

Tesis de Posgrado

Derivados de Dolicol en los insectos

Quesada Allué, Luis Alberto

1979

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Quesada Allué, Luis Alberto. (1979). Derivados de Dolicol en los insectos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1653_QuesadaAllue.pdf

Cita tipo Chicago:

Quesada Allué, Luis Alberto. "Derivados de Dolicol en los insectos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1653_QuesadaAllue.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" DERIVADOS DE DOLICOL EN LOS INSECTOS "

AUTOR : Luis Alberto Quesada Allue

DIRECTOR : Luis Federico Leloir

LUGAR DE TRABAJO : Instituto de Investigaciones Bioquímicas

" Fundación Campomar "

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1653

100

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Federico Leloir, cuyo constante estímulo y afectuosa guía encarrilaron mi esfuerzo ; sus profundos consejos abrieron en cada discusión horizontes decisivos en la concreción de esta tesis.

Al Dr. Carlos E. Cardini, Consejero de estudios, por su valioso apoyo.

A los miembros del que llamamos afectuosamente "Consejo de Ancianos" : Doctores Israel D. Algranati , Carlos E. Cardini, Héctor Carminatti, Marcelo Dankert, Luis F. Leloir, José M. Olavarría y Porrúa y Héctor N. Torres por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas .

A los Doctores Enrique Belocopitow y Luis R. Maréchal, con quienes me inicié a la investigación bioquímica y realicé una parte de los estudios de esta tesis.

Al Dr. Héctor N. Torres , por su apoyo y enseñanzas.

A los Doctores Mirta M. Flawiá, Norberto Judewicz, Armando J. Parodi y María Teresa Téllez-Iñón por su ayuda constante, consejos y enseñanzas.

A todos los colegas y amigos del I. I. B. que desde distintos ángulos me han brindado cooperación y han contribuido, con sus estimulantes discusiones y críticas, a la realización de este trabajo.

A la Sra. Mary B. de Iozzolino , a la Srta. Margarita Mazzardi, al Sr. Francisco Irueta y a la Sra. Soledad Gimenez ; quienes, con el resto del personal de apoyo de este instituto, colaboraron con dedicación y eficiencia.

A María José Bottaro Méndez quien dactilografizó esta tesis con esmero y responsabilidad.

A Diana

A mis padres

" ¿ No nos sería posible, por medio de experimentos, adquirir la certeza de cómo es ? " Galileo Galilei

" An organic being is a microcosm - a little universe, formed of a host of self propagating organisms, inconceivably minute and numerous as the stars in heaven " Charles Darwin

" Todo consiste en despertar el espíritu de curiosidad científica,...., y de inocular con el ejemplo el fuego sagrado de la indagación personal " Santiago Ramón y Cajal

"No transcendent ability is required in order to make useful discoveries in science; the edifice of science needs its masons, bricklayers, and common labourers as well as its foremen, master-builders, and architects." Bertrand Russell

"Quand le fait qu'on rencontre est en opposition avec une théorie régnante, il faut accepter le fait et abandoner la théorie lors même que celle-ci, soutenue par de grands noms, est généralement adoptée. " Claude Bernard

" pero el resorte principal,...., consistió - ¡quién lo dijera! - en haber aplicado a la resolución del problema los dictados del mas vulgar sentido común. " Santiago Ramón y Cajal

" Cet enthousiasme que vous avez eu dès la première heure, gardez-le,....mais donnez-lui pour compagnon inséparable un sévère contrôle. N'avancez rien qui ne puisse etre prouvé d'une façon simple et decisive .Ayez le culte de l'esprit critique. Réduit à lui seul il n'est ni un eveilleur d'idées, ni un stimulant de grandes choses. Sans lui, tout est caduc .Il a toujours le dernier mot. " Louis Pasteur

" In science the man of real genius is the man who invents a new method. The notable discoveries are often made by his successors, who can apply the method with fresh vigour,....; but the mental calibre of the thought required for their work, however brilliant, is not so great as that required by the first inventor of the method." Bertrand Russell

