

**METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS DE LA MEDULA OSEA DE RATA.  
II. EFECTO DE EXTRACTOS DE DIVERSOS TEJIDOS DE RATA SOBRE LA INCORPORACION IN VITRO DE FORMIATO-C<sup>14</sup> EN LOS ACIDOS NUCLEICOS DE MEDULA OSEA DE RATA**

Metabolism of the nucleic acids of rat bone marrow. II. Effect of extracts from several rat tissues on the *in vitro* incorporation of C<sup>14</sup>-formate into the nucleic acids of rat bone marrow.

JOSÉ MINGUELL, MARÍA PIEBER-PERRETTA y MARCO PERRETTA

*Instituto de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago.  
Cátedra de Bioquímica, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Chile.*

Recibido para su publicación el 15 de Septiembre de 1964.

RESUMEN

Se estudia el efecto de extractos libres de partículas de hígado, músculo, bazo, riñón y médula ósea de rata sobre la incorporación de formiato-C<sup>14</sup> en las bases de los ácidos nucleicos de médula ósea de rata incubada *in vitro*.

El extracto de hígado presenta mayor efecto y le sigue el extracto de músculo, mientras que los extractos de bazo, de riñón y de médula ósea producen un efecto mínimo.

El estímulo que producen los extractos de músculo sobre la incorporación de formiato en la adenina y la timina de las diversas fracciones estudiadas es semejante al observado previamente en los extractos de hígado, aunque de menor magnitud.

El hecho de que haya una correlación entre el contenido de glucosa de los extractos y su efecto estimulante de la incorporación del formiato, por una parte, y el efecto demostrado de la glucosa sobre este proceso, hace pensar que el efecto estimulante de estos extractos sea, si no exclusivamente al menos en gran parte, la consecuencia de su contenido en glucosa.

INTRODUCCIÓN

Diversos autores han establecido que la biosíntesis de los ácidos nucleicos por suspensiones de células de médula ósea *in vitro* aparece considerablemente menor que la que corresponde a los resultados obtenidos *in vivo*, y que esta síntesis se aumenta cuando se incuba médula ósea con extracto de hígado libre de partículas, si se juzga por el aumento notable de la incorporación del formiato-C<sup>14</sup> en la adenina del ácido ribonucleico (RNA), del ácido desoxiribonucleico (DNA) y de la

fracción ácido-soluble (FAS), así como de la timina del DNA (1, 2, 3, 4, 5).

Estudios realizados por Lajtha *et al.* (6), en conejos hepatectomizados han demostrado que la incorporación de formiato-C<sup>14</sup> en la adenina y la timina del DNA de la médula ósea es prácticamente nula. Smellie *et al.* (3) y nosotros (1) hemos observado que la biosíntesis de los ácidos nucleicos en la médula ósea *in vitro* aumenta cuando el tejido se incuba en presencia de extractos de hígado libre de partículas. Estos hechos sugieren que el hígado desempeña un papel importante en la síntesis de estos compuestos en la médula ósea, tejido que siendo de rápida proliferación necesitaría de aportes veni-

(\*) Este trabajo fue financiado en parte por la Fundación Rockefeller (Grant GA-MNS 60174).

dos de fuera para realizar su metabolismo con la velocidad normal. El hígado podría aportar un precursor o algún factor importante para la síntesis de los ácidos nucleicos.

Sin embargo, experimentos realizados por Thomson (7) han demostrado que la incorporación de formiato- $C^{14}$  en la adenina y la timina del DNA de la médula ósea en ratas, no disminuye por exclusión del hígado derivando la sangre de la porta hacia la vena yugular, ni cortando el flujo sanguíneo a través del hígado mediante ligaduras de las venas respectivas. Estos resultados hacen pensar que el hígado no sería la única fuente de precursores, factores o sustratos que la médula ósea necesita para la síntesis de sus ácidos nucleicos, sino que también podrían serlo otros tejidos.

