

INVESTIGACIÓN

NOVEDOSO TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ERITROCITOSIS PATALÓGICA DE ALTURA CON INHIBIDORES DE HMG COA REDUCTOSA

Ricardo Amaru

Unidad de Biología Celular

Hortensia Miguez

Departamento de Ciencias Funcionales

Julio Silvestre

Facultad de Medicina

Rosario Peñaloza

Universidad Mayor de San Andrés La Paz, Bolivia

Gina Torres

José Amaru

Martha Limachi

Jorge Fernández

Oscar Vera, Heriberto Cuevas.

ABSTRACT

Simvastatin is a HMG CoA reductase inhibitor that has effects on cellular proliferation and differentiation that may have beneficial effects on abnormal erythropoiesis in high altitude pathologic erythrocytosis (EPA). In this study the effects on erythropoiesis in vitro and in vivo were assessed in hematopoietic progenitor cell of patients with EPA.

Methods - Erythroid precursors obtained from bone marrow of patients with or without previous simvastatin treatment were plated semisolid and liquid culture media with simvastatin or vehicle. Cellular apoptosis was assessed by the previously described DNA ladder method.

Results - Simvastatin inhibits erythropoiesis in high altitude pathologic erythrocytosis patients. The erythropoiesis inhibition is more important in EPA and hypercholesterolemia patients with previous statin treatment. The characteristics of the erythroid colonies are different among the statin or vehicle cultures. The apoptosis is increased in cultures with simvastatin. In patients with EPA, statin treatment diminished the hemoglobin levels.

Conclusion - For their selective pharmacological action, statins might be the treatment of choice of EPA.

RESUMEN

La simvastatina es un inhibidor de la HMG CoA reductasa con efectos sobre la proliferación y diferenciación

celular que probablemente tenga efectos beneficiosos sobre la eritropoyesis alterada de la eritrocitosis patológica de la altura EPA). En este estudio se evaluó el efecto de la simvastatina sobre la eritropoyesis in vivo e in vitro de células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con EPA.

Métodos - Se cultivaron progenitores eritroides de sangre de médula ósea, en medio de cultivo semisólido y líquido, suplementados con simvastatina o vehículo, obtenidos de pacientes con EPA con y sin tratamiento previo con atorvastatina. Además, se estudió la apoptosis por el método de DNA ladder.

Resultados - La simvastatina inhibe la eritropoyesis en pacientes con EPA; la inhibición es más intensa en pacientes con EPA más hipercolesterolemia tratados con estatinas. Las características de las colonias eritroides son distintas entre las suplementadas con estatinas o vehículo. La apoptosis está aumentada en cultivos con simvastatina. En pacientes con EPA, las estatinas disminuyeron los niveles de hemoglobina.

Conclusión - Las estatinas, por su acción farmacológica selectiva, podrían constituirse en el medicamento de elección en el tratamiento farmacológico de EPA.

INTRODUCCIÓN

La simvastatina, fármaco del grupo de las estatinas, de naturaleza hidrofóbica, es un inhibidor natural de la 3 hidroxi 3 metil glutaril Coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa) (1, 2), que fue descubierto a raíz de los experimentos de los premios Nobel de Medicina, Drs. Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein (3). Las estatinas fueron extensamente investigadas y utilizadas por mucho tiempo debido a su efecto inhibidor de la síntesis de novo del colesterol (4) y otros múltiples efectos derivados de la disminución de la síntesis del farnesil (5). Los efectos pleiotrópicos de los inhibidores de la HMG CoA reductasa han suscitado varios estudios experimentales y/o clínicos que justifican su utilización en varios trastornos cardiovasculares (4), neoplásicos (6), neurodegenerativos (7) y procesos de angiogénesis e inflamación (8). Se considera que sus efectos podrían ser más amplios de lo que se suponía en un inicio (1) conforme se descubra su utilidad en otras patologías.

Por otra parte se sabe que las estatinas poseen un mecanismo muy interesante de inhibición de la proliferación celular, mediado por las proteínas dependientes de las GTPasas, del Rho (1, 9), Rac1, Akt y otros (5) (4). Además derivados del farnesil, y el geranilgeranil han sido involucrados directamente en la cascada de factores de transcripción y la regulación de la proliferación y diferenciación celular (10).

