) de cada animal, se obtuvieron células del bazo, disgregando el tejido a través de malla estéril por lavado con solución fisiológica y de Médula Ósea (MO) se vaciaron de su contenido por lavado con solución fisiológica y se realizaron suspensiones celulares. La suspensión celular fue resuspendida en  $\alpha$ -Medium (Sigma) con 10% de FBS (Genser, Argentina). Los eritrocitos removidos por lisis en solución hipotónica (0.8% Cl NH<sub>4</sub>, 17 mM Tris-Cl pH7.4). Las células nucleadas totales fueron contadas en hemocitometer y la viabilidad evaluada por el ensayo del trypan blue al 0.2 %. En preparaciones teñidas con May Grünwald Giemsa, se clasificaron los precursores de acuerdo a los criterios standard.

Se determinaron parámetros hematológicos de sangre periférica por punción cardíaca bajo anestesia. Se determinó hemoglobina en Multisizer<sup>3</sup> Coulter Counter (Beckman) y hematocrito por el método standard. Los resultados son expresados como porcentaje ( $\pm$ SEM) por triplicado. Los extractos proteicos de Bazo y Médula ósea (citósolicos y nucleares) obtenidos a cada día de la experiencia se incubaron a 4°C en buffer dodecil sulfato sódico 4%, EDTA 1mM, DTT 3.24 mM, glicerol 12.5 %, azul de bromofenol 0.002 % y analizados en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Anticuerpo específico utilizado en fracción citosólica: receptor de eritropoyetina (Epo-R), (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA). Anticuerpos específicos en fracción nuclear: HIF-1  $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , NF-E2 y GATA-1(Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA). Los inmunocomplejos son visualizados después de la incubación con anticuerpos secundarios anti- IgG de conejo; anti-IgG de cabra; anti-IgG de rata marcada con horseradish peroxidasa (Jackson Immunoresearch Inc, USA). Para el revelado se utilizó el sistema OPTI-4C (BioRad Sciencies). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas utilizando el sistema del NIH Scion Image 1.0 (NHS, USA)<sup>4</sup>

Con el objetivo de localizar y cuantificar células apoptóticas en secciones de Bz y MO, se realizó el ensayo de TUNEL in situ utilizando el kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, las secciones (4  $\mu$ m) fueron incubadas primero con solución permeabilizante (0.1% Triton, 0.1% citrato de Sodio) y posteriormente fueron tratadas TdT a 37°C por 60 min, lavadas y montadas para observación en microscopio de fluorescencia. Finalmente, los núcleos apoptóticos (TUNEL positivos) se tiñeron positivamente con fluoresceína verde. Se contaron un total de 500 células en diez campos al azar con alto aumento (x400) y las imágenes de las células apoptóticas fueron obtenidas usando un microscopio equipado con Y-FL epifluorescencia con cámara digital. Como control negativo se obvió la incubación con la enzima TdT.

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células TUNEL positivas (media  $\pm$  SEM) por triplicado.<sup>5</sup>

Los resultados fueron analizados por medio del Software INSTAT 4.0 y PRISM versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.), y se expresarán como la media  $\pm$  S.E.M.,



considerando significativo un  $P < 0.05$ . Las imágenes fueron tratadas utilizando software Adobe Photoshop versión 12.01.

## RESULTADOS

En los parámetros hematológicos en sangre periférica (hematocrito, hemoglobina y reticulocitos periféricos), se observa un patrón similar de crecimiento continuo en respuesta al estímulo hasta el final de la experiencia, sin alcanzar valores cercanos a la normalidad (Fig. 1).

