

## Acción de un inhibidor sérico en la regulación de la hematopoyesis: Efecto *in vitro* sobre la síntesis de RNA en médula ósea de rata

Action of a serum inhibitor on hematopoiesis regulation:  
*in vitro* effect on RNA synthesis of rat bone marrow

PAULA ROJAS<sup>1</sup>, ARGELIA GARRIDO, FERNANDO GARRIDO  
y MARCO PERRETTA<sup>2</sup>

División de Ciencias Básicas. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos,  
Universidad de Chile, Casilla 15138, Santiago 11, Chile.

Hematopoiesis is regulated by several hormones and protein factors, among them, erythropoietin (Ep) and granulopoietin (CSF: Colony Stimulating Factor) play the fundamental control activities inducing the differentiation of stem cells to red and white cells series, respectively. The action of serum inhibitors and cyclic nucleotides on hematopoietic process is not well understood at present time.

In this work a rat serum-inhibiting activity was detected that diminished the *in vitro* [<sup>3</sup>H] uridine incorporation into rat bone marrow whole RNA. The experiments show that the inhibitory may have a platelet origin.

En la regulación de la hematopoyesis participan distintas hormonas y factores que actúan estimulando o inhibiendo algunas de las etapas del proceso. La eritropoyetina (Ep) y el factor estimulante de colonias (CSF: Colony Stimulating Factor) o granulopoyetina son las moléculas claves que inducen la diferenciación de las células basales hacia elementos maduros de la serie roja y blanca, respectivamente (1-6). Poco se conoce sobre el rol que juegan en todo este proceso los distintos factores inhibidores aislados hasta el momento. Se han descrito algunos que inhiben específicamente etapas en la diferenciación y maduración granulopoyética (1, 2, 6-11), en cambio otras afectan principalmente la eritropoyesis (12, 13). El hallazgo de muchos de estos factores en el suero sanguíneo les asigna el rol de reguladores sistémicos en la hematopoyesis.

En este trabajo se estudia un factor detectado en suero de rata normal, que disminuye en forma significativa la incorpora-

ción *in vitro* de [<sup>3</sup>H] uridina a la fracción ácido insoluble en médula ósea de rata. La incorporación de este precursor radiactivo al RNA total se utiliza como señal de respuesta celular frente a un estímulo. En médula ósea, Ep (14-16) y CSF (17) provocan un aumento de la incorporación *in vitro* de [<sup>3</sup>H] uridina, lo que se interpreta como la activación de la transcripción, en la que el aumento de la síntesis de RNA constituye la primera etapa de una respuesta del inicio de la diferenciación celular cuyo significado en última instancia es la síntesis de proteínas específicas y características del proceso.

En los experimentos que se discuten a continuación se muestra la acción de un factor presente en suero de rata normal que inhibe la síntesis de RNA en médula ósea, observando, además, los efectos de filtración, diálisis, temperatura y tiempo de coagulación sobre su actividad. Los resultados obtenidos sugieren que el inhibidor podría ser de origen plaquetario.

<sup>1</sup> Beca de la Facultad de Medicina (División Sur), Universidad de Chile.

<sup>2</sup> A quien debe referirse toda correspondencia y petición de apartados.

## MATERIAL Y METODOS

*Obtención de suero normal (SN)*

Ratas hembras Wistar de peso 150-200 g, de 2 meses de edad, se utilizaron como fuente del suero normal. La sangre se extrajo por punción de la aorta abdominal sin anticoagulante, dejándola coagular por 2 horas a temperatura ambiente y luego centrifugada a 3.600 x g por 20 min a 4°C. La muestra se obtuvo juntando, en un tubo, el suero de 3 animales, que se mantuvo congelado hasta su uso a -20°C.

*Suero filtrado (SF) y suero calentado (SC).* El suero obtenido se pasó por filtro, fibra de vidrio Gelman tipo A/E antes de congelarlo. El suero calentado se obtuvo en bañomaría a 56°C por 30 min. Posterior al procesamiento se repitió la centrifugación a 3.600 x g por 20 min a 4°C y se conservó congelado a -20°C hasta el momento de usarlo.

*Obtención del contenido retenido por el filtro (F).* El filtro Gelman A/E, que quedó del paso anterior, se lavó con suero fisiológico, y luego se dejó por 24 h con éste en cantidad equivalente al suero filtrado. Posteriormente se eliminó el filtro y la suspensión obtenida se centrifugó a 3.600 x g por 20 min. El sobrenadante se congeló hasta el momento de usarlo.