La eritrocitosis de altura, en poblaciones ubicadas en grandes alturas, presenta alteraciones en la eritropoyesis y la apoptosis de progenitores eritroides (8); como consecuencia de estas alteraciones y

otros trastornos moleculares aún no esclarecidos completamente la diferenciación celular eritroide es excesiva (16). Este proceso fisiopatológico aumenta considerablemente la viscosidad sanguínea alterando ostensiblemente las propiedades reológicas de flujo laminar, que conducen a un cuadro clínico propio de la eritrocitosis de altura (12) que repercute en la calidad de vida y productividad de los pacientes.

El presente estudio experimental documenta la acción inhibitoria de las estatinas sobre la eritropoyesis in vitro e in vivo de células progenitoras hematopoyéticas en pacientes con eritrocitosis patológica de altura (EPA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron cuatro pacientes de sexo masculino (paciente I, II, III, IV) con diagnóstico de eritrocitosis patológica de altura, con una edad promedio de 48 años, quienes ingresaron al estudio previo consentimiento informado. Todos ellos realizaron aféresis sanguínea hasta alcanzar hemoglobina inferior a 18 g/dl. Dos de los pacientes (paciente III, IV) presentaron alteraciones de hipercolesterolemia, motivo por el que inició tratamiento con atorvastatina, posterior a aféresis sanguínea.

Aislamiento de células progenitoras hematopoyéticas

Las células mononucleadas fueron aisladas de sangre de aspirado de médula ósea por separación con gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden), posteriormente fueron lavadas en medio

de RPMI 1460 (Gibco, invitrogen corporation, USA). Las células mononucleadas cultivadas presentaban una viabilidad superior a 95%. Las células "stem cell" fueron evaluadas con CD34 por citometría de flujo (FACS, Becton Dickinson).

Cultivo en medio semisólido de células progenitoras hematopoyéticas

Los cultivos se realizaron en cajas Petri con grilla (Cell Culture Dish, w/2mm grid, 35 x 10 mm, USA) en medio semisólido de cultivo preparado con: Un mL de metilcelulosa al 0.9% (Metho Cult H4230 without Epo, Stem Cell Technologies, Canada), estreptomycin (50 µg/mL) y penicilina (250 UI/mL). Se cultivaron 3 x 10⁵ células mononucleadas a 37°C y 5% de CO₂ hasta el día 18.

Los suplementos adicionales utilizados fueron: Eritropoyetina recombinante humana 5 UI/mL (rHuEpo) (Hemax, SIDUS) y simvastatina 600 nM (Merk Sharp Dohm, France, generosamente donado por el Prof. Claudio Sartori). La simvastatina fue activada por un método previamente descrito (13): 8 mg de simvastatina fueron tratados con 0.2 mL de etanol al 95% y 0.3 mL de NaOH 0.1 N; posteriormente la solución fue calentada a 50 °C por 2 h y neutralizada con HCl hasta un pH de 7,2. La concentración final de la simvastatina activa fue de 0.019 mM. El vehículo utilizado siguió el mismo proceso de disolución de la simvastatina.

Los cultivos de células progenitoras hematopoyéticas siguieron el diseño de estudio descrito en el cuadro 1.

Cuadro 1: Diseño de estudio para cultivo semisólido de células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con EPA.

PACIENTE	rHuEPO	SUPLEMENTO	GRUPO
	con	simvastatina	A
con EPA		vehículo	B
	sin	simvastatina	C
		vehículo	D
	con	simvastatina	E
con EPA		vehículo	F
y atorvastatina	sin	simvastatina	G
		vehículo	H

	SUPLEMENTO	GRUPO
Paciente con EPA	Simvastatina	VV
	Vehículo	X
Paciente con EPA + atorvastatina	Simvastatina	Y
	Vehículo	Z

Cultivo en medio líquido de células progenitoras hematopoyéticas

Los cultivos se realizaron en placas de cultivo (Corning Cell Well, USA) con 1 mL de RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Co, USA), Suero Fetal Bovino al 30%, L glutamina 2 mM, estreptomycin 50 µg/mL y penicilina sódica 250 UI/mL. Se cultivaron 7 x 10⁵ células mononucleadas a 37°C y con 5% de CO₂ por 14 días.

Los suplementos adicionales utilizados fueron: rHuEpo 5 UI/ml (Hemax, SIDUS) y Simvastatina 600 nM (Merk Sharp Dohm, France).

Los cultivos en medio líquido de células progenitoras hematopoyéticas siguieron el diseño de estudio descrito en el cuadro 2.