**Figura 1.** Parámetros hematológicos eritroides periféricos.

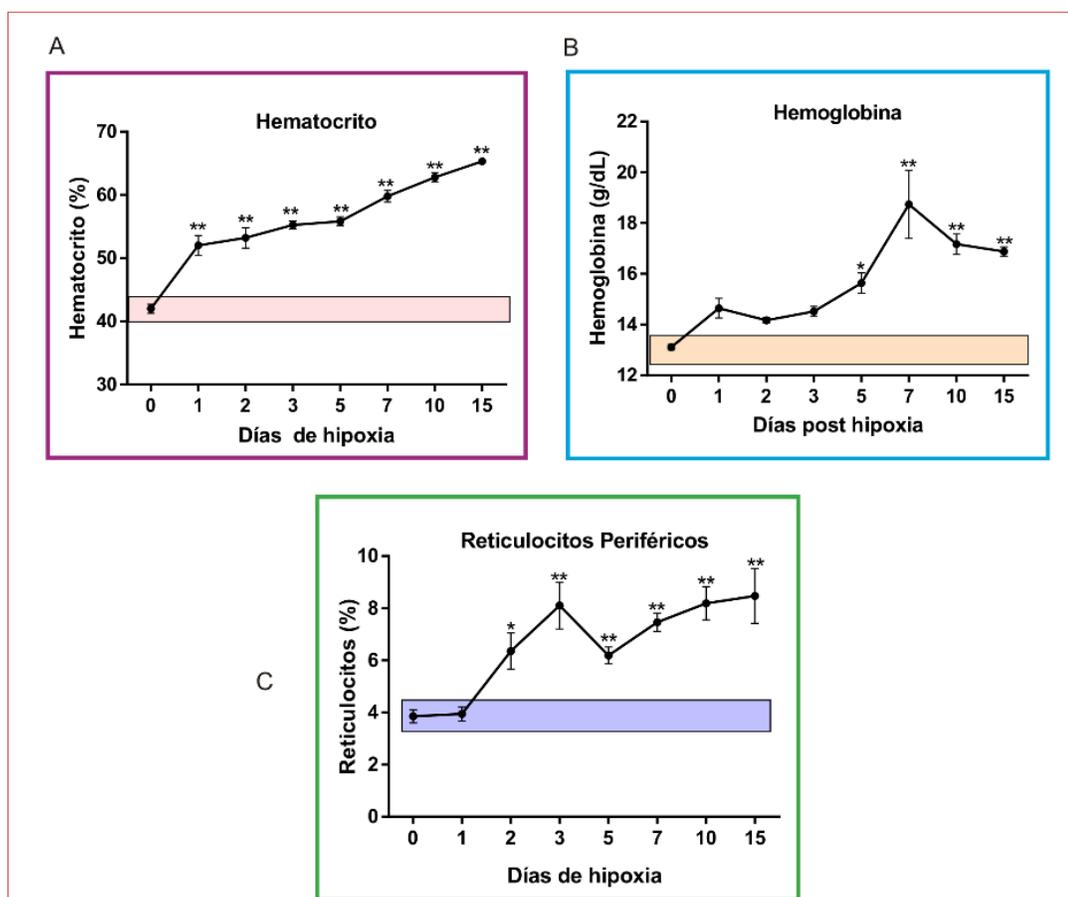


Tabla 1

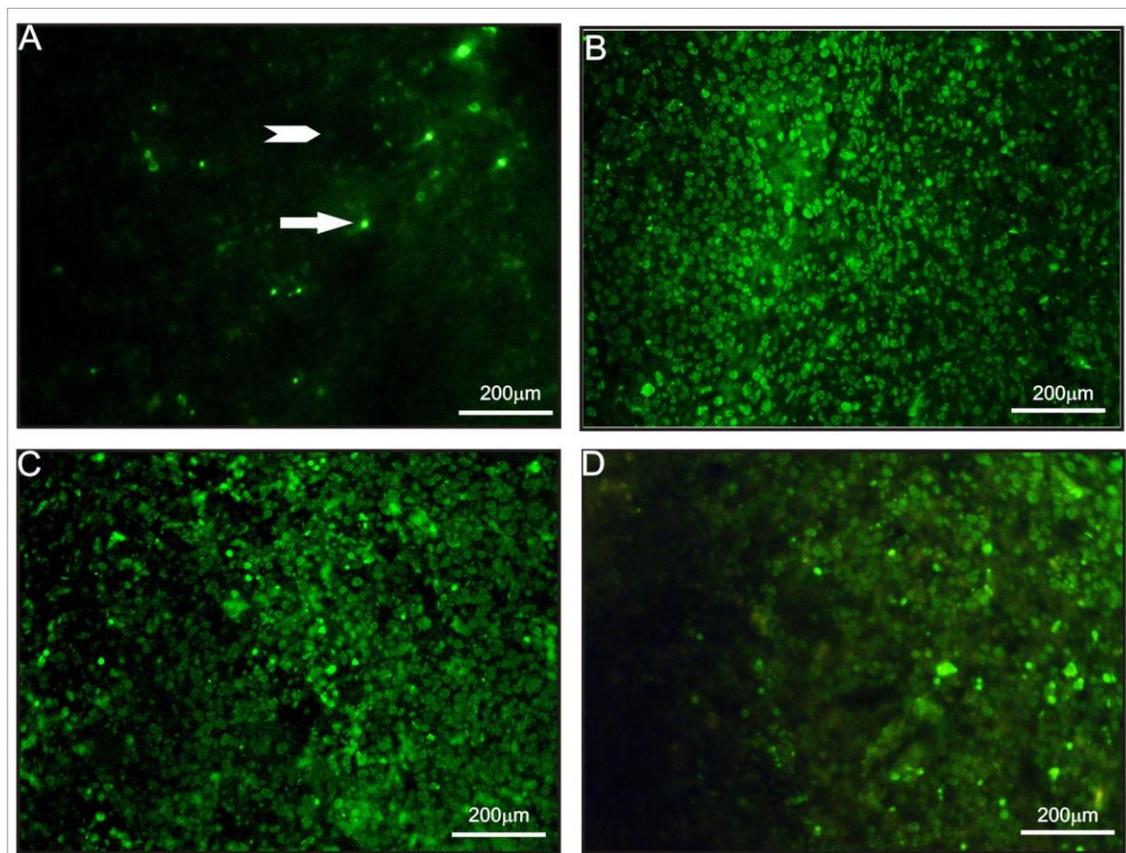
Días en Hipoxia	MO			Bz		
	Células $\cdot 10^6$ / fémur (Media $\pm$ SEM)			Células $\cdot 10^6$ / bazo (Media $\pm$ SEM)		
	Eritroide	Mieloide	Linfoide	Eritroide	Mieloide	Linfoide
0 Día	1,23 $\pm$ 0,01	7,50 $\pm$ 0,35	4,83 $\pm$ 0,20	5,76 $\pm$ 0,30	2,64 $\pm$ 0,54	37,52 $\pm$ 0,57
1 Día	1,17 $\pm$ 0,05	9,65 $\pm$ 0,71	4,66 $\pm$ 0,35	48,70 $\pm$ 3,47 **	3,62 $\pm$ 0,08	23,86 $\pm$ 3,15
2 Días	1,94 $\pm$ 0,14	9,47 $\pm$ 0,49	4,20 $\pm$ 0,37	58,14 $\pm$ 2,37 **	7,99 $\pm$ 0,73 **	47,03 $\pm$ 3,79
3 Días	4,33 $\pm$ 0,49 **	14,13 $\pm$ 0,20 **	7,14 $\pm$ 0,29	69,63 $\pm$ 7,62 ***	7,26 $\pm$ 0,42 **	62,89 $\pm$ 8,24 **
5 Días	4,84 $\pm$ 0,87 **	21,10 $\pm$ 1,15 **	11,07 $\pm$ 0,45 **	32,78 $\pm$ 8,88 **	4,14 $\pm$ 0,03	42,71 $\pm$ 1,07
7 Días	5,85 $\pm$ 0,05 **	17,37 $\pm$ 0,01 **	7,17 $\pm$ 1,39	15,64 $\pm$ 0,20 *	2,67 $\pm$ 0,30	12,01 $\pm$ 0,44 **
10 Días	3,94 $\pm$ 0,13 **	18,67 $\pm$ 0,55 **	6,73 $\pm$ 0,58	10,98 $\pm$ 0,49	1,49 $\pm$ 0,05	26,01 $\pm$ 1,59
15 Días	2,75 $\pm$ 0,30 *	23,07 $\pm$ 1,30 **	6,50 $\pm$ 1,22	9,39 $\pm$ 0,38	1,17 $\pm$ 0,14	16,66 $\pm$ 0,72 **



Se ilustran las variaciones en (A) los hematocritos (%), (B) la concentración de hemoglobina (g/dl) y (C) el porcentaje de reticulocitos periféricos, durante el período de hipoxia estudiado. El área sombreada indica el rango de variación de los valores basales. En la Tabla 1 se observan las celularidades absolutas de las diferentes líneas hematopoyéticas. Estas fueron calculadas a partir de las celularidades totales y los diferentes porcentajes de cada linaje. Las determinaciones se realizaron por triplicado a cada día del esquema experimental. Los resultados están expresados como promedio de células / x 10<sup>6</sup> ± SEM. \*\*\* p< 0.001, \*\* p<0.01 y \*p< 0.05 indican diferencias significativas de cada lote hipóxico con respecto al control.