En el presente trabajo se refieren los resultados obtenidos en experimentos de incubación de médula ósea de rata *in vitro* en presencia de extractos libres de partículas de hígado, músculo, riñón y médula ósea de rata, en los cuales se estudia la incorporación del formiato- $C^{14}$  en los ácidos nucleicos de la médula ósea de rata. Como hemos mostrado (9) que la glucosa estimula la incorporación de formiato marcado en la médula ósea de rata, contrariamente a lo que sucede en la médula ósea de conejo (2), no es imposible que el efecto estimulante de estos extractos sea la consecuencia de su contenido en glucosa. Por este motivo en los diversos extractos utilizados se analizó la cantidad de glucosa que entregaban al medio.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Para la preparación de los extractos se utilizaron ratas machos del linaje "A x C" cuyo peso corporal variaba entre 165 y 175 g. Estos extractos fueron preparados centrifugando un homogeneizado de tejido a 100.000 x g, de acuerdo con el método descrito por Perretta y Pieber-Perretta (1) para la obtención del extracto hepático. Para la preparación del extracto de músculo (ELPM) se utilizaron los músculos femoral y tibial de las ratas.

El extracto perclórico del músculo (EPM) se obtuvo tratando 5 ml del ELPM con  $HClO_4$  al 70% hasta pH 1, separando el sobrenadante por centrifugación y neutralizando con KOH. Toda esta operación se realizó a 0°C. El clorato de potasio formado se separó por centrifugación. El sobrenadante (EPM) se conservó congelado a -20°C. La diálisis de los extractos se realizó contra solución amortiguadora

Krebs-Ringer bicarbonato, en flujo continuo durante 4 horas a 4°C utilizando tubos de diálisis de poros de 4,78 Amstrong de diámetro. La fracción dializable se ensayó en el medio de incubación mismo.

Los experimentos de incubación se realizaron siguiendo el mismo método descrito anteriormente (1). La adición de los distintos extractos utilizados se hizo siempre en tal forma que cada medio de incubación contenía 8 mg de proteína del extracto.

La separación y la determinación de las bases que forman parte del RNA, DNA y FAS se practicaron en la forma siguiente: terminado el período de incubación la suspensión celular se centrifugó a 5.000 r.p.m. a 4°C separando las células, las cuales se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de Krebs-Ringer helada. Se eliminaron los sobrenadantes y el precipitado celular se trató con  $HClO_4$  0,7 N en frío. Realizada esta operación, la fracción ácido soluble (FAS) se encuentra en el sobrenadante y el RNA y el DNA en el precipitado. La fracción FAS se hidrolizó por calentamiento con  $HClO_4$  concentrado a 100°C y las bases liberadas se separaron por cromatografía bidimensional en la forma indicada por Smellie *et al.* (3). Las bases de RNA y DNA se separaron y determinaron según la técnica descrita por el mismo autor (3). La radioactividad de las bases se contó en capas de espesor mínimo en un contador de flujo  $2\pi$ , construido en el Instituto de Física y Matemáticas de la Universidad de Chile.

#### RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos en los experimentos en que se estudió la influencia de diferentes extractos de tejidos de rata sobre la incorporación del formiato- $C^{14}$  en los ácidos nucleicos de la médula ósea de rata. Como puede apreciarse, entre los extractos estudiados sólo el de músculo presenta algún efecto semejante al descrito por Perretta *et al.* para los extractos hepáticos (1).

El efecto del extracto de hígado se caracteriza por una estimulación de la incorporación de formiato- $C^{14}$  que es del orden de 3 veces en la adenina de la FAS y del RNA y en la timina del DNA y de 9 a 10 veces en la adenina del DNA, lo que está de acuerdo con lo observado previamente por Perretta *et al.* (1). El extracto de músculo estimuló la incorporación del formiato marcado en la adenina de la FAS y del RNA en forma semejante a la que produce el extracto de hígado; sin embargo, el efecto sobre la incorporación del DNA es diferente: mientras que el extracto de hígado aumenta

TABLA I

Efecto de extractos libres de partículas de diversos tejidos de ratas sobre la incorporación *in vitro* de formiato- $C^{14}$  en la adenina de la FAS, del RNA y del DNA y en la timina del DNA de médula ósea de rata. Los resultados están expresados en la media aritmética  $\pm$  el error tipo del porcentaje de actividad específica de cada fracción con respecto al testigo. Las cifras entre paréntesis indican el número de muestras.

