

CH-FC  
1C-B  
329

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR PATROCINANTE  
DRA. CATHERINE CONNELLY A.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

DIRECTOR DE TESIS  
DR. MARCO PERRETTA P.  
DIVISION DE BIOQUIMICA  
Y BIOFISICA  
INSTITUTO DE NUTRICION Y  
TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

"EFECTO DE ERITROPOYETINA Y TESTOSTERONA SOBRE EL METABOLIS-  
MO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS DE FRACCIONES CELULARES DE MEDULA  
OSEA DE RATA"

INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



TESIS PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN BIOLOGIA

MARGARITA CARU MARAMBIO

SANTIAGO-CHILE

1978

A MIS PADRES

Mis más sinceros agradecimientos:

A mi profesor guía Dr. Marco Perretta por su esmerada preocupación y permanente ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

A la Sra. Argelia Garrido por su constante y valiosa colaboración.

A mi profesor patrocinante Dra Catherine Connolly por sus valiosos consejos.

A la Sra. Felicita Rodriguez y al Sr. José Rivera por su eficiente colaboración técnica.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica del INTA que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado en parte por el Servicio Técnico de Desarrollo Científico y Creación Artística de la Universidad de Chile ( Proyectos N° 3241 y 4509 ).



## RESUMEN

La eritropoyé<sup>s</sup>is es un proceso gradual de diferenciación y proliferación celular que se inicia desde células primitivas pluripotenciales hasta llegar a una célula especializada que es el eritrocito. En este proceso intervienen las hormonas eritropoyetina (EP) y testosterona (T) como factores reguladores.

El propósito de este trabajo es determinar el nivel citológico donde actúan ambas hormonas. Usando gradiente de densidad de ficoll como método de fraccionamiento celular, se obtuvieron fracciones enriquecidas con ciertos tipos de eritroblastos. Se midió el efecto de EP y T en la incorporación de formiato- $C^{14}$  a los ácidos nucleicos de 3 fracciones celulares de médula ósea obtenida de ratas normales, anémicas y policitemicas.

Los resultados indican que se produce un efecto selectivo de EP y T sobre determinados tipos de célula de la población eritroide, encontrándose que EP induce preferentemente la síntesis de RNA en células morfológicamente inmaduras, identificadas como proeritroblastos, y que este efecto disminuye a medida que avanza el proceso de diferenciación; mientras que T estimula la síntesis de RNA en células terminales del tipo de los eritroblastos policromatofílicos. También se ha encontrado que EP y T tienen efecto directo sobre las células eritroides capaces de dividirse induciendo en ellas la síntesis de DNA.

Estas evidencias, junto a otras de la literatura permiten postular que EP y T actúan en forma combinada sobre la mé-



dula ósea, activando la expresión génica en ciertas células eritroides, gatillando un proceso de diferenciación y proliferación celular, que significa la generación de la maquinaria biosintética para la hemoglobina, que es la macromolécula que caracteriza el fenómeno eritropoyético.

### SUMMARY

The erythropoiesis is a gradual process of cell differentiation and proliferation which starts from pluripotential primitive cells to a specialized cell, the erythrocyte. In this process the hormones erythropoietin (EP) and testosterone (T) participate as regulating factors.

The objective of this work is to determinate the cytological level at which both hormones act. Using ficoll density gradient as a method of cellular fractionation, enriched fractions with certain types of erythroblasts were obtained. The effect of EP and T on the incorporation of  $^{14}\text{C}$  formate to the nucleic acids of three cellular fractions of bone marrow obtained from normal, anemic and polycythemic rats was measured.

The results indicate that a selective effect is produced by EP and T on certain types of cells of the erythroid population. EP induces preferentially RNA synthesis in morphologically immature cells identified as proerythroblasts, effect that diminishes while the process of differentiation proceeds. On the other hand T stimulates the RNA synthesis in terminal cells of the polychromatic erythroblasts type. It has also been shown that EP and T have a direct effect on dividing erythroid cells stimulating DNA synthesis.

The evidence of this study and published works suggest that EP and T may act in a synergic manner on bone marrow, activating gene expression in different erythroid cells by triggering a process of cellular differentiation and proliferation in order to create the biochemical machinery for hemoglobin synthesis, the macromolecule that characterizes the erythropoietic phenomenon.

ABREVIATURAS

DNA = ácido dextrorribonucleico  
RNA = ácido ribonucleico  
RNAm = ácido ribonucleico mensajero  
EP = Eritropoyetina  
T = Testosterona  
AE = actividad específica  
EDTA = ácido etilendiaminotetracético (sal disódica)  
SBSS = Seligman's Balanced Salt Solution  
CSE = célula sensible a la eritropoyetina  
uCi = micro curie  
cpm = cuentas por minuto



## INTRODUCCION

Aunque todas las células que conforman un organismo poseen el mismo material genético, este presenta una gran diversidad de funciones celulares que se pueden explicar como el producto de delicados y complicados mecanismos de regulación que modulan la expresión de los genes.

Existen bastantes evidencias que las hormonas intervienen en estos procesos de regulación. Aunque su acción a nivel molecular se desconoce en gran medida, muchos de los datos acumulados sugieren que las hormonas controlan la síntesis de proteínas específicas, mediante la regulación del metabolismo del RNA.

Para conocer los mecanismos bioquímicos del proceso de diferenciación se utilizan modelos biológicos simples. La eritropoyesis nos provee de un sistema útil para el estudio de los eventos moleculares que provocan este fenómeno.

La eritropoyesis es un proceso de diferenciación y proliferación celular desde células primitivas (Células Stem) pluripotenciales hasta células altamente especializadas como son los eritrocitos (1). La diferenciación a este nivel representa el compromiso que adquiere una determinada línea hematopoyética al estar afectada por factores microambientales (2). La célula stem al comprometerse con la línea eritroide prolifera en unas pocas generaciones hasta transformarse en una célula que es sensible a la eritropoyetina (EP) (3), hormona de naturaleza mucoproteica que participa en la regulación del proceso eritropoyótico (4). El riñón es el principal sitio

de su producción (5), originándose como un factor eritropoyético renal (REF) inactivo, que en plasma circulante se transforma en EP activa (6).

La hormona actúa sobre este tipo especial de células llamadas Células Sensibles a la Eritropoyetina (CSE) (7), alterando el metabolismo de los ácidos nucleicos.

Goldwasser y col. (8) han postulado la presencia de un receptor a nivel de la membrana de CSE, que es reconocido por la EP formando un complejo hormona-receptor que estimula la actividad de un factor citoplasmático de carácter proteico, el cual a su vez induce procesos que en el núcleo provocan respuestas en la cromatina. Este mecanismo postulado es diferente al de otras hormonas peptídicas, en los cuales la acción hormonal está mediada por nucleótidos cíclicos. Muchos autores descartan la participación del AMPc, aunque otros estiman que el GMPc es el mediador (9). No se conoce todavía una explicación clara de estas etapas a nivel molecular.

Se ha demostrado que la EP o las señales que provoca estimulan la síntesis de varios tipos de RNA en médula ósea de rata (10,11). Los resultados obtenidos son muy controversiales, ya que mientras Perretta y col. (12) sostienen que la EP induce selectivamente la síntesis de RNA mensajero, Goldwasser y col. (13) observan la aparición de muchos tipos de RNA y entre ellos RNA ribosomales y de transferencia como consecuencia de la primera acción inductora de la hormona.

Al parecer el efecto hormonal estaría mediado por cambios en la actividad RNA polimerásica. En médula ósea de rata, Perretta y col. (14) observaron previamente un efecto de la hor-



mona sobre la actividad RNA polimerásica. Recientemente se informó que, en bazo de ratones policitómicos ex-hipóxicos (15) y en médula ósea de rata (16), el efecto más temprano de la EP es la estimulación de la actividad de la RNA polimerasa II.

También se ha comprobado que algunos esteroides actúan sobre células de médula ósea de rata influenciando la respuesta de la EP (17,18). Sin embargo los mecanismos por los cuales se incrementa la eritropoyésis no han sido completamente clarificados. Algunos autores sugieren que el estímulo se debe a un efecto indirecto de los esteroides, porque incrementan la producción renal de EP (19,20). Otros han mostrado evidencias que indican que estas hormonas pueden ejercer un efecto directo sobre células blanco específicas de la médula ósea (21,22). Así Valladares y Minguell demostraron la presencia de un receptor nuclear específico para T en médula ósea de rata (23).