Los ensayos de TUNEL "in situ", confirmatorios de la apoptosis celular, teniendo en cuenta los máximos índices apoptóticos hallados previamente con la técnica de doble fluorocromos (naranja de acridina/bromuro de etidio) y los días de mayor expresión de la proteínas proapoptótica (Bax) y de la enzima ejecutora (caspasa-3) dosados por inmunoblottings en bazo y médula ósea respectivamente (en estudios previos) demostraron comportamientos diferenciales, ya que en Bz se observa un aumento paulatino de la apoptosis a partir del día 3 de la experiencia, llegando a un pico máximo en el día 7 y disminuyendo paulatinamente hasta el final de la experiencia; mientras que en la MO se pueden observar máximos índices apoptóticos a partir del día 1 de la experiencia, con paulatino descenso también hacia el día 15, confirmando procesos adaptativos relacionados con la apoptosis y sobrevivencia. (Figuras 2, 3 y 4).

#### Ensayo TUNEL in situ en Bazo

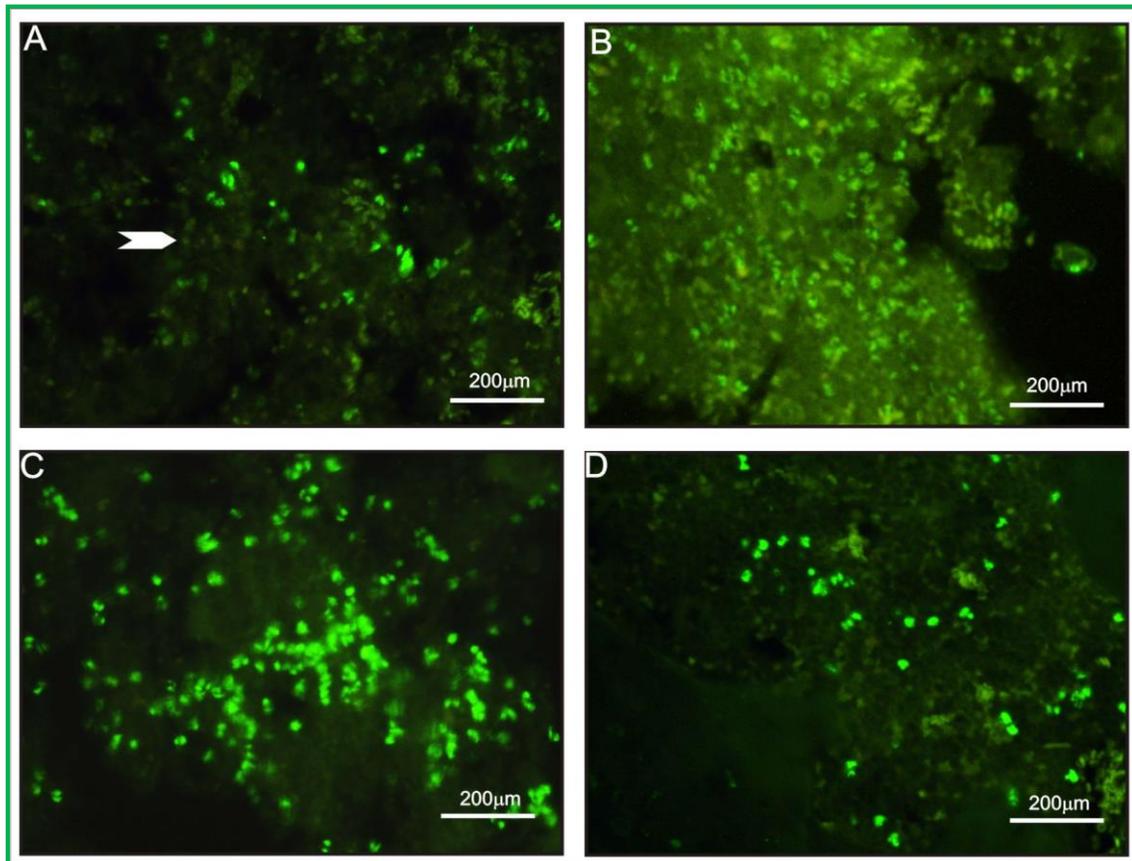




**Figura 2: Ensayo de TUNEL in situ en bazo.** Las microfotografías representativas de los días 0 (A), 3(B), 7(C) y 10 (D) de hipoxia hipobárica en preparados de bazo. Los núcleos de células apoptóticas exhiben fluorescencia verde. Magnificación 400x. Las barras indican 200 $\mu$ m.