"Research has many aspects which make it an attractive venture. One of them is the intellectual pleasure of discovering previously unknown facts. There are also the human aspects..... Some of the most pleasant periods in my career were those in which I could work with people that were enthusiastic and clever and had a good sense of humour. The discussion of research problems with these people has always been a most stimulating experience!" Luis F. Leloir

"L'homme se découvre quand il se mesure avec l'obstacle"
Antoine de Saint-Exupéry

"Saber es importante. Pero lo mas importante del saber es saber pensar." Luis A. Quesada Cerbán

"Nunca os jactéis, porque es poco lo que se puede aprender sin el auxilio ajeno. No olvidéis, sin embargo, que este poco es importante y que además nadie os lo puede enseñar ." Antonio Machado

A B R E V I A T U R A S

ADP	5'Adenosina difosfato
AMP	5'Adenosina monofosfato
Ara	Arabinosa
ASN	Asparragina
ASP	Acido Aspártico
ATP	5'Adenosina trifosfato
BHA	2(3)-tert-butil-4-hidroxi-anisol
BHT	2,6-ditert-butil-cresol
CDP	5'Citidina difosfato
CMP	5'Citidina monofosfato
Con A	Concanavalina "A"
CTP	5'Citidina trifosfato
DEAE	Dietil-aminoetil
DOC	Deoxicolato
Dol	Dolicol
Dol-P	Doliquil fosfato
Dol-P-	Doliquil fosfato derivado (-Glc,-Man,etc)
Dol-P-P-	Doliquil pirofosfato derivado (-GlcNAc,-GalNAc,-oligosacarido,etc)
EA	Aceptor endógeno
EA-Glc	Aceptor endógeno glucosilado (definido en(143))
EDTA	Etilen diamino tetraacetato
Fic	Ficaprenol
Fic-P	Ficaprenil fosfato
Fic-P-	Ficaprenil fosfato
Gal	Galactosa
Gal-1-P	Galactosa-1-fosfato
GDP	5'Guanosina difosfato
GDP-	5'Guanosina difosfato derivado (-Man,-Fuc,-Glc,etc)
Glc	Glucosa
Glc-1-P	Glucosa-1-fosfato
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
GlcN	Glucosamina
GlcNAc	Acetil-glucosamina
GlcUA	Acido Glucurónico
GMP	5'Guanosina monofosfato
GTP	5'Guanosina trifosfato
hDol-P	Doliquil fosfato de hígado de mamifero
HEPES	Acido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfónico
HYL	Hidroxilisina
HYP	Hidroxiprolina

iDol-P	Doliquil fosfato de insecto
IIB	Instituto de Investigaciones Bioquimicas, Fundación Campomar
Man	Manosa
Man-1-P	Manosa-1-fosfato
Man-2-P	Manosa-2-fosfato
Man-6-P	Manosa-6-fosfato
NANA	Acido siálico (Acido N-acetil-neuramínico)
PAS	Reactivo (o reacción) del acido peryódico de Schiff
(P)Pi	(Piro)fosfato inorgánico
-P-	fosfato
-P-P-	pirofosfato
R _f	Relación de la movilidad de la sustancia con el frente del solvente
Rha	Rhamnosa o Ramanosa
SDS	Dodecil (lauril) sulfato de sodio
SER	Serina
TCA	Acido tricloroacético
TDP	5'Timidina
TDP-Rha	5'Timidina-Rhamnosa
TLC	Cromatografía en capa fina
TRIS	2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propandiol
UDP	5'Uridina difosfato
UDP-	5'Uridina difosfato derivado (-Glc,-Gal,-GlcUA,-GlcNAc,-GalNAc,-Xil,-Ara,etc..)
UMP	5'Uridina monofosfato
UTP	5'Uridina trifosfato
UV	luz ultravioleta
Xil	Xilosa