Los esteroides androgénicos pueden estimular el metabolismo de los ácidos nucleicos (24,25), como también aumentar la actividad de una ribonucleasa altamente específica, localizada en núcleos de células de médula ósea (25,26).

Recientemente Minguell y col. probaron que T estimula la síntesis de RNA ribosomal en núcleos aislados de médula ósea de rata, por un efecto selectivo sobre la actividad de la RNA polimerasa I nucleolar (27).

Hasta ahora la mayoría de la información obtenida sobre la eritropoyésis ha surgido del estudio de sistemas heterogéneos ya que se trabaja con el tejido hematopoyético total; es



to presenta una gran desventaja, al encontrarse con mezclas de células de diferentes líneas hematopoyéticas y en todos los estados de maduración. Además en estos sistemas no hay sincronía en el proceso de diferenciación. De tal modo que cada vez que se desea cuantificar un cambio bioquímico durante el desarrollo eritroide se debe extrapolar los resultados obtenidos en el tejido completo.

Se ha intentado buscar sistemas más homogéneos y sincrónicos. Se ha utilizado bazo de ratón adulto, el cual es un órgano de baja actividad eritropoyética comparado con la médula, sin embargo cuando se inducen anemias hemolíticas éste pasa a ser el sitio principal de producción de células rojas (41). Las ventajas de este sistema son: a) Cierta grado de sincronía en el proceso, en el período inmediatamente después del estímulo y b) mayor cantidad de tejido eritropoyético. También se han usado animales policitémicos en los cuales el proceso de diferenciación eritropoyética está virtualmente detenido tanto en médula como en bazo. La administración de EP a estos animales policitémicos inicia rápidamente una onda eritropoyética, proporcionando un sistema sincrónico de diferenciación celular (28).

No obstante una mejor comprensión de los eventos moleculares que ocurren durante la diferenciación eritroide dependerá en gran medida del desarrollo de una técnica que permita la separación física de células en diferentes estados de maduración, y su consiguiente recolección en cantidades suficientes para permitir una caracterización bioquímica precisa.

Muchas técnicas han sido empleadas para separar las células y entre las más usadas están las de gradientes de densidad (29) y las de velocidad de sedimentación (30,31).

McCool y col. (32) han separado las células de médula ósea de rata en base a su velocidad de sedimentación, encontrando dos poblaciones celulares que responden a la EP. La fracción I, que corresponde a células con velocidad de sedimentación entre 4.7 y 8.1 mm/h, fué fuertemente estimulada por EP, mientras que la fracción III que contiene células que migran entre 1.3 y 3.9 mm/h exhibe un débil estímulo por parte de EP.

Zucali y col. (33), usaron gradientes de densidad discontinua de sero-albúmina de bovino para separar las células de médula ósea. Las fracciones celulares fueron cultivadas en presencia y ausencia de EP y se midió la capacidad de incorporación de  $Fe^{56}$  al grupo heme en cada una de ellas. Los resultados indican que "in vitro" la EP influencia al menos dos poblaciones celulares diferentes.

Singer y Adamson (22) han demostrado que en médula ósea la etiocolanolona (un metabolito no androgénico de T) y fluoximisterona (un androgéno sintético) aumentan en un 67.5% y 71.4% respectivamente el número de colonias eritroides, en presencia de EP. Cuando la médula ósea fué fraccionada por velocidad de sedimentación, y las fracciones celulares fueron cultivadas para medir el N° de colonias/fracción, encontraron que fluoximisterona aumenta el número de colonias de aquella fracción con velocidad de sedimentación de  $8.12 \pm 0.32$  mm/h similar a las colonias dependientes de EP. El in



crecimiento de colonias dependientes de etiocolanólona está representado por dos picos, con velocidad de sedimentación de  $8.56 \pm 0.11$  y  $5.96 \pm 0.31$  mm/h ambas estadísticamente diferentes del pico de colonias dependientes de EP

Frente a estas evidencias se ha creído de interés diseñar experimentos para estudiar el efecto de EP y T en fracciones de médula ósea de rata, usando gradientes de densidad de ficoll como método de fraccionamiento celular, a fin de poder determinar el sitio de acción de EP y T, a nivel citológico. Al estudiar "in vivo" la incorporación de un precursor radiactivo a los ácidos nucleicos de cada fracción celular en presencia y ausencia de ambas hormonas se determinará como esta incorporación varía en el tiempo, obteniéndose así el parametro experimental para demostrar el efecto hormonal.

Se realizaron experimentos con animales en 3 estados fisiológicos: normales, anémicos y policitémicos, con el objeto de comparar el efecto de estas hormonas en cada fracción celular.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que EP y T estimulan en diferente grado la incorporación de formiato- $C^{14}$  a los ácidos nucleicos de cada fracción, lo que nos dá una idea aproximada de los tipos celulares sensibles a la acción de ambas hormonas. Estas evidencias experimentales junto con aquellas citadas anteriormente apoyan la idea de que EP y T pueden actuar de manera sinérgica tanto a nivel bioquímico como citológico, y estan de acuerdo con el modelo planteado por Minguell y Perretta (34) quienes proponen que



EP al actuar sobre las CSE provoca un proceso de diferenciación cuya característica molecular sería la inducción de la síntesis de pre-RNA<sub>m</sub> de alto peso molecular. Las células más maduras serían sensibles a la acción de la T, lo que a nivel molecular significa el estímulo de la síntesis de RNA ribosomal y el aumento de la actividad de ribonucleasas específicas. El efecto combinado de EP y T provocarían los estímulos necesarios para desarrollar la maquinaria para la síntesis de la hemoglobina.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.- Reactivos

Formiato-C<sup>14</sup> (actividad específica 56 mc/mM) proveniente de New England Nuclear Corporation, Boston Mass.

Eritropoyetina (5.9 U/mg) (Etapa 3 CMCL) proveniente de Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canadá.

Propionato de Testosterona y Ficoll para gradientes de densidad fueron obtenidos de la Sigma Chemical Company, USA.

Otros reactivos utilizados fueron Merck de grado analítico.

### 2.- Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (170-210 g) las cuales fueron inyectadas con 20 uCi de formiato-C<sup>14</sup> por vía intravenosa.

Cuando se ensayó con EP cada rata recibió una inyección intravenosa de 4.5 U de EP (5.9 U/mg) suspendida en suero homólogo descomplementado. La dosis de T fue de 250 ug/animal aplicada de la misma manera que la EP. Después de cada pulso, el animal fue sacrificado por desangramiento. La médula ósea se extrajo del fémur y tibia con buffer SBSS (//).

Los experimentos fueron diseñados con animales normales anémicos y policitémicos.

La policitemia fue inducida por una inyección intraperitoneal, de un volumen equivalente al 5% del peso del animal, de una suspensión de glóbulos rojos isólogos al 80 % (v/v) en NaCl 0.9%. La sangre fue obtenida por punción cardíaca, usando heparina como anticoagulante. La hemoglobina

(//) SBSS = Seligman's Balanced Salt Solution.

(Hb) fué medida 48 h después de la transfusión, como índice de la policitemia, por el método de Cannan (35). Se utilizaron las ratas cuya hemoglobina fluctuaba entre 21-23 g % Hb.

La anemia fue provocada por hemólisis con fenilhidrazina neutralizada. Cada rata recibió 3 inyecciones subcutáneas de 1 mg por cada 10 g de peso del animal, cada una, el primero, cuarto y séptimo día. La médula fue extraída el octavo día. El grado de anemia se determinó por el porcentaje de hemoglobina, utilizando aquellos animales cuya hemoglobina fluctuaba entre 7-9 g % Hb. En ratas normales los valores fueron entre 14-15 g % Hb.

### 3.- Obtención de Células.-

Se extrajo la médula ósea de femur y tibia en frío (4°C), con buffer SBSS. La suspensión celular se filtró por gasa y luego se centrifugó a 600 x g durante 10 minutos.