La hipoxia causa en el tejido esplénico aumento de la apoptosis desde el tercer día de hipoxia sistémica (B), la que llega a ser máxima al día 7 (C) descendiendo paulatinamente hacia el día 10 de la experiencia (D).

Ensayo de TUNEL en MO

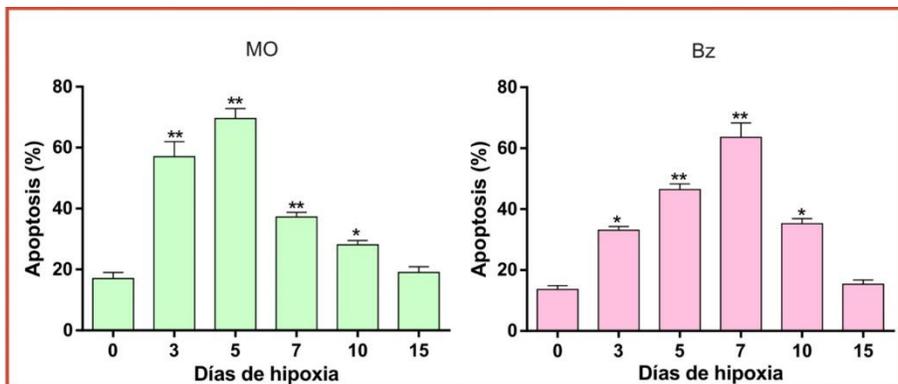


**Figura 3:** Ensayo de TUNEL in situ en médula ósea. Microfotografías representativas de los días 0 (A), 1(B), 7(C) y 10 (D) de hipoxia hipobárica en preparados de médula ósea descalcificada. Los núcleos de células apoptóticas exhiben fluorescencia verde. Magnificación 400x. Las barras indican 200 $\mu$ m.

La hipoxia causa en médula ósea un aumento máximo de la apoptosis al primer día de hipoxia sistémica (B), descendiendo progresivamente desde el tercer día (C). La muerte celular programada retorna a niveles compatibles con la normalidad hacia el día 10 de la experiencia (D).

El análisis de los porcentajes de células TUNEL positivas en cada tejido (Figura 4) reveló que en el Bz la apoptosis exhibió un aumento progresivo hasta alcanzar un máximo al séptimo día ( $p < 0.05$ ) con subsecuente disminución de los valores hacia el fin de la experiencia.