*Plasma normal obtenido con heparina (PN).* Se extrajo la sangre con heparina (20 µ/ml de sangre), se centrifugó a 3.600 x g por 20 min en frío y el plasma se congeló hasta su uso.

*Suero normal obtenido por centrifugación inmediata.* Se extrajo la sangre sin anticoagulante y se centrifugó inmediatamente a 3.600 x g por 10 min, con lo cual se separaron los elementos figurados del plasma. El plasma obtenido se centrifugó a 3.600 x g por 20 min, guardándose el sobrenadante congelado hasta su uso.

*Plasma coagulado (P/C).* Se obtuvo la sangre con EDTA (2 mg/ml), se centrifugó a 3.600 x g por 20 min en frío y al plasma se le agregaron 5 mg de CaCl<sub>2</sub>, dejándose 2 h a temperatura ambiente, hasta la formación de coágulo. Se centrifugó a 3.600 x g por 20 min y el sobrenadante se congeló hasta su uso.

*Ensayos in vitro de médula ósea de rata*

Los distintos preparados antes descritos se incubaron con células de médula ósea total, en las que se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H] uridina al RNA total.

Las células de la médula ósea se obtuvieron de fémures y tibias de ratas Wistar hembras normales de 8 semanas de

edad con peso entre 150-200 g, con PBS. La suspensión celular se filtró a través de algodón y luego se centrifugó a 145 x g por 10 min en frío. El pellet celular se resuspendió en medio MEM-Eagle (410-1.100 de GIBCO), al que se agregaron aminoácidos no esenciales, 2,2 g/l de NaHCO<sub>3</sub> y MOPS 20 mM. La concentración final de células fue de 7 x 10<sup>6</sup> por ml. Se preincubó a 37°C por 30 min en ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>.

*Incubación.* Se prepararon tubos con 3,5 millones de células en 500 µl del medio de incubación, 1 µCi de [<sup>3</sup>H] uridina (actividad específica 5 Ci/mmol) y 50 µl del suero problema. Se incubó por 2 h a 37°C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5%. La reacción se detuvo colocando los tubos en hielo por 20 min, para luego centrifugar a 3.600 x g por 10 min en frío. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, manteniéndolos a 4°C por 20 min. Posteriormente se filtró por filtros Whatman GC/C, lavando 2 veces con TCA al 5% y 1 vez con etanol frío. Los filtros secos se colocaron en frascos de conteo, adicionándoles 0,6 ml de mezcla digestiva (0,2 ml de protosol y 0,4 ml de líquido de centelleo). A las 12 h se agregaron 20 µl de ácido acético y 10 ml de líquido de centelleo (42 ml de espectroflúor en 1 l de xileno) y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo Nuclear Chicago Mark II, expresando los resultados como cpm x 10<sup>6</sup> células con un 41% de eficiencia.

## RESULTADOS

*Efecto de suero de rata normal sobre síntesis de RNA total en médula ósea de rata*

La incubación de células de médula ósea con suero normal de rata produce una disminución significativa en la incorporación de uridina marcada en RNA, la que llega al 72% del control incubado sin suero (Tabla 1). Esta diferencia es altamente significativa (P < 0,005).

A fin de descartar que esta disminución en la incorporación se debiera a una inactivación externa de la uridina por algún elemento del suero, las células se preincubaron con el suero sin agregar el precursor radiactivo, considerando como control las células

TABLA 1

Efecto de suero de rata normal sobre síntesis de RNA total en médula ósea de rata.

Condiciones Experimentales	A. Incorporación de [ <sup>3</sup> H] Uridina CPM x 10 <sup>6</sup> cel	B. % de Actividad
C.	50.543 ± 1.200	100% ± 1,17 (n = 26)
S.N.	30.529 ± 280	72% ± 1,10 (n = 40)*

(C = control; SN = suero normal). Condiciones experimentales en material y métodos. Col. A: Experimento tipo de 10 similares. Las cifras expresan  $\bar{X} \pm E.S.$  Col. B: Resultados muestran % de actividad con respecto al control de los 10 experimentos. Las cifras entre paréntesis indican el número de muestras, las que se expresan  $\bar{X} \pm E.S.$

\* Test de Student: P < 0,005.

incubadas en medio de cultivo sin suero. Al tiempo de 1 y 2 h se detuvo la incubación, las células se centrifugaron a 145 x g durante 10 min, se eliminó el líquido sobrenadante y se resuspendieron en medio de cultivo, llevándolas a 7 millones/ml. Luego se incubaron con [<sup>3</sup>H] uridina por 15 min.

Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran que las células que fueron incubadas previamente con suero incorporan menor cantidad del precursor, mostrando una inhibición del orden del 70%, a 1 y 2 h de preincubación.

TABLA 2

Efecto de la preincubación con suero de rata normal sobre la síntesis de RNA de médula ósea de rata normal.

Condiciones Experimentales	Incorporación de [ <sup>3</sup> H] Uridina CPM X 10 <sup>6</sup> células
C 1 hora (n = 4)	5.806 ± 379
SN 1 hora (n = 4)	4.076 ± 100
C 2 horas (n = 4)	4.685 ± 300
SN 2 horas (n = 4)	3.189 ± 175

Las células se preincubaron por 1 y 2 h con suero de rata normal. Las células lavadas se incuban en medio de cultivo por 15 min con [<sup>3</sup>H] Uridina. Los controles se procesan en igual forma en medio de cultivo (C = control; SN = suero normal). Los resultados se expresan  $\bar{X} \pm ES$ , n = número de muestras. Experimento tipo de 4 similares.

#### *Efecto de la filtración, calentamiento y diálisis sobre el suero de rata normal*

Al someter el suero a estos procedimientos, el efecto inhibitorio producido por el suero normal desaparece (Tabla 3).

Al filtrar el suero, el filtro retiene el factor inhibitor, el que se puede recuperar activo por resuspensión del material retenido.

#### *Relación entre coagulación e inhibición del suero de rata*

El suero utilizado en los experimentos anteriores se obtiene después de dejar coagular la sangre por 2 horas a temperatura ambiente, hasta observar retracción del coágulo. En los resultados que se muestran a continuación se utilizaban distintos sueros que no habían sufrido el proceso completo de coagulación: suero obtenido por centrifugación de la sangre inmediatamente después de extraerla y plasma de sangre heparinizada. Los resultados de la Tabla 4 muestran que no hay diferencia con respecto al control, perdiéndose la capacidad inhibitoria detectada en suero normal.

En la Tabla 5 se muestra un experimento preliminar tendiente a demostrar el efecto del suero obtenido sin plaquetas. Para esto se obtiene el plasma con EDTA, libre de plaquetas, el que se coagula agregando calcio. El suero así obtenido no es inhibitorio de incorporación de [<sup>3</sup>H] uridina con respecto al control.

Para observar la posible participación de plaquetas en la aparición de este factor durante la coagulación se extrajo la sangre con EDTA y por centrifugación a distintas velocidades (entre 1.000 y 10.000 rpm) se obtuvo plasma con distintas concentraciones

TABLA 3

Efecto de filtración, calentamiento, diálisis sobre el factor inhibitor de suero de rata.

Condiciones Experimentales	A. Incorporación de [ <sup>3</sup> H] Uridina CPM / 10 <sup>6</sup> células	B. % de Actividad
C	50.543 ± 1.250	100% ± 1,12 (n = 26)
SN	30.529 ± 280	72% ± 1,1 (n = 40)
SC	47.271 ± 1.750	94% ± 3,5 (n = 4)
SD	46.404 ± 700	92% ± 2,7 (n = 8)
SF	48.499 ± 1.500	90% ± 2,1 (n = 14)*
F	24.194 ± 1.400	67% ± 5,0 (n = 10)*

(C = control; SN = suero normal; SC = suero calentado; SD = suero dializado; SF = suero filtrado; F = material retenido en filtro). Condiciones experimentales se detallan en material y métodos. Col. A: experimento tipo. Las cifras expresan  $\bar{X} \pm ES$ . Col. B: resultados muestran % de actividad de los distintos sueros en relación al control de todos los experimentos realizados. Citas en paréntesis indican el número de muestras, las que se expresan como  $\bar{X} \pm ES$ .

\* Test de Student: (C - SF) (C - F) P < 0,005.

TABLA 4

Efecto de la coagulación sobre la capacidad de inhibición del suero de rata normal sobre la síntesis de RNA de médula ósea de rata normal.