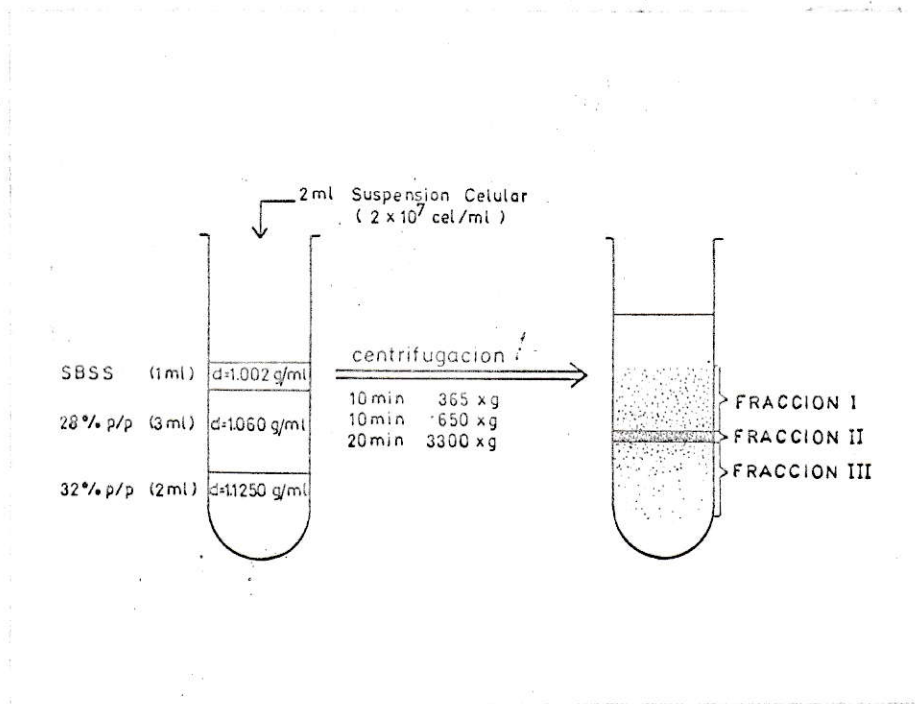
El pellet celular fue resuspendido en 2 ml de SBSS con EDTA (2 mg/ml). El EDTA fue usado para disminuir el efecto del ficoll sobre la agregación celular. Una fracción de esta suspensión celular fue diluida 1:200 para conteo celular, previa tinción con Azul de Metileno, ajustando la concentración a  $2 \times 10^7$  células/ml.

### 4.- Separación Celular.-

La separación de las células de médula ósea de rata se realizó por gradientes de densidad de ficoll siguiendo el método de Cutts y col. con algunas modificaciones (36).

Una solución stock de 32% (p/p) de ficoll fue preparada en buffer SBSS y mantenida a -20°C. Por dilución con el mismo buffer se obtuvo una solución 28% (p/p).





En tubos siliconizados se colocaron: 2 ml (32% p/p); 3 ml (28% p/p); 1 ml (SBSS) y se dejó estabilizar por 60 hrs.

La médula ósea de una rata fue repartida en dos gradientes. 2 ml de suspensión celular en SBSS con EDTA (2 mg/ml), que contiene aproximadamente  $4 \times 10^7$  células, fueron colocadas cuidadosamente sobre la gradiente. Los tubos se centrifugaron en forma diferencial: 10 min. a 365 x g; 10 min a 650 x g; 20 min a 3300 x g. En centrifuga Sorvall modelo RC2-B, con rotor de ángulo variable GSA HB-4 a 4°C. Después de la centrifugación se observan 3 bandas celulares, las cuales se colectaron con pipeta pasteur. Luego de diluir cada fracción con buffer SBSS se centrifugaron a 650 x g durante 10 minutos. El pellet celular fue lavado 1 vez con SBSS, para retirar el ficoll.

Un frotis de cada fracción se realizó, tiñiendo con co-

loración May Grünwald-Giemsa.

El pellet celular obtenido de cada fracción se homogenizó en  $\text{HClO}_4$  0.7 N y se extrajo el RNA y DNA de acuerdo a la técnica de Smellie y col. (37), determinándose la actividad específica del RNA y DNA.

#### 5.- Determinación de la Actividad Específica.

La radiactividad de cada fracción se midió en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago, modelo Mark I (51% de eficiencia para  $\text{C}^{14}$ ), usando solución de BRAY como mezcla de centelleo(38).

La concentración de RNA y DNA total de la células se determinó colorimétricamente, usando la reacción del orcinol(39) y difenilamina (40) respectivamente.

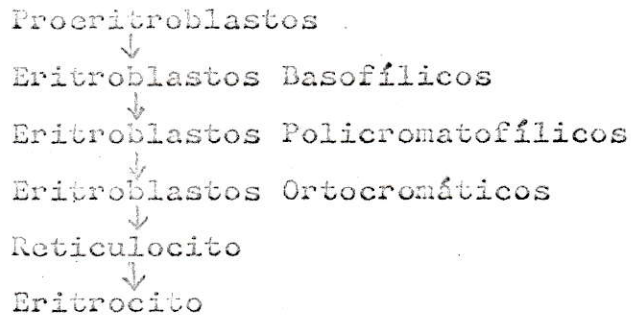
La actividad específica de los ácidos nucleicos fue expresada en cpm/mg de RNA o DNA.

#### 6.- Estadística.

La significancia estadística de los valores experimentales fue analizada de acuerdo al Test de Significancia de Fisher entre 2 muestras promedio(49).

## RESULTADOS

El mecanismo de citodiferenciación y proliferación celular por el cual se originan los eritrocitos desde células basales pluripotenciales, se denomina ERITROPOYESIS y está esquematizado como sigue:



El gran interés en la diferenciación celular animal, y en particular el conocer el origen de las células de la sangre desde las células hematopoyéticas basales, generó la necesidad de desarrollar técnicas de fraccionamiento celular.

La separación de células en base a sus diferencias en la densidad ha sido uno de los métodos más extensamente usados de todos los procedimientos físicos de separación. La densidad de una célula refleja su composición química promedio, más que sus características de tamaño. Todos los componentes de una célula, entre ellos, agua, proteína, ácidos nucleicos, lípidos etc., difieren sustancialmente en densidad, sin embargo ya que la mayoría de las células tienen aproximadamente una proporción similar de estos componentes, el rango de densidad de las células entre sí es muy estrecho, por lo que los métodos de separación, usualmente dependen de pequeñas variaciones en la densidad. Normalmente el núcleo de una célula es más denso que el citoplasma, de tal modo que



una razón núcleo/citoplasma alta generalmente significa mayor densidad. A este respecto la serie eritroide presenta una gran ventaja, pues la densidad del núcleo de los eritroblastos comienza a ser mayor en el transcurso del proceso de diferenciación. Esto se debe a que el núcleo sufre un proceso paulatino de condensación de la cromatina, desde el proeritroblasto, cuya cromatina se presenta en forma de filamentos delgados, formando un scudorretículo, hasta el eritroblasto ortocromático que posee en núcleo altamente heteropicnótico.

El diametro celular también está afectado durante el proceso de diferenciación, el cual disminuye desde 20-25 u en el proeritroblasto a 7.5 u en el eritrocito.

En cuanto al citoplasma, el incremento en la cantidad de hemoglobina a medida que transcurre el desarrollo eritroide también influye en la densidad celular.

Estos tres factores: condensación del núcleo, disminución del diametro celular y aumento de la cantidad de hemoglobina, determinan un incremento paulatino de la densidad celular a medida que avanza el proceso de diferenciación celular.

De los diferentes sistemas de fraccionamiento ensayados se adoptó la gradiente de densidad de ficoll que permitió obtener 3 fracciones celulares, que aunque son heterogéneas proporcionan una fracción casi libre de células inmaduras.