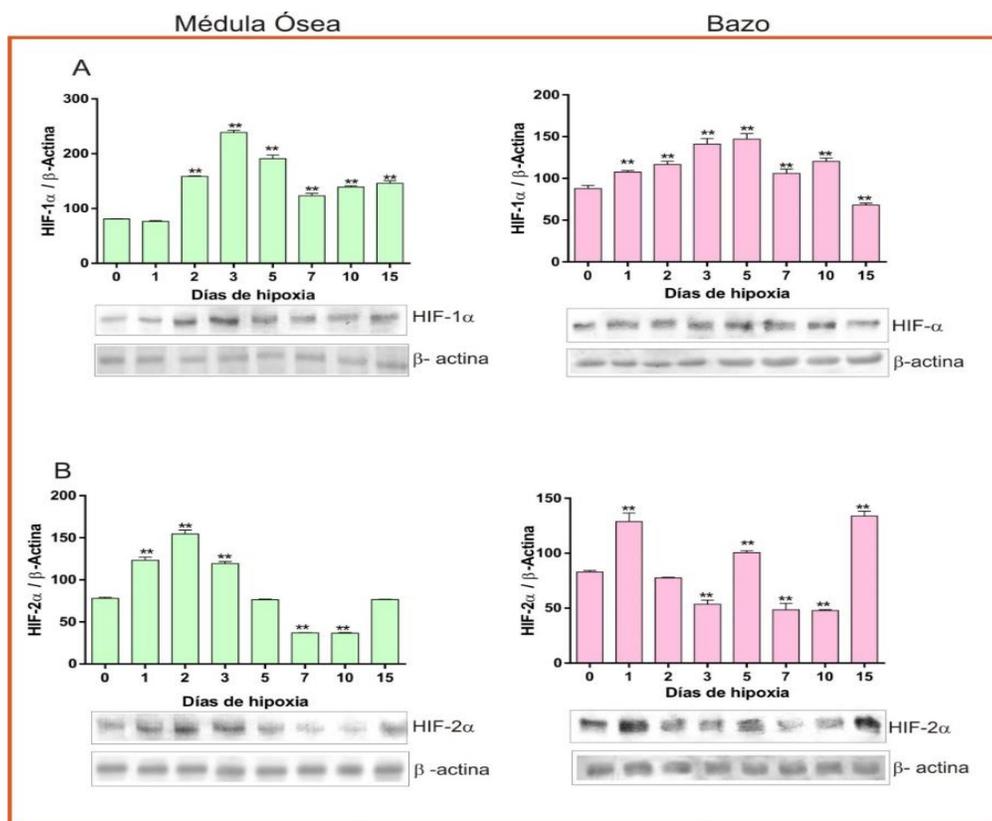
Por el contrario, los porcentajes de células apoptóticas en la MO mostraron un drástico aumento en los dos primeros días posteriores al estímulo hipóxico (máximo al día 2), que disminuyó progresivamente hacia el final de la experiencia



**Figura 4.** Porcentaje de células TUNEL positivas en MO y Bz durante la hipoxia.

Los resultados se indican como el porcentaje promedio  $\pm$  S.E.M. de células medulares y esplénicas TUNEL (+). Las determinaciones se obtuvieron a partir de controles (n=6) y de animales hipóxicos (n=6) a cada tiempo experimental. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  indican diferencias significativas contra el control.

El factor inducible por hipoxia (HIF) alfa fue evaluado por inmunoblotting (Figura 5) en sus dos isoformas (HIF-1  $\alpha$  y HIF-2  $\alpha$ ).