Condiciones experimentales	A. Incorporación de [ <sup>3</sup> H] Uridina CPM / 10 <sup>6</sup> células	B. % de Actividad
C	37.269 ± 600	100 ± 1,0 (n = 26)
SN	27.642 ± 850	72 ± 1,1 (n = 40)*
SNC	36.465 ± 650	99,5 ± 1,5 (n = 18)
P	37.455 ± 1.850	100,5 ± 4,1 (n = 6)

(C = control; SN = suero normal; SNC = suero obtenido por centrifugación inmediata; P = plasma heparinizado). Col. A: experimento tipo, las cifras expresan  $\bar{X} \pm ES$ . Col. B: resultados expresan % de actividad de los distintos sueros respecto al control, las cifras entre paréntesis indican el número de muestras, las que se expresan como  $\bar{X} \pm ES$ .

\* Test de Student: (C - SN) P < 0,005.

TABLA 5

Efecto de suero obtenido de plasma coagulado, sin plaquetas sobre la síntesis de RNA de médula ósea de rata normal.

Condiciones experimentales	A. Incorporación de [ <sup>3</sup> H] Uridina CPM / 10 <sup>6</sup> células
C	43.000 ± 940 (n = 4)
PC	40.288 ± 725 (n = 4)

(C = control; PC = suero de plasma obtenido con EDTA y coagulación con Ca). Las condiciones experimentales se detallan en material y métodos. Col. A: los resultados se expresan como  $\bar{X} \pm ES$ . n = número de muestras. Experimento tipo de 3 similares.

nes de plaquetas. Se indujo coagulación con calcio y se obtuvo el suero por centrifugación.

Los resultados señalan que a medida que disminuye el número de plaquetas, disminuye la inhibición producida por el suero (Fig. 1).

#### DISCUSION

La acción de factores presentes en el suero, diferentes a las clásicas hormonas, Ep y CSF y otras, sobre la hematopoyesis, ya sea inhibiendo o activando la formación de colonias, sugiere que los mecanismos de control del proceso son aún más amplios y complicados.

En este trabajo se ha detectado la acción de un factor sérico que inhibe la síntesis de RNA total de médula ósea de rata, tomando como índice de actividad hemopoyética la incorporación de [<sup>3</sup>H] uridina al RNA.

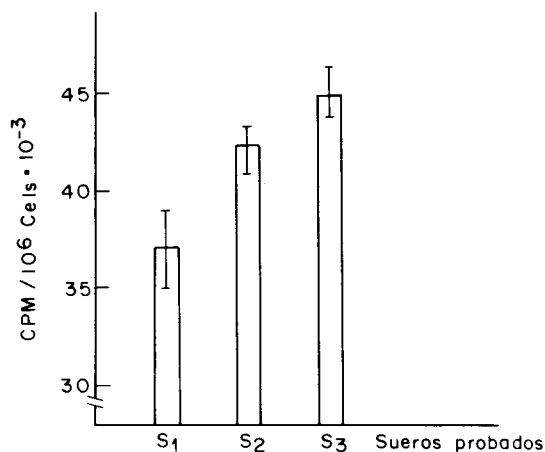


Gráfico N° 1. Efecto de la concentración de plaquetas en la inhibición producida por el suero de la síntesis de RNA de médula ósea de rata normal. S<sub>1</sub>, suero obtenido al coagular plasma con plaquetas, 1.170 millones/ml (n = 4); S<sub>2</sub>, suero obtenido al coagular plasma con plaquetas, 700 millones/ml (n = 4); S<sub>3</sub>, suero obtenido al coagular plasma con plaquetas, 4 millones/ml (n = 4). Las condiciones experimentales se detallan en el texto. Las figuras representan  $\bar{X} \pm 2 ES$ .

Siendo la etapa de transcripción la más temprana sujeta a control metabólico, la estimación de la síntesis de RNA constituye una medida objetiva para seguir el curso de un fenómeno biológico.

La inhibición que produce el suero sólo es posible cuando éste sufre la coagulación completa y desaparece cuando se filtra, se calienta o se utilizá plasma heparinizado. Al obtener suero en distintas formas, ya sea centrifugando inmediatamente la sangre una vez obtenida o extrayéndola con EDTA y, luego, coagulando el plasma con calcio, el efecto inhibitorio desaparece.

Estas observaciones sugieren que el factor inhibidor no está presente en el plasma normal, por lo que debe suponerse que debe liberarse en un momento dado de la coagulación, como se deduce de los resultados presentados en la Tabla 4, como también al estudiar el efecto de sueros que contienen cantidades diversas de plaquetas, en la que aquellos con menor cantidad de estas células tienen un efecto inhibitorio menor.