En la tabla I se muestran los porcentajes promedios de los diferentes tipos celulares, encontrados en las 3 fracciones de médula ósea de rata normal. Se puede observar que los proeritroblastos representan el 10.7 % de la serie eritroide



TABLA I

DISTRIBUCION DE LOS TIPOS CELULARES EN 3 FRACCIONES DE MEDULA OSEA DE RATA NORMAL

	MEDULA OSEA			
	NO FRACCIONADA	FRACCION I	FRACCION II	FRACCION III
A.- SERIE ERITROIDE	40.2 %	45 %	41.8 %	23.1 %
B.- SERIE NO ERITROIDE	59.8 %	55 %	58.2 %	76.9 %
PROERITROBLASTOS	10.2 %	26.1 % *	6.7 %	1.5 %
E. INTERMEDIARIOS	69.9 %	57.9 %	75.8 %	56.5 %
E. TERMINALES	19.4 %	16.0 %	17.6 %	42.0 %

Las células de médula ósea de rata se separaron por centrifugación diferencial (365xg, 650xg y 3300xg) en gradientes de densidad de ficoll (32% p/p, 28% p/p, SBSS). Se colectaron las fracciones y luego de diluir se centrifugaron (650xg). Se prepararon frotis siguiendo el método de May-Grünwald-Giemsa. (El recuento diferencial de células fue realizado por la Sra Argelia Garrido).

\* Porcentaje referido al total de células eritroides de esa fracción.



en la médula ósea no-fraccionada. Cuando se fraccionó la mé  
dula ósea, este conjunto de células inmaduras se cncentró  
en la fracción I donde representan el 26.1 % de las células  
eritroides de esa fracción, lográndose un incremento de 2,4 ve  
ces con respecto al control no-fraccionado. Estas células se  
caracterizan por una intensa basofilia citoplasmática, un nú  
cleo de forma redondeada que ocupa la mayor parte del citoplas  
ma con nucléolo visible y cromatina laxa. En la fracción II  
por el contrario, los proeritroblastos están disminuidos con  
respecto al total de células eritroides de esa fracción en  
cambio los eritroblastos intermediarios son los predominantes  
que dan cuenta del 75.8 % de la población eritroide de esa  
fracción. Entre este tipo de células están los eritroblastos  
basofílicos que son células de tamaño algo menor que los pro  
eritroblastos, de basofilia menos acentuada cuya cromatina ha  
comenzado a condensarse y cuyos nucléolos son poco visibles.  
Los eritroblastos policromatófilicos representan otro tipo de  
células intermediarias, con cromatina más condensada y sin nu  
cléolo visible. La policromatofilia de su citoplasma es índi  
ce de la presencia de hemoglobina. En la fracción III están  
presente en mayor proporción las células intermediarias y ter  
minales, que representan el 56.5% y 42.0% respectivamente; es  
tas últimas corresponden a los eritroblastos policromatofili  
cos tardíos, cuyo citoplasma es aún policromatofílico, pero  
su núcleo se presenta heterocromático. En comparación con la  
médula no-fraccionada se observa un enriquecimiento en este  
tipo celular.



Efecto de EP y T sobre la actividad específica del RNA de 3 fracciones celulares de médula ósea de rata normal.-

Se midió la incorporación "in vivo" de formiato- $C^{14}$  al RNA de cada fracción celular en presencia y ausencia de ambas hormonas. A los 30 min (Tabla II) se observa un notorio efecto de EP en las 3 fracciones celulares siendo su acción preferencial a nivel de la fracción I, donde el incremento en la AE del RNA es del orden de 5 veces el control. En esta fracción se encuentra el mayor número de células inmaduras de la serie roja, tal como se indica en la tabla I. A los 30 min, T en cambio sólo provoca un aumento de la AE de la fracción III de un 56 %, no observándose un efecto significativo de esta hormona en las otras 2 fracciones. En comparación con el control no-fraccionado se mantiene la tendencia de EP de estimular en mayor grado la fracción I y T la fracción III. A este mismo tiempo el efecto más marcado de EP y T juntas (Fig 1) es a nivel de la fracción I, donde la AE es 6.7 veces el control. Sin embargo si comparamos la curva de EP vemos que en la fracción III el aumento en la AE es mucho mayor que la suma de los estímulos por separado de ambas hormonas, en comparación con las otras 2 fracciones.

A tiempos cortos es posible observar la acción de las hormonas sobre los diferentes tipos de células, ya que a los 30 min la distribución celular no se encuentra alterada, lo que sí podría ocurrir a tiempos mayores de acción de las hormonas, ya que en la célula se han gatillado procesos moleculares que pueden determinar una ligera modificación en la distribución celular. Estas modificaciones pueden no ser morfo-

TABLA II

EFFECTO DE ERITROPOYETINA Y TESTOSTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL RNA DE 3 FRACCIONES CELULARES DE MEDULA OSEA DE RATA NORMAL

FRACCION CELULAR	CON(+)	CON(+)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (cpm/mg RNA)	% ESTIMULO	
	SIN(-) T	SIN(-) EP		A	B
MEDULA NO FRACCIONADA	-	+	6128 ± 289	100	
	+	-	3630 ± 153	100	
	-	-	3298 ± 123		
FRACCION I	-	+	12805 ± 970	208	500
	+	-	3098 ± 198	-	121*
	-	-	2561 ± 201		100
FRACCION II	-	+	10328 ± 921	168	280
	+	-	3658 ± 247	-	102*
	-	-	3590 ± 154		100
FRACCION III	-	+	6378 ± 343	104*	200
	+	-	4873 ± 427	134	156
	-	-	3124 ± 301		100

COLUMNA A = Estimulo referido a valores encontrado en médula ósea no-fraccionada.

COLUMNA B = Estimulo referido al control de cada fracción.

Por ejemplo:  $\frac{+ (EP)}{\text{control}} = \frac{12805}{2561} = 5$

\* Valores no significativos ( $p < 0.05$ )



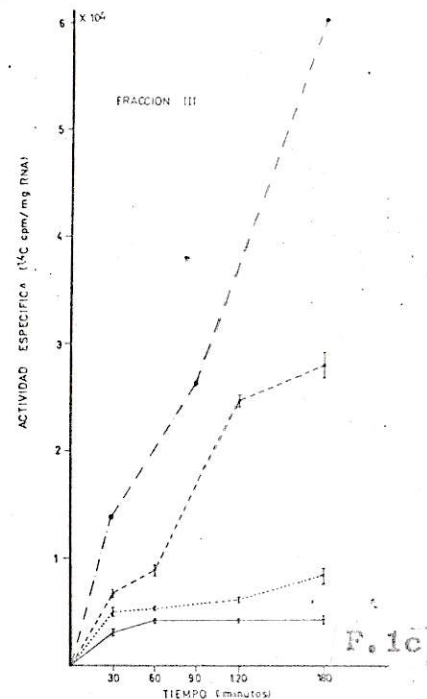
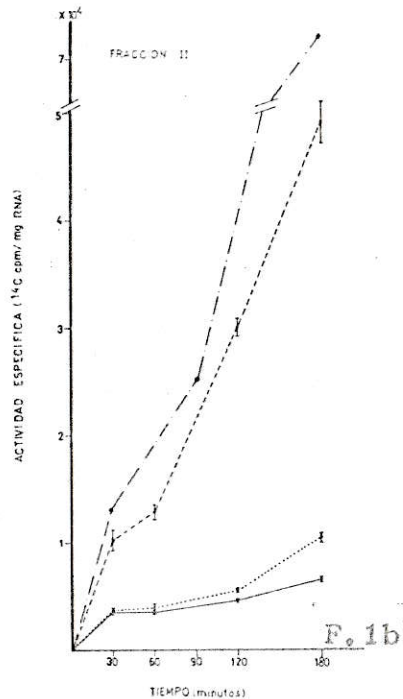
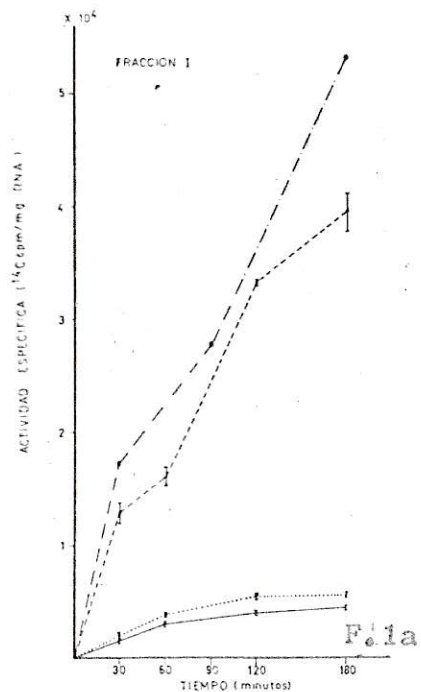


Figura 1.- Efecto de EP y T sobre la incorporación de formiato- $\text{C}^{14}$  al RNA total de tres fracciones celulares de médula ósea de rata normal.