Tejido	Adenina FAS	Adenina RNA	Adenina DNA	Timina DNA
Hígado	255 $\pm$ 18 (5)	350 $\pm$ 21 (10)	912 $\pm$ 54 (10)	365 $\pm$ 27 (10)
Músculo	270 $\pm$ 48 (5)	239 $\pm$ 28 (14)	479 $\pm$ 44 (14)	240 $\pm$ 39 (70)
Bazo	118 $\pm$ 15 (4)	125 $\pm$ 31 (8)	227 $\pm$ 23 (7)	99 $\pm$ 26 (6)
Riñón	122 $\pm$ 16 (3)	172 $\pm$ 33 (6)	296 $\pm$ 33 (6)	—
Médula ósea	154 $\pm$ 46 (2)	154 $\pm$ 47 (3)	213 $\pm$ 70 (4)	100 $\pm$ 9 (4)

Condiciones: Cada muestra estaba constituida por 80 a 100 millones de células de médula ósea suspendidas en solución amortiguadora de Krebs-Ringer bicarbonato. La suspensión contenía además, uno de los extractos estudiados y 5 microcuries de formiato- $C^{14}$  de actividad específica de 22,3 milicurie por milimol. El volumen final fue de 5 ml y todos los extractos utilizados poseían una cantidad igual de proteínas (8 mg).

Cada experimento se corrió por duplicado o triplicado.

TABLA II

Efecto del extracto de músculo sometido a diversos tratamientos, sobre la incorporación *in vitro* de formiato- $C^{14}$  en bases del RNA y DNA de la médula ósea de rata. (Experimento tipo).

Muestras	Bases analizadas	Actividad específica	
		Cuentas/minuto/micromol de base RNA total	DNA
Testigo	Adenina	1.445	1.695
	Timina		6.350
Extracto de músculo	Adenina	3.275	5.850
	Timina		10.650
Sobrenadante perclórico	Adenina	2.370	3.125
	Timina		7.450
Fracción dializable	Adenina	2.350	4.575
	Timina		10.000
Fracción no dializable	Adenina	1.875	2.225
	Timina		5.900
Sobrenadante de extracto hervido	Adenina	2.300	5.350
	Timina		10.500

Las condiciones fueron las mismas descritas en la Tabla I, a excepción de la actividad específica del formiato, que fue de 23,9 milicuries por milimol. Las fracciones fueron ajustadas a un volumen igual al del extracto de músculo original.

TABLA III

Concentración de glucosa en los extractos libres de partículas de tejidos de rata normal

Tejido	Glucosa micromoles/ml
Hígado	22,7
Músculo	4,2
Bazo	0,03
Riñón	0,03
Médula ósea	0,03

La determinación de glucosa se efectuó mediante la reacción ezimática de la glucosa-oxidasa con el reactivo "Glucostat" (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey).

10 veces la incorporación en la adenina del DNA y en la timina 3 veces, el del músculo produce un aumento de la incorporación del orden de 4 a 5 veces en la adenina y del orden de 2 veces en la timina.

Los extractos de riñón, bazo y médula ósea no mostraron efecto estimulante sobre la incorporación del formiato- $C^{14}$  en la adenina del FAS ni del RNA ni en la timina del RNA; en cambio, estimularon muy levemente la incorporación de formiato en la adenina del DNA.

Con el objeto de obtener información acerca de algunas propiedades del o de los compuestos responsables de la acción estimulante, se sometieron los extractos de músculo a diversos tratamientos que aparecen detallados en la Tabla II. Desde luego, los datos que en ella aparecen muestran que el factor responsable dializa, pues la fracción no dializable carece de actividad. El factor resiste también al calentamiento durante 15 minutos a la ebullición en ampollas cerradas y el tratamiento con ácido perclórico produce sólo una pérdida parcial de la actividad. Estas características coinciden con las que presenta el compuesto responsable de la actividad del extracto hepático (5).