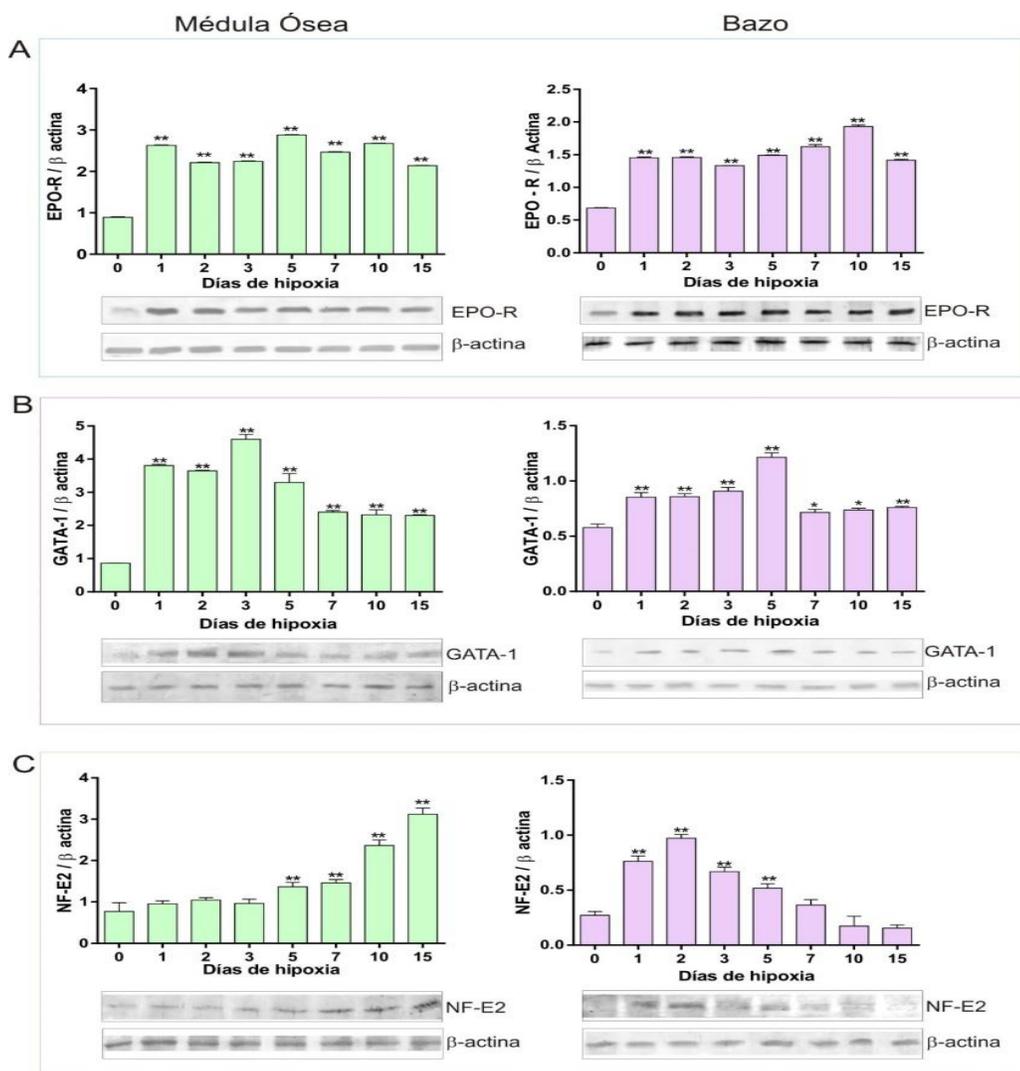
**Figura 5.** Expresión de HIF-1 alfa y de HIF-2 alfa en función de la hipoxia en MO y Bz.



A) Inmunoblottings de HIF-1 $\alpha$  y B) Inmunoblottings de HIF-2 $\alpha$ . Se utilizó  $\beta$ -actina como control interno. Se ilustran blots representativos de tres experiencias independientes. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n= 6 animales /lote) \*\*p<0.01 indica diferencias significativas de cada lote hipóxico con respecto al control.

En ambos tejidos el factor de transcripción aumenta sostenidamente con el progreso de la hipoxia, aunque este incremento es significativamente mayor desde el primer día de hipoxia en el bazo (p<0.05). Los niveles máximos de HIF-1  $\alpha$  se verifican al tercer día en MO y a partir del día 5 en Bz (P< 0,01). HIF-2  $\alpha$  en MO presenta expresión máxima al segundo día de hipoxia (p<0,01) con posterior descenso hacia el fin de la experiencia, momento en que la MO retoma el control de la eritropoyesis. En bazo, sin embargo, HIF-2 exhibe un patrón más irregular, conservando en general, un aumento de su inmunodetección en función de la hipoxia <sup>6</sup>.

El receptor de eritropoyetina (Epo-R) se expresa desde el primer día de hipoxia en ambos tejidos y muestra un patrón similar de comportamiento al igual que GATA -1<sup>7</sup>. En contraparte NF-E2 muestra un comportamiento diferencial en el que se observa una progresión de aumento en MO conforme aumentan los días de estímulo observándose un pico máximo de expresión al día 15 mientras que el Bz muestra un paulatino descenso en función de la adaptación medular a la hipoxia<sup>8</sup> (Figura 6).





**Figura 6** Expresión de EPO-R (Panel A); GATA-1 (Panel B) y NF-E2 (Panel C) en MO y Bz respectivamente. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM de 8 lotes de 6 animales. \*:  $p < 0.05$ . \*\*:  $p < 0.01$

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que tanto en el Bz como en MO se verifican procesos adaptativos homeostáticos coexistentes de expansión / sobrevivencia y apoptosis de progenitores eritroides durante la hipoxia. En Bz predomina una eritropoyesis compensatoria en los primeros días del estímulo. En MO por el contrario predomina apoptosis temprana con posterior recomposición en el control de la expansión del compartimiento eritroideo.