Si bien algunos de los resultados presentados son aún preliminares, se sugiere que el factor se origina a partir de las plaquetas y que al liberarse durante la coagulación ejerce la inhibición ya señalada. De esto se deduce que no sería un constituyente normal del plasma, ya que no se presenta circulando como un regulador hormonal clásico.

Las plaquetas tienen como funciones principales la secreción de distintos compuestos al medio durante la coagulación y la formación del tapón plaquetario (18-20), en un mecanismo dependiente de ADP, prostaglandinas y calcio. Es posible que algunas de estas sustancias tengan estas propiedades de inhibición o aquellas que producen las plaquetas al actuar en la respuesta inflamatoria (20, 21), cuando activan el complemento o liberan factores quimiotácticos que actúan sobre neutrófilos y macrófagos, células presentes normalmente en la médula ósea.

El efecto inhibidor del factor parece ser permanente, tal como se observa en los resultados de la Tabla 2, lo que hace pensar que la regulación de la hematopoyesis parece constituir un conjunto de mecanismos competitivos, en los cuales las propias células de la sangre participan en el control, ya sea liberando factores que actúan directamente sobre células de la médula ósea o controlando la acción de las hormonas fundamentales del proceso, como son la Ep y el CSF.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile. Proyectos N° B-1241-833 y B-2017-8412. Agradecemos el excelente trabajo dactilográfico de Felicita Rodríguez.

## REFERENCIAS

1. VAN ZANT, G. and GOLDWASSER, E. (1979) *Blood* 53: 946-952.
2. VAN ZANT, G. and GOLDWASSER, E. (1977) *Science* 198: 733-735.
3. DEXTER, T.M.; TESTA, N.G.; ALLEN, T.D.; RUTHERFORD, T. and SCOLNICK E. (1981) *Blood* 58: 699-707.
4. BURGESS, A. and METCALF, D. (1980) *Blood* 56: 947-958.
5. MOORE, M.A. (1979) *Clinics in Haematology* 8: 287-309.
6. BAKER, F.L. and GALBRAITH, P.R. (1979) *Blood* 53: 304-312.
7. LORD, B.I. (1979) *Clinics in Haematology* 8: 435-451.
8. KURLAND, J.I.; BROXMEYER, H.E.; PELUS, L.M.; BOCKMAN, R.S. and MOORE, M.A.S. (1978) *Blood* 52: 388-407.
9. BROXMEYER, M.E.; DE SOUSA, M.; SMITHYMAN, A.; RALPH, P.; HAMILTON, G.; KURLAND, J.Y.; BOGNACKI, J. (1980) *Blood* 55: 324-333.
10. HEIT, W.; KERN, P.; KUBANEK, B.; HEIMPEL, M. (1974) *Blood* 44: 511-515.
11. MORA, P.A.; VALLE, J.; SALVADO, A.; WRIGHT, D.G. (1982) *Blood* 59: 185-187.
12. KRYSZAL, G.; EAVES, A.C. and EAVES, C.J. (1980) *J. Lab. Clin. Med.* 97: 158-169.
13. DE KLERK, G.; OTTEN-KRUISWIJK, C.; GOUDSMIT, R. (1977) *Brit. J. Haematol.* 35: 672 (Abstract).
14. PERRETTA, M.; WAISSBLUTH, L.; LUDWIG, U. and GARRIDO, F. (1980) *Arch. Biol. Med. Exp.* 13: 247-257.
15. PERRETTA, M.; WAISSBLUTH, L.; GARRIDO, F.; GARRIDO, A. and RONCO, A.M. (1981) *J. Ster. Biochem.* 14: 537-543.
16. KRANTZ, S.B. and GOLDWASSER, E. (1965) *Biochim. Biophys. Acta.* 103: 325-332.
17. BURGESS, A. and METCALF, D. (1977) *J. Cell Physiol.* 90: 471-483.
18. SIXMAN, J.J. and WESTER, J. (1977) *Seminars Hematol.* 14: 265-299.
19. BENNETT, B. (1977) *Seminars Hematol.* 14: 301-318.
20. HURLON, J.M. and HORBER, L. (1981) *J. Clin. of N.A.* 65: 855-879.
21. ZIMMERMAN, T.S.; FIERER, J. and ROTHBERGER, M. (1977) *Seminars Hematol.* 14: 391-408.