INDICE

	<u>PAG.</u>
1. INTRODUCCION	
1.1. Generalidades	1
1.1.1. Transferencia de sacáridos mediada por intermediarios lipídicos en procariones	2
1.1.2. Características de los poliprenoles	4
1.2. Derivados de dolicol en eucariotes	11
1.2.1. Dolicol libre. Esteres de dolicol. Dolicol fosfato.	12
1.2.2. Dolicol monosacáridos.	14
1.2.3. Dolicol-oligosacáridos conteniendo glucosa.	21
1.2.4. Doliquil-difosfato disacáridos.	23
1.2.5. Dolicol-oligosacáridos conteniendo manosa.	25
1.3. Biosíntesis de glicoproteínas	28
1.3.1. Generalidades	28
1.3.2. Unión péptido-carbohidrato.	32
1.3.3. Proteínas glicosiladas por dolicol derivados.	36
1.3.4. Tunicamicina y otros antibióticos.	39
1.4. Glicoproteínas de insecto	41
1.4.1. Mucopolisacáridos unidos a proteínas.	41
1.4.2. Homopolisacáridos unidos a proteína.	42
1.4.3. Vitelogeninas.	45
1.4.4. Calliforina.	46
1.4.5. Manoproteínas solubles.	46
1.4.6. Fibroínas de la seda.	47

1.4.7. Otras glicoproteínas de insectos.	<u>PAG.</u> <u>48</u>
1.4.8. Circulación y reconocimiento de glicoproteínas en insectos.	48
1.5. Objetivos del presente trabajo de Tesis.	50
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Organismos utilizados	52
2.2. Sustratos	53
2.3. Enzimas auxiliares	54
2.4. Experimentos " in vivo "	54
2.5. Cultivo de tejido	56
2.6. Aislamiento de dolicol de insecto	57
2.7. Extracción de dolicol fosfato de insecto	60
2.8. Preparación del lípido aceptor de insecto. Extracción analítica.	60
2.9. Preparación de dolicol y doliquil derivados de hígado.	61
2.10. Preparación de enzimas	61
2.11. Mezclas para incubaciones " in vitro "	64
2.12. Procesamiento de los incubados	66
2.13. Degradación química y enzimática	69
2.13.1. Tratamientos con ácido	69
2.13.2. Tratamientos con álcali	71
2.13.3. Tratamientos mixtos	73
2.13.4. Degradaciones enzimáticas	74
2.14. Métodos analíticos	75

	<u>PAG.</u>
2.14.1. Análisis espectrofotométrico	75
2.14.2. Cromatografía y electroforesis	76
2.14.3. Identificación en cromatografía y electroforesis	85
2.15. Nota sobre los materiales y métodos utilizados.	90
3. RESULTADOS	91
3.1. Existencia en insectos de dolicol libre y de dolicol fosfato	92
3.1.1. Evidencias de que el lípido de insecto aceptor de monosacáridos se comportó como doliquil fosfato	92
3.1.2. Propiedades del lípido de insecto aceptor de monosacáridos	95
3.1.3. Dolicol libre de insectos	104
3.2. Biosíntesis " in vivo " de poliprenil-azúcares	111
3.2.1. Inyección de precursor en hemolinfa	111
3.2.2. Marcación en cultivo de tejido	114
3.3. Biosíntesis de dolicol monosacáridos	121
3.3.1. Dolicol-pirofosfato-acetilglucosamina	123
3.3.2. Propiedades de la enzima transferente de manosa	132
3.3.3. Dolicol fosfato glucosa en insecto	150
3.3.4. Evidencias sobre formación de otros dolicol monosacáridos	156
3.3.5. Dolicol monosacáridos en otros organismos	158
3.4. Biosíntesis de dolicol-oligosacáridos conteniendo manosa	163
3.4.1. Estimulación de la síntesis por extractos de <u>Ceratitis capitata</u>	164
3.4.2. Estudio del oligosacárido unido al lípido: Dolicol trisacárido	168
3.4.3. Los dolicol-oligosacáridos de mayor tamaño	171

	<u>PAG.</u>
3.4.4. Características de la transferencia de manosas	174
3.4.5. Origen de los residuos de manosa incorporados a los lipo-oligosacáridos	179