Ratas hembras normales fueron inyectadas, por vía intravenosa, con T (250ug) y/o EP (4.5 U) más formiato- $\text{C}^{14}$  (20 uCi). A los tiempos señalados en el gráfico los animales fueron sacrificados, la médula se extrajo y se fraccionó en gradientes de densidad de ficoll. El RNA de cada fracción se aisló y se determinó su AE. Más detalles sobre las condiciones experimentales en materiales y métodos. 1a) Fracción I, 1b) Fracción II y 1c) Fracción III. Los resultados corresponden a un promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación standard.

Control ..... T ----- EP -.-.-.-.- EP+T



lógicamente distinguibles.

En la figura 1 se muestra el efecto de EP y T en el tiempo. Entre 60 - 120 min se puede observar que está muy aumentada la AE de las fracciones I y II, efecto que se puede deber porque en estas fracciones se encuentra concentrado el mayor número de células inmaduras. El efecto en la fracción III aunque evidente, se encuentra disminuido en relación a las 2 primeras fracciones y puede ser el reflejo del efecto hormonal sobre células inmaduras aún presentes en esa fracción. En este mismo intervalo de tiempo T no tiene aún efecto en las 2 primeras fracciones, en cambio en la fracción III, se observa un estímulo de aproximadamente un 45% sobre el control. A los 90 min de acción de EP+T se observa que no hay diferencias en las fracciones donde el estímulo de ambas hormonas corresponde a 7 veces el control en la fracción I y II y 6.5 veces en la fracción III, sin embargo si este efecto se compara con la curva de EP nuevamente se aprecia que en la fracción III se produce un marcado efecto sinérgico, similar al observado a los 30 min en esta misma fracción.

A los 180 min de acción de EP se observa un aumento de la AE del RNA que corresponde a 8.8 veces el control en la fracción I, 7.5 en la fracción II y 6.1 en la fracción III. El incremento de la AE en la fracción II puede estar dado por la presencia de eritroblastos inmaduros y además por los eritroblastos intermedarios, que representan el 76% de la población eritroide de esa fracción. Recien a este tiempo, la T provoca un aumento significativo en la fracción II donde se observa un estímulo del orden de un 60%, no obstante su efec-

to preferencial es sobre las células de la fracción III donde se aprecia un estímulo de un 95% sobre el control. A este mismo tiempo EP y T provocan un gran incremento en la AE del RNA del orden de 11.2 veces el control en la fracción I y II y de 14 veces en la fracción III.

Efecto de EP y T sobre la actividad específica del DNA de 3 fracciones de médula ósea de rata normal.-

La acción de ambas hormonas sobre el metabolismo del DNA se presenta en la Tabla III. A los 60 min la EP induce una respuesta similar en las fracciones I y II del orden de 6.8 veces su respectivo control y de 3.5 veces en la fracción III. El efecto estimulador de T es manifiesto en las fracciones I y II y corresponde a 2.3 veces el valor control. Cuando el efecto de ambas hormonas se compara con aquel encontrado en la médula ósea no-fraccionada se puede apreciar que hay un estímulo preferencial de EP y T sobre las células de la fracción I induciendo en ellas la síntesis de DNA.

En la figura 2 se muestran los efectos provocados por ambas hormonas, en el tiempo, sobre la síntesis de DNA de 3 fracciones celulares de médula ósea de rata normal. En el tiempo se aprecia que EP induce una respuesta mayor a nivel de la fracción I y II, y este efecto se hace más notorio a los 180 min donde se demuestra un estímulo de 9 veces el control en las 2 primeras fracciones, en cambio en la fracción III es de sólo 3.7 veces el valor control. T por su parte estimula preferencialmente las células de la fracción I, pues a los 180 min esta fracción exhibe un incremento de 2,9 veces



TABLA III

EFFECTO DE ERITROPOYETINA Y TESTOSTERONA SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL DNA DE 3 FRACCIONES CELULARES DE MEDULA OSEA DE RATA NORMAL

FRACCION CELULAR	CON(+)	CON(+)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (cpm/mg DNA)	% ESTIMULO	
	SIN(-) T	SIN(-) EP		A	B
MEDULA NO FRACCIONADA	-	+	4804 ± 304	100	
	+	-	2721 ± 154	100	
	-	-	2503 ± 112		
FRACCION I	-	+	10399 ± 375	415	686
	+	-	3547 ± 124	142	233
	-	-	1516 ± 37		100
FRACCION II	-	+	8259 ± 276	172	689
	+	-	2872 ± 192	105*	239
	-	-	1197 ± 74		100
FRACCION III	-	+	5910 ± 221	123*	355
	+	-	2163 ± 164	-	130
	-	-	1664 ± 98		100

COLUMNA A = Estimulo referido a valores encontrado en médula ósea no-fraccionada.

COLUMNA B = Estimulo referido al control de cada fracción.

\* Valores no significativos ( $p < 0.05$ )



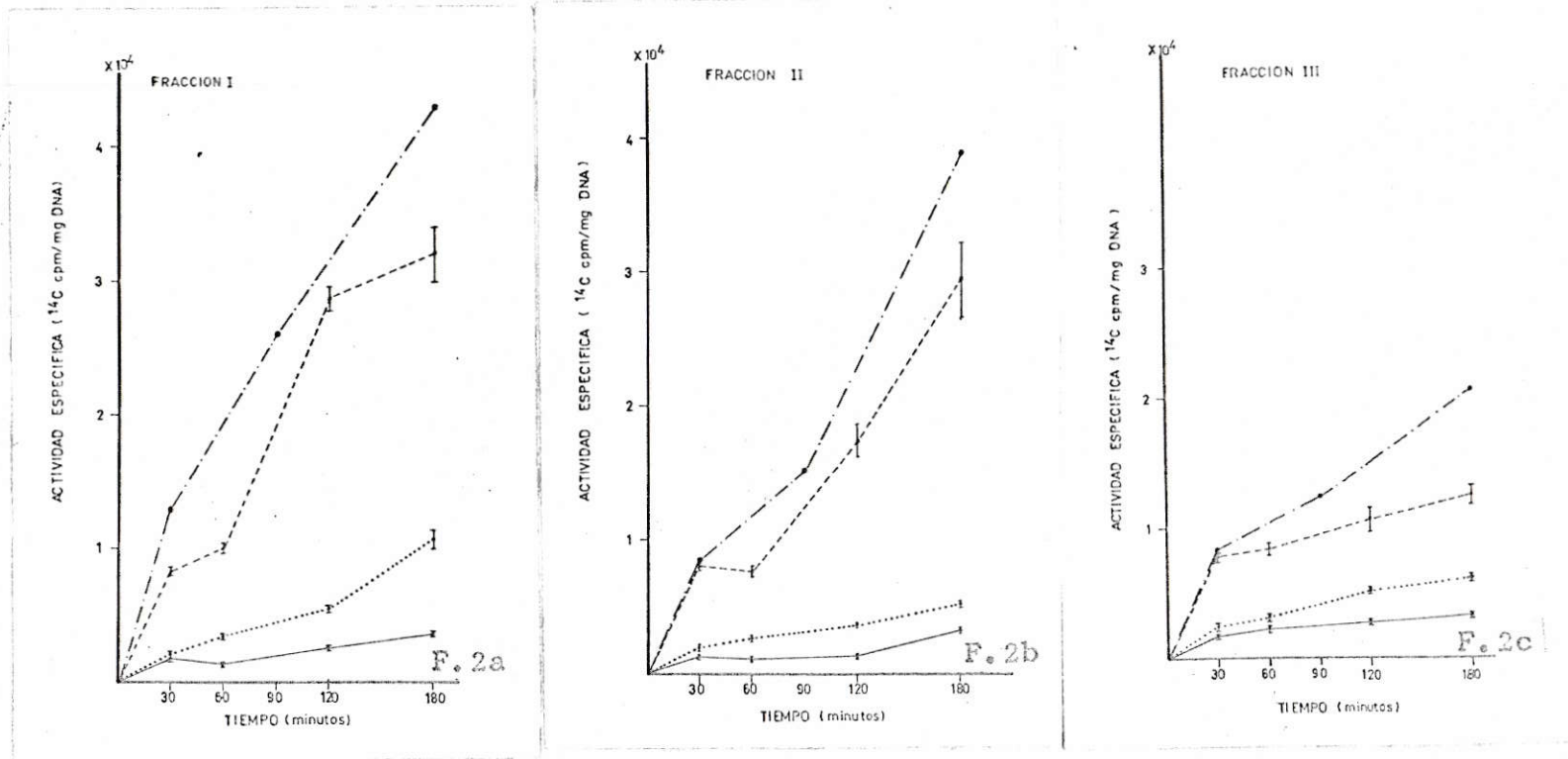


Figura 2.- Efecto de EP y T sobre la incorporación de formiato- $\text{C}^{14}$  al DNA de 3 fracciones celulares de médula ósea de rata normal.