Cuadro 2: Diseño de estudio para cultivo líquido de células progenitoras hematopoyéticas de pacientes con EPA.

Paciente	rHuEPO	Suplemento	Grupo	NUMERO DE COLONIAS		
				7 Días	14 Días	18 Días
	con	simvastatina	A	48	73	0
con EPA		vehículo	B	71	111	90
	sin	simvastatina	C	2	19	0
		vehículo	D	2	25	13

Tratamiento con estatinas de pacientes con EPA asociado a hipercolesterolemia

Los pacientes diagnosticados de eritrocitosis patológica de altura asociado a hipercolesterolemia, iniciaron tratamiento con atorvastatina posterior a aféresis sanguínea.

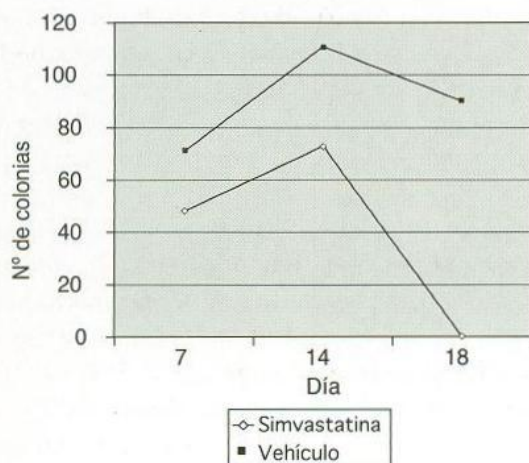
RESULTADOS

La simvastatina inhibe in vitro la eritropoyesis en pacientes con EPA

La lectura de las colonias eritrocitarias (BFU-E y CFU-F), cultivadas en medio semisólido, se realizaron a los 7, 14 y 18 días (cuadro 3).

En el grupo A se desarrollaron 48, 73 y 0 colonias eritroides respectivamente. En el grupo B se desarrollaron 71, 111 y 90 colonias eritroides respectivamente (figura: 1).

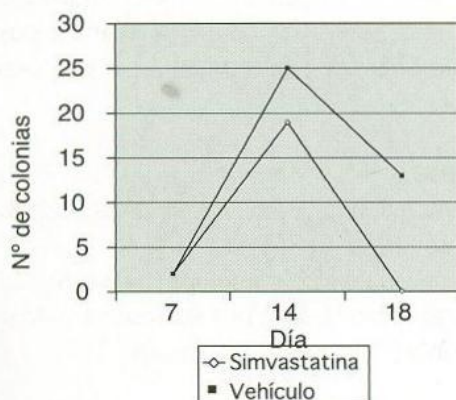
Figura 1: Número de colonias eritroides cultivadas en medio semisólido suplementados con rHuEpo, en pacientes con EPA.



Grupo A: ; Grupo B:

En el grupo C se desarrollaron 2, 19 y 0 colonias eritroides respectivamente. En el grupo D se desarrollaron 2, 25 y 13 colonias eritroides respectivamente (figura: 2).

Figura 2: Número de colonias eritroides cultivadas en medio semisólido sin rHuEpo, en pacientes con EPA.



Gupo C: ; Grupo D:

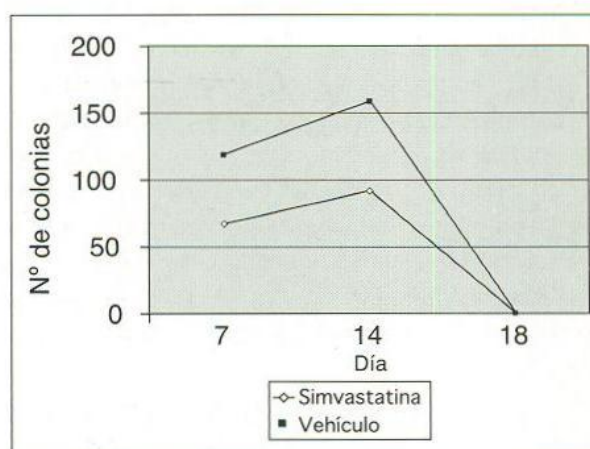
La simvastatina inhibe in vitro con mayor intensidad la eritropoyesis en pacientes con EPA en tratamiento con atorvastatina.

La lectura de las colonias eritrocitarias (BFU-E y CFU-F), cultivadas en medio semisólido, se realizaron a los 7, 14 y 18 días (cuadro 4).