En la Tabla III aparece el contenido de glucosa que tienen los diferentes extractos utilizados. En ella puede apreciarse, como era de esperar, que el extracto de hígado es especialmente rico, el extracto de músculo es menos y que los extractos de bazo, riñón y médula ósea tienen cantidades prácticamente no determinables.

## DISCUSIÓN

Los resultados presentados confirman el hecho de que extractos hepáticos libres de partículas estimulan la incorporación de formiato- $C^{14}$  en las bases de los ácidos nucleicos y demuestran que este efecto es también compartido por extractos de músculo de rata. En cambio, los extractos de bazo, riñón y médula ósea tienen una acción muy pequeña en este mismo sentido. Las características del principio responsable de la actividad de los extractos de hígado y de músculo así como su contenido de glucosa, son coincidentes con la idea de que el efecto puede ser la consecuencia del aporte de glucosa al medio de incubación. En efecto, teniendo presente el contenido de glucosa que muestran los extractos originales y la dilución que se produce en el medio de incubación, puede calcularse que el extracto de músculo entrega entre 0,9 y 1,3  $\mu$ moles y los extractos hepáticos, entre 4,5 y 6,8  $\mu$ moles de glucosa al líquido de incubación. Estas cantidades están dentro de las concentraciones que se han mostrado estimulantes de la incorporación de formiato- $C^{14}$  en experimentos publicados por nosotros (9). El aporte que hacen los extractos de bazo, riñón y médula ósea varía entre 0,06 y 0,009  $\mu$ moles de glucosa, cantidades que según nuestros experimentos no ocasionan estimulación. Todos estos resultados hacen muy probable que el efecto estimulante de los extractos de hígado y de bazo sean, si no exclusivamente, al menos en gran parte la consecuencia del aporte de glucosa que hacen al medio de incubación.

## SUMMARY

In this paper we have studied the effect of particle-free extracts prepared from liver, muscle, spleen, kidney and bone marrow of normal rat on the incorporation *in vitro* of  $C^{14}$ -formate into the nucleic acids of normal rat bone marrow.

The liver extract had the greater effect following the  $C^{14}$ -formate incorporation pattern previously established by us (1). The muscle extract had a smaller effect whereas the extracts of the other tissues were practically inactive presenting only a slight effect on DNA adenine, as it is shown in table I.

Table II shows that  $C^{14}$ -formate uptake was stimulated by the supernatant of

boiled muscle extract, by the muscle extract diffusate and by the supernatant of the muscle extract when it was treated with perchloric acid. These results are in agreement with previous results obtained by us in the same conditions with the liver extract (5).

Table III shows that the greater effect was obtained with the extracts that contain glucose (liver and muscle), while no effect was obtained with the extracts in which glucose is practically absent (spleen, kidney and bone marrow).

These results confirm our previous findings (5, 9) and suggest that the effect is mainly due to the glucose content of the extracts.

#### REFERENCIAS

1.—PERRETTA, M. y PIEBER-PERRETTA, M.—

- Biochim. Biophys. Acta 61:828, 1962.  
 2.—THOMSON, R. Y.; SMELLIE, R. M. S. y DAVIDSON, J. N. — Biochim. Biophys. Acta 29:308, 1958.  
 3.—SMELLIE, R. M. S.; THOMSON, R. Y. y DAVIDSON, J. N. — Biochim. Biophys. Acta 29:59, 1958.  
 4.—PERRETTA, M.; RUDOLPH, W.; AGUIRRE, G. y HODGSON, G. — Biochim. Biophys. Acta 87:157, 1964.  
 9.—PERRETTA, M.; PIEBER-PERRETTA, M. y MINGUELL, J. — Resultados no publicados.  
 6.—LAJTHA, L. G. y VANE, J. R. — Nature 182:191, 1958.  
 7.—THOMSON, R. Y. — Comunicación personal.  
 8.—MEHL, R.—J. Biol. Chem. 157:173, 1945.  
 9.—PERRETTA, M.; PIEBER-PERRETTA, M. y MINGUELL, J. — Arch. Biochem. Biophys. 105:449, 1964.  
 10.—THOMSON, R. Y.; RICCI, G. y PERRETTA, M. — Biochim. Biophys. Acta 45:87, 1960.