Ratas hembras normales fueron inyectadas, por vía intravenosa, con T (250 ug) y/o EP (4.5 U) más formiato- $\text{C}^{14}$  (20 uCi). A los tiempos señalados en el gráfico los animales fueron sacrificados, la médula se extrajo y se fraccionó en gradientes de densidad de ficoll. El DNA de cada fracción se aisló y se determinó su AE. Más detalles sobre las condiciones experimentales en materiales y métodos. 2a) Fracción I, 2b) Fracción II y 2c) Fracción III. Los resultados corresponde a un promedio de 3 experimentos  $\pm$  desviación standard.

Control ..... T ---- EP -.-.-. EP + T.

el control en cambio en las otras 2 fracciones este efecto de T es menor.

Cuando EP y T se administraron simultaneamente, se observa que a los 30 min hay un estimulo de 6.9 veces el control en la fracción I 6.5 en la fracción II y 4.3 en la fracción III. Sin embargo si se compara la curva de EP+T con la curva EP se observa que a este mismo tiempo, el efecto sinérgico de ambas hormonas se produce en la fracción I.

A medida que aumenta el tiempo de acción de las hormonas se comprueba que las 3 fracciones se estimulan, sin embargo la AE de cada fracción aumenta de manera tal que a los 180 min en la fracción más inmadura se produce el mayor estimulo y el menor en la fracción terminal.

#### Efecto de EP y T en ratas anémicas y policitémicas.-

Por ser la médula ósea un sistema heterogéneo y asíncronico, una descripción precisa de los eventos bioquímicos que ocurren a nivel citológico es difícil de realizar ya que no solo hay células en diferentes estados de maduración sino también de diferentes líneas hematopoyéticas. Por esta razón a fin de obtener poblaciones enriquecidas en determinados tipos celulares se usaron animales en diferentes condiciones fisiológicas. Así, por ejemplo animales en los cuales se induce una anémia hemolítica con fenilhidrazina. Este sistema tiene la ventaja de aumentar considerablemente la población eritroide de la médula ( tabla IV ). Esta mayor actividad eritropoyética se debe al incremento de los niveles de EP endógeno que son de aproximadamente 2 a 3 veces mayor que en el animal normal (41). Usando este sistema experimen



tal se midió el efecto de T, el cual está influenciado por la mayor cantidad de EP circulante. Los resultados obtenidos en el animal anémico muestran que T estimula de manera preferencial las células de la fracción II y III que es donde se agrupan los eritroblastos intermediarios y terminales, gatillando en ellos las síntesis de RNA. Cuando se midió la incorporación de formiato- $C^{14}$  al DNA, se observó que el estímulo se corresponde muy bien con aquel encontrado en la rata normal, pues el mayor incremento en la AE se presenta en las dos primeras fracciones.

Un sistema opuesto lo constituyen las ratas policitémicas, por transfusión, en las cuales los niveles de EP endógena son casi nulos y por lo tanto el proceso de diferenciación y división de la serie eritroide está virtualmente detenido. En la médula policitémica la población eritroide está considerablemente disminuida ( tabla V ). El animal policitémico constituye un sistema apropiado para el estudio de muchos aspectos de la formación de células de la serie roja, por cuanto es muy sensible al estímulo hormonal. Con esta información resulta interesante investigar en este sistema el efecto de EP y T sobre el metabolismo del RNA como del DNA.

Los resultados obtenidos en médula policitémica demuestran que EP produce una activación preferencial por las células de la fracción I, este efecto se demuestra durante los 180 minutos de estudio. Testosterona por su parte estimula células de la fracción II y III donde se agrupan los eritroblastos terminales, este efecto es notorio a los 180 minutos de acción.

TABLA IV

DISTRIBUCION CELULAR EN 3 FRACCIONES CELULARES DE MEDULA OSEA DE RATA ANEMICA

	FRACCION I	FRACCION II	FRACCION III
A.- SERIE ERITROIDE	69.3 %	54.5 %	62.4 %
B.- SERIE NO ERITROIDE	30.7 %	45.5 %	37.6 %
PROERITROBLASTOS	50.0 %	2.3 %	0.8 %
E. INTERMEDIARIOS	31.6 %	64.1 %	55.4 %
E. TERMINALES	18.3 %	33.6 %	43.8 %

Las condiciones experimentales fueron identicas a la de la Tabla I.



TABLA V

DISTRIBUCION CELULAR DE 3 FRACCIONES CELULARES DE MEDULA OSEA DE RATA POLICITEMICA

	FRACCION I	FRACCION II	FRACCION III
A. - SERIE ERITROIDE	32.6 %	23.1 %	22.3 %
B. - SERIE NO ERITROIDE	67.4 %	76.9 %	77.7 %
PROERITROBLASTOS	38.9 %	6.5 %	1.5 %
E. INTERMEDIARIOS	46.6 %	38.0 %	25.0 %
E. TERMINALES	14.4 %	55.5 %	73.5 %

Las conciciones experimentales fueron identicas a las de las Tablas I y II

## DISCUSION

La médula ósea de rata es un sistema citológicamente heterogeneo y asincrónico, de tal manera que una descripción precisa de los eventos bioquímicos que ocurren a nivel morfológico, es difícil de realizar ya que no solo hay células en diferentes estados de maduración sino que también de diferentes líneas hematopoyéticas. Los métodos de separación celular hasta ahora utilizados permiten obtener fracciones enriquecidas en algún tipo celular, sin embargo las poblaciones aún son heterogéneas. En el caso particular del método utilizado en este trabajo, donde se ha logrado un fraccionamiento aún grueso de la médula, existe la posibilidad de que este sistema sea refinado a través de una segunda etapa de separación para obtener fracciones más homogéneas. No obstante, el sistema experimental proporciona un tejido hematopoyético mas limpio, lo que permite entregar información valiosa referente al efecto de EP y T en las células eritroides.

Existen bastantes evidencias que tanto EP como T actúan directamente sobre las células de médula ósea de rata. El efecto primario de la EP parece ser la inducción de la síntesis de RNA en células inmaduras comprometidas con la serie roja, proceso que inicia la diferenciación y proliferación de éstas hasta el eritrocito. La fracción I que contiene proporcionalmente el mayor número de células morfológicamente inmaduras muestra una respuesta a la EP de 5 veces el valor control en el animal normal (Tabla II), comparadas con las otras 2 fracciones en las cuales el estímulo es menor.



Esta fracción al presentar la mayor actividad indica que parece muy probable que la principal célula blanco para la EP sea alguna del conjunto de los proeritroblastos. Estas evidencias están apoyadas por aquellas encontradas en la rata policitémica y están de acuerdo con los resultados de Cantor y col. (42) quienes trabajando con células eritroides inmaduras de hígado fetal de 12-13 días que respondían a EP, concluyeron que las CSE son morfológicamente indistinguibles de una clase de células identificadas como proeritroblastos. Estudios autorradiográficos, en cultivo, realizados por Chui y col. (43) demuestran que el efecto de la hormona es selectivo y que está restringido a una estimulación de la velocidad de síntesis del RNA en la mayoría de las células eritroides inmaduras que también llamaron proeritroblastos.