Paciente	rHuEPO	Suplemento	Grupo	NUMERO DE COLONIAS		
				7 Días	14 Días	18 Días
con EPA	con	simvastatina	E	67	92	0
		vehículo	F	119	159	0
	sin	simvastatina	G	0	2	0
		vehículo	H	10	11	0

En el grupo E se desarrollaron, 67, 92 y 0 colonias eritroides respectivamente. En el grupo F se desarrollaron 119, 159 y 0 colonias eritroides respectivamente (Figura:3).

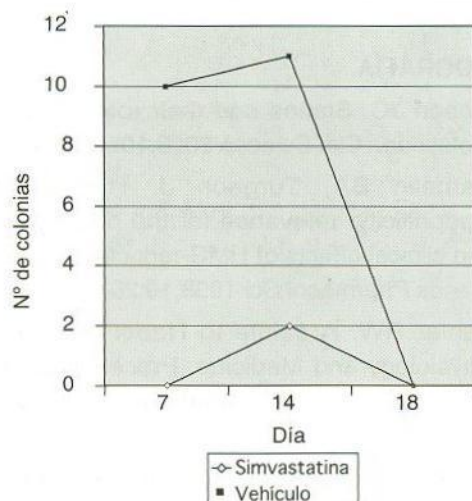
Figura 3: Número de colonias eritroides cultivadas en medio semisólido suplementados con rHuEpo, en pacientes con EPA en tratamiento con atorvastatina.



Gupo E: Grupo F: _

En el grupo G se desarrollaron 0, 2 y 0 colonias eritroides respectivamente. En el grupo H se desarrollaron 10, 11 y 0 colonias eritroides respectivamente (figura: 4).

Figura 4: Número de colonias eritroides cultivadas in vitro en medio semisólido sin rHuEpo, en pacientes con EPA en tratamiento con atorvastatina.



Gupo G: Grupo H: _

Las colonias eritroides (BFU-E y CFU-F) cultivadas in vitro son diferentes entre los cultivados con simvastatina y vehículo.

Las colonias eritroides del grupo A son pequeñas en relación a los del grupo B; además a los 18 días de cultivo, todas las colonias eritroides del grupo A presentaban lisis total, mientras que la mayoría de las colonias eritroides del grupo B permanecen viables.

La apoptosis esta aumentada en las células progenitoras eritroides suplementados con simvastatina.

La valoración de la apoptosis se realizó con la técnica de "DNA ladder" los días 1, 2, 7 y 14. El grupo W-Y presentó mayor apoptosis con relación al grupo X-Z.

Evolución clínica de pacientes con EPA.

El paciente I (EPA), al diagnóstico presentó 21.1 g/dl de hemoglobina; posterior a 3 sesiones de aféresis sanguínea la hemoglobina descendió a 17.5 g/dL. Posteriormente quedo en observación sin

medicación alguna. El control de hemoglobina realizado a los 4 meses reportó 19 g/dl.

El paciente II (EPA), al diagnóstico presentó 20 g/dl de hemoglobina; posterior a 4 sesiones de aféresis sanguínea la hemoglobina fue de 16.1 g/dL. Posteriormente quedo en observación sin medicación alguna. El control de hemograma realizado a los 2 meses reportó 17.5 g/dl de hemoglobina.

El paciente III (EPA+Simvastatina), al diagnóstico presentó hemoglobina de 19.9 g/dl; posterior a 2 sesiones de aféresis sanguínea la hemoglobina fue de 17.8 g/dL. Por diagnóstico de hipercolesterolemia inició atorvastatina 30 mg/VO/día. El control de hemoglobina realizado a los 3 meses reportó 14 g/dL y a los 4 meses 13.8 g/dl.

El paciente IV (EPA+Simvastatina), al diagnóstico presentó 22.6 g/dl de hemoglobina; posterior a 4 sesiones de aféresis sanguínea la hemoglobina fue de 18.3 g/dL. Por diagnóstico de hipercolesterolemia inició atorvastatina 20 mg/VO/día. El control de hemoglobina realizado a los 2 meses reportó 17 g/dL.

DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (8) sugieren la posibilidad de que la eritrocitosis patológica de altura sea una condición caracterizada por la proliferación monoclonal u oligoclonal de los precursores eritroides o presenten una respuesta exagerada a bajas dosis de Epo; probablemente mediada por niveles aumentados de eritropoyetina y/o hipersensibilidad a la eritropoyetina y/o aumento de receptores de la EPO (15). En el presente estudio, se ha demostrado que en pacientes con eritrocitosis patológica de altura existe un grupo de células progenitoras aparentemente normales y otro grupo de progenitores cuyos mecanismos de proliferación y diferenciación celular están alterados.