Ambos factores de transcripción, HIF-1 y HIF-2 alfa presentan una expresión basal detectable en MO y Bz y se sobreexpresan durante el estímulo hipóxico. Sin embargo, la eritropoyesis compensatoria esplénica está ligada al control de la isoforma de HIF-1 alfa, mientras que HIF-2 alfa estaría más asociada con regulaciones del microambiente y de la secreción de EPO renal.<sup>9</sup> Por otra parte, en el Bz la expansión del compartimiento eritroide se verifica en los primeros días de HH como mecanismo adaptativo de expansión transitoria de esta línea.

EPO-R se sobreexpresa a partir del día 1 de HH en ambos tejidos, gobernando la posterior expresión de los factores de transcripción GATA-1 y NF-E2 que condicionan el desarrollo del programa eritroide de modo diferencial en cada tejido.

Este estudio describe por primera vez la expresión de las isoformas de HIF y del factor de transcripción NF-E2 en situaciones de normoxia e hipoxia en ambos tejidos eritropoyéticos.

Durante la homeostasis eritropoyética en la MO y Bz se produce una compleja interacción de procesos simultáneos y secuenciales de muerte celular, proliferación, sobrevivencia y maduración necesarias para adecuar el tamaño y composición del compartimiento eritroide

Se aportan por lo tanto, nuevos conocimientos básicos potencialmente aplicables a la comprensión de diversas enfermedades oncohematológicas y/o cuadros clínicos relacionados con la hipoxia sistémica crónica o intermitente, como así también a la identificación de nuevas alternativas terapéuticas.

## Bibliografía

1. J. Cassavaugh and K. M. Lounsbury, "Hypoxia-mediated biological control.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, no. 3, pp. 735–44, Mar. 2011.
2. C. E. Bozzini, M. E. Barrio Rendo, F. C. Devoto, and C. E. Epper, "Studies on medullary and extramedullary erythropoiesis in the adult mouse.," *Am. J. Physiol.*, vol. 219, no. 3, pp. 724–728, 1970.
3. G. L. Semenza, "Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.," *Cell*, vol. 148, no. 3, pp. 399–408, Feb. 2012.
4. M. V. Aguirre, J. S. Todaro, J. A. Juaristi, and N. C. Brandan, "Murine erythropoietic impairment induced by paclitaxel: interactions of GATA-1 and erythroid Krüppel-like transcription factors, apoptotic related proteins and erythropoietin receptor.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 636, no. 1–3, pp. 42–51, Jun. 2010.
5. M. M. Martinez, R. D. Reif, and D. Pappas, "Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques," *Anal. Methods*, vol. 2, p. 996, 2010.
6. E. B. Rankin, C. Wu, R. Khatri, T. L. S. Wilson, R. Andersen, E. Araldi, A. L. Rankin, J. Yuan, C. J. Kuo, E. Schipani, and A. J. Giaccia, "The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO.," *Cell*, vol. 149, no. 1, pp. 63–74, Mar. 2012.
7. E. Ingley, "Integrating novel signaling pathways involved in erythropoiesis.," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 5, pp. 402–10, May 2012.
8. G. Zhao, R. Yang, X. Lü, M. J. Weiss, D. Liu, and C. Liang, "NF-E2: a Novel Regulator of Alpha-hemoglobin Stabilizing Protein Gene Expression," *Chinese Med. Sci. J.*, vol. 25, no. 4, pp. 193–198, Dec. 2010.



9. P. P. Kapitsinou, Q. Liu, T. L. Unger, J. Rha, O. Davidoff, B. Keith, J. a. Epstein, S. L. Moores, C. L. Erickson-Miller, and V. H. Haase, "Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia," *Blood*, vol. 116, no. 16, pp. 3039–3048, 2010.

#### **Datos de Autor**

**Carátula:** Expresión diferencial de isoformas del factor inducible por hipoxia (hif-1 $\alpha$  y hif-2  $\alpha$ ) en bazo y médula ósea en un modelo murino

**Autores:** Todaro, Juan Santiago<sup>1</sup>; Stoyanoff, Tania Romina<sup>1</sup>; Conti, María Inés<sup>2</sup>; Aguirre, María Victoria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina (LIBIM). Asignatura Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Moreno 1240 (3400). Corrientes. Argentina.

<sup>2</sup>Laboratorio de Fisiología FAO UBA