En la tabla I se observa que la proporción de células intermediarias es aproximadamente igual en la fracción I y III, si suponemos que no hay efecto de EP sobre los eritroblastos terminales, se puede concluir que los proeritroblastos son responsables de las diferencias observadas entre estas fracciones. Sin embargo si la EP actúa sólo a nivel de las células inmaduras exclusivamente la AE de la fracción III (Tabla II) debería ser mucho menor pues las células eritroides precursoras representan solo un 1.5 % del total de la población de la serie roja de esa fracción, por lo que este incremento en la AE puede estar dado por el efecto de EP sobre células eritroides más desarrolladas (eritroblastos basofílicos y policromatofílicos). Al parecer la acción de la EP no está limitada a células eritroides inmaduras (pro-

eritroblastos) sino que su efecto continúa sobre células más maduras de la serie roja. Estos datos están de acuerdo con aquellos encontrados por el grupo de McCool (32) quienes demostraron que hay un efecto de EP sobre células rojas más maduras. Por otra parte Harrison (44) demostró que el RNAm se acumula en el estadio de eritroblastos basofílico, no estando presente en cantidades significativas en los proeritroblastos de hígado fetal. Independientemente Terada y col. (45) llegaron a conclusiones similares. Las células eritroides inmaduras (80-90% proeritroblastos) de hígado fetal aisladas por procedimientos de inmuno-lisis contienen cantidades insignificantes de RNAm. Después de cultivar tales células por 10 h la cantidad de RNAm de globina aumenta unas 6-10 veces. Durante este tiempo la mayoría de las células se diferenciaron a eritroblastos basofílicos comenzando a sintetizar hemoglobina. Si este efecto prolongado de la hormona está representado por la síntesis de RNA, los resultados presentados en este trabajo apoyan esta observación por cuanto en las fracciones II y III se demuestran estímulos significativos por parte de la hormona desde los primeros 30 minutos de acción.

EP también tiene efecto sobre la síntesis de DNA aumentado la AE del DNA a partir de los 30 min de acción en las 3 fracciones celulares, no obstante el mayor estímulo se concentra en las 2 primeras fracciones, por lo que parece muy probable que las células inmaduras o intermediarias de la serie roja sean susceptibles de aumentar su síntesis de DNA en presencia de EP. En la fracción III donde están casi ausentes las células inmaduras, se observa un estímulo manifiesto



de la hormona, lo que esta indicando claramente que hay un efecto de EP sobre los eritroblastos intermediarios, puesto que las células terminales no sintetizan DNA, ni se dividen. En el estudio realizado, el tiempo de 3 horas es corto para cualquier tipo de proliferación llevado a cabo desde el nivel de célula stem al de eritroblasto policromatofílico, por lo que el resultado se puede interpretar como indicativo de un efecto directo de la EP sobre las células eritroides capaces de dividirse. Hegeman y col. (46), usando un método cuantitativo de autorradiografía encontraron un incremento significativo en la incorporación de timidina- $C^{14}$  en todos los estados de maduración, identificados como proeritroblastos, eritroblastos basofílicos y eritroblastos policromatofílicos, lo que concuerda con los resultados mostrados. Además Paul y col. (47) han demostrado que la EP provoca un aumento en la síntesis de DNA desde los primeros 20 minutos de acción, observándose tanto síntesis de DNA como mitosis en los proeritroblastos, eritroblastos basofílicos y policromatofílicos.

Los androgenos son otros de los factores que influyen en el control de la eritropoyésis, ya sea directa o indirectamente. Al estudiar el efecto de T a tiempos cortos los resultados pueden atribuirse a una acción directa de T sobre la biosíntesis de los ácidos nucleicos de médula ósea, y no una indirecta que se manifiesta solo a partir de la 24 h en que se ha detectado un aumento en la tasa de EP endógeno (20). La T, el andrógeno estudiado, actuaría sobre células probablemente del tipo de los eritroblastos terminales, ya que en la fracción III (Tabla II) se observó una mayor síntesis de

RNA. Estudios morfológicos realizados por Minguell y col. (34) demuestran que efectivamente hay un efecto selectivo de la hormona sobre determinados tipos de células de la población eritroide.

Se ha demostrado que T estimula la actividad de la polimerasa I nucleolar (27) que es responsable de la síntesis de los RNAs ribosomales. Así en un trabajo reciente se comprobó que la T estimula preferentemente la síntesis de moléculas de RNA con coeficiente de sedimentación de 25-26 S y 18 S (48). Es probable que estos correspondan a las especies ribosomales 28 S y 18 S descritas para los eucariotes. También se ha demostrado que T modula actividad de endonucleasas específicas (26). Estos 2 eventos bioquímicos son necesarios para completar la maquinaria biosintética para las globinas, proteínas que comienzan a sintetizarse en los eritroblastos intermediarios donde puede esperarse que T tenga efecto a ese nivel celular. El estímulo de T sobre los eritroblastos terminales puede estar dirigido tanto a gatillar la síntesis de RNAs ribosomales, como hacia el procesamiento de los RNAs precursores sintetizados en respuesta a ambas hormonas. Se ha descrito que el núcleo de los eritroblastos terminales es inactivo en síntesis de DNA ya que estas células han dejado de dividirse, pero están en activa síntesis de hemoglobina. Además la síntesis de RNA total también se vería disminuida dado que la cromatina se encuentra condensada, aunque se ha demostrado que este núcleo es capaz de reactivarse bajo circunstancias especiales, ya que si es introducido en fibroblastos de una variedad de especies, se reanuda la síntesis de ácidos nu



cleicos y la síntesis de ciertas proteínas específicas (47). En nuestro sistema en que se detecta síntesis de RNA en los eritroblastos terminales, en respuesta al estímulo de T, es probable que los genes involucrados en la síntesis de la globina permanezcan activos hasta el final del proceso de diferenciación y por tanto sean susceptibles de ser transcritos.

Los resultados también muestran que T tiene efecto sobre células eritroides más tempranas estimulando en ellas la síntesis de DNA. Este efecto eritropoyético de T se presenta en la Tabla III donde se observa un estímulo de 2.3 veces el valor control a los 60 min en la fracción I y II, por lo que parece probable que los proeritroblastos responden al estímulo de T. Sin embargo dado que el incremento en la AE de la fracción I y II es de igual magnitud, lleva a pensar que los eritroblastos intermediarios también aumentan la síntesis de DNA en respuesta a la hormona. Este efecto prolongado de T se demuestra en la fracción III que carece de células inmaduras y sin embargo es capaz de estimularse en presencia de T. Esto último nos sugiere que T gatilla la síntesis de DNA sobre todas las células eritroides capaces de dividirse. Al respecto Jepson y col. (50) señalan que la T y sus metabolitos  $5\beta$ -H inducen la división de las células basales pluripotenciales, las cuales proporcionan una "Fracción de crecimiento" de CSE, sobre la cual puede actuar la EP. Además Minguell y col. (34) demostraron que la adición de T a una suspensión de médula ósea proveniente de ratas policitémicas provoca un aumento considerable de los eritroblastos basofílicos y policromatófilicos. Paralelo a esto se observó que in vivo hay

una alteración importante de la razón mieloides/eritroides, la que varía de 16 en médula ósea policitémica a 2 en médula ósea policitémica a 2 en médula ósea policitémica sometida a tratamiento con el andrógeno. Esta variación se debe fundamentalmente a un aumento de las células de la serie roja y no a una disminución de elementos mieloides. En base a las evidencias presentadas se puede sugerir el siguiente mecanismo para explicar el efecto sinérgico de ambas hormonas en el proceso eritropoyético: EP actuaría sobre los tipos celulares más inmaduros sobre una clase especial de células, el proeritroblasto, el cual se ha diferenciado de la célula progenitora pluripotencial, donde se produce el mayor efecto de la hormona. Este proeritroblasto llamado CSE está programado para reconocer la EP y poder diferenciarse hacia células capaces de sintetizar hemoglobina. Esta célula sensible a EP tendría un sitio receptor para la EP, posiblemente sobre la membrana, como ha sido descrito por Goldwasser y col. (8). El evento molecular fundamental de la hormona es la inducción de la síntesis de RNA, específicamente pre-RNA<sub>m</sub>. Siguiendo este proceso de diferenciación está el de proliferación el cual se demuestra con un aumento de la síntesis de DNA bajo la acción hormonal.