Se ha demostrado que el efecto apoptótico de la inhibición farmacológica de la HMG CoA reductasa por las estatinas es selectivo (6) provocando apoptosis celular, solo en células con alteraciones moleculares de transcripción, supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

Los experimentos realizados han evidenciado que la inhibición de la eritropoyesis por la simvastatina es más evidente en cultivos de células progenitoras de la línea eritroide suplementados con rHuEpo que en los suplementados con vehículo. Esto probablemente es atribuible a la proliferación y diferenciación anormal de las células progenitoras comprometidas de la línea eritroide estimuladas por la eritropoyetina. Estos resultados respaldan la teoría de la mono-oligoclonalidad de la eritrocitosis patológica de la altura.

La inhibición de la eritropoyesis, en nuestro estudio, también está documentado con las características y la supervivencia de las colonias eritroides; los cultivos suplementados con simvastatina son más pequeños y de vida corta, mientras que los cultivos suplementados con vehículo son más grandes y de vida prolongada.

La evidencia de la apoptosis acelerada de los progenitores eritroides suplementados con simvastatina, nos demuestra el mecanismo de acción inhibitoria de la eritropoyesis.

La inhibición de la HMG CoA reductasa por las estatinas, inhibe la formación de farnesil, formando en un paso sucesivo el geranylgeranil para la prenilación de la Rho, una proteinkinasa responsable de la proliferación celular (14). Probablemente este mecanismo sea la explicación molecular de la inhibición de la eritropoyesis.

El descenso de la hemoglobina de pacientes con eritrocitosis de altura que reciben atorvastatina es una demostración de la acción in vivo de la inhibición de la eritropoyesis.

Los efectos colaterales descritos por el uso de las estatinas son la mialgia, miositis y rabdomiolisis cuya frecuencia es menor al 0.1% (11), se conoce que estas molestias podrían ser reversibles con uso de flavoproteínas.

Por las evidencias anteriormente citadas, el tratamiento con estatinas de la eritrocitosis patológica de altura podría no solamente disminuir los niveles de hemoglobina, sino además favorecer la corrección de las alteraciones cardiopulmonares presentes en estos pacientes (12); por ello, consideramos que la simvastatina podría constituirse en el medicamento de elección para el tratamiento farmacológico de la eritrocitosis patológica de altura.

AGRADECIMIENTO

Al Prof. Claudio Sartori de la Universidad de Laussane, Suiza, por la provisión de simvastatina activa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mason JC. Statins and their role in vascular protection. *Clin Science* 2003;105:251-66.
2. Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/Lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:26-37.
3. Schier RW. A salute to Nobel laureates in Physiology and Medicine. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1996;108(13).
4. Ischihara K, Satoh K. Disparity between angiographic regression and clinical event rates with hydrophobic statins. *Lancet* 2002;359:2195-8.
5. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 2003;23:729-36.
6. Wong WW-L, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002;16:508-19.
7. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356:1627-31.
8. Arias Anahi, Amaru Ricardo. Alteración en el patrón de apoptosis de células precursoras de eritrocitos en mujeres post menopáusicas con eritrocitosis patológica de la altura. *Cuaderno del Hospital de clínicas*, 2000: 46, 31-40.
9. Park HJ, Galper JB. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors up-regulate transforming growth factor- signaling in cultured heart cells via inhibition of geranylgeranylation of RhoA GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11525-30.
10. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

- inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1712-9.
11. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-Associated Myopathy. *J Am Med Assoc* 2003;289(13):1681-90.
 12. Girgis RE, Li D, Zhan X, Garcia JGN, Tudor RM, Hassoun PM, Johns RA. Attenuation of chronic hypoxic pulmonary hypertension by simvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H938-H945.
 13. Grellier P, Valentin A, Millerieux V, Schrevel J, Rigomier D. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors Lovastatin and Simvastatin inhibit in vitro development of *Plasmodium falciparum* and *Babesia divergens* in human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(5): 1144-8.
 14. Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol* 2000;165:2712-8.
 15. Schier RW. A salute to Nobel laureates in Physiology and Medicine. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1996;108(13).
 16. Epo as an antiapoptotic cytokine?. *Cell Death Differ* 2004.