Las formas precursoras del RNA<sub>m</sub> para la globina presente en los eritroblastos intermediarios, sufrirían un proceso de maduración hasta su forma funcional, el cual estaría mediado por las endonucleasas específicas estimuladas por T. A su vez esta hormona empezaría a estimular las síntesis de RNA ribosomales, ya que en estas células se ha detectado síntesis de hemoglobina. Las células del próximo estadio respon



derán más marcadamente a T dada la necesidad de procesar los RNAs inducidos por EP y los RNA ribosomales para aumentar la eficiencia de la maquinaria biosintética para las globinas. De los resultados se desprende que EP aún actúa a este nivel celular, donde se produciría un real efecto combinado de estas dos hormonas.

En conclusión, el efecto de EP se hace cada vez menor a medida que avanza el proceso de diferenciación, porque el programa celular por ella gatillado se está desarrollando. En esta evolución entra a actuar la T cuyo efecto mayor se ejerce a nivel de los eritroblastos terminales.

A medida que se perfeccionen los métodos de fraccionamiento celular se irá resolviendo eventualmente la identificación de estos tipos celulares, proporcionando así un sistema más refinado que contribuirá a clarificar los eventos moleculares que expliquen el fenómeno eritropoyético, en lo específico, y el de diferenciación celular en lo general.

## BIBLIOGRAFIA

1. GOLDWASSER, E.; (1975) Fed. Proc. 34, 2285-2292.
2. TRENTIN, J.; (1970) en Regulation of Hematopoiesis Vol I. editado por Gordon, A.S. pág. 161-186. Appleton-Century Crofts. N.Y.
3. WOLF, W.S.; (1974) Cell Tissue Kinet. 7, 89-98.
4. FISHER, W.J.; (1972) Pharmacol. Rev. 24, 459-508
5. ERSLEV, J.A. (1975) Am. J. Med. 58, 25-30
6. GORDON, A.S.; ZANJANI, E.; (1970) en Regulation of Hematopoiesis Vol I editado por Gordon, A.S. pág. 413-457. Appleton-Century Crofts N.Y.
7. Mc CULLOCH, A.E. (1970) en Regulation of Hematopoiesis Vol I editado por Gordon, A.S. pág. 133-159. Appleton-Century Crofts. N.Y.
8. CHANG, C.S.; SIKKEMA, D.; GOLDWASSER, E. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 399-405.
9. RODGERS, G.M.; FISHER, J.W.; GEORGE, W. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 287-294.
10. GROSS, M.; GOLDWASSER, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2480-2486.
11. PERRETTA, M.; VALENZUELA, A.; VALLADARES, L. (1973) en Gene Expression and its regulation. editado por Kenney, F.; Hamkalo, B.; Favelukes, G. and August, J.T. pág. 137-147. Plenum Publishing Corporation.
12. PERRETTA, M.; VALLADARES, L.; ROMERO, C.; SIERRALTA, W.; VALENZUELA, A.; SPENCER, E.; CAÑAS, P.; MINGUELL, J.; (1976) Arch. Biol. Med. Exptl. 10, 35-40.





13. GROSS, M.; GOLDWASSER, E.; (1969) *Biochemistry* 8, 1795-1805.
14. PERRETTA, M.; BOSCO, C. (1970) *Experientia* 26, 594-596.
15. PIANTODOSI, C.A.; DICKERMAN, H.W.; SPIVAK, J.L. (1976) *J. Clin. Invest.* 57, 20-26.
16. PERRETTA, M.; VALLADARES, L.; GARRIDO, F.; VALENZUELA, D.; LUDWIG, U. *Arch. Biol. Med. Exptl.* (En prensa).
17. SINGER, J.W.; SAMUELS, A.I.; ADAMSON, J.W. (1976) *J. Cell. Phys.* 88, 127-133.
18. Mc DONALD, T.P.; MITCHELL, T.J.; LANGE, R.D. (1971) *Israel J. Med. Sci.* 7, 858-891
19. MIRAND, E.A.; GORDON, A.S.; WERNING, J. (1965) *Nature* 206, 270-272.
20. FRIED, W.J.; GURNEY, C.W. (1965) *Nature* 206, 1160-1161
21. REISNER, E.H. (1966) *Blood* 27, 460-469.
22. SINGER, J.W.; SAMUELS, A.I.; ADAMSON, J.W. (1976) *J. Cell. Phys.* 88, 135-143.
23. VALLADARES, L.; MINGUELL, J. (1975) *Steroids* 25, 13-21
24. MINGUELL, J.; CARAVAGNO, A.; YAÑEZ, J. (1971) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138, 438-440.
25. SIERRALTA, W.; GONZALEZ, M.C.; MINGUELL, J. (1974) *J. Steroid Biochem.* 5, 645-648
26. SIERRALTA, W.; MINGUELL, J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 41, 50-56.
27. VALLADARES, L.; CAÑAS, P.; MINGUELL, J. (1976) *Nucleic Acid. Res.* 3, 3077-3086
28. FILMONOWICZ, E.; GURNEY, C.W. (1961) *J. Lab. Clin. Med.* 57, 65-72.

29. BORSOOK, H.; RATNER, K.; TATTRIE, B. (1969) *Blood* 34, 32-41.
30. MILLER, R.; PHILLIP, R.A. (1969) *J. Cell. Phys.* 73, 191-202
31. PETERSON, E.A.; EVANS, W.H. (1967) *Nature* 214, 824-825.
32. Mc COOL, D.; MILLER, R.J.; PAINTER, R.H.; BRUCE, W.R. (1970) *Cell Tissue Kinet* 3, 55-65.
33. ZUCALI, J.; VANT ZANT, G.; RAKOWITZ, F.; GORDON, A. (1974) *Exp. Hemat.* 2, 250-258.
34. MINGUELL, J.; VALLADARES, L.; VALENZUELA, A.; CAÑAS, P.; GARRIDO, F.; PERRETTA, M. (1976) *Rev. Med. Ch.* 104, 925-933.
35. CANNAN, R.K. (1958) *Blood* 13, 1101-1106
36. CUTTS, J.H. (1970) en *Cell Separation. Methods in Hematology United Kingdom edition.* pág. 150-167. Academic Press Inc.
37. SMELLIE, R.M.; THOMSON, R.Y.; DAVIDSON, J.N. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 29, 59-62.
38. BRAY, G.A. (1960). *Anal. Biochem.* 1, 279-285
39. KAMALI, M.; MANHOURI, H. (1969) *Clin. Chem.* 15, 390-392.
40. *The Nucleic Acid: Chem. and Biol. Vol I* editado por Chargaff, E.; Davidson, J.N. (1955) pág. 287 Academic Press Inc.; Publishers N.Y.
41. DICKERMAN, H.W.; TU CHENG, KAZAZIAN, H.; SPIVAK, J. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 1-9
42. CANTOR, L.N.; MORRIS, A.J.; MARKS, P.A.; RIFKIND, R. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 1337-1341.
43. CHUI, D.; DJALDETTI, M.; MARKS, P.A.; RIFKIND, R. (1971) *J. Cell. Biol.* 51, 585-595.
44. HARRISON, P.R. (1976) *Nature* 262, 353-356.



45. TERADA, M.; CANTOR, L.; METAFORA, S.; RIFKIND, R.; BANK, A.; MARKS, P. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3575-3579
46. HEGEMAN, F.; DORMER, P. (1976) J. Coll. Phys. 89, 171-180
47. PAUL, J.; HUNTER, J.A. (1969) J. Mol. Biol. 42, 31-41
48. WAISSBLUTH, L.E. Tesis para optar al título de Licenciado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, 1978.
49. Tabla de Significancia Estadística del Handbook of Chemistry and Physics 49<sup>th</sup> Ed. The Chemical Rubber Co.; Cleveland, Ohio 1969; p. A-161.
50. JEPSON, J.H.; LEONARD, R.A.; GORSHEIN, D.; GARDNER, F.H.; BE SA, E. (1974) Biomedicine 20, 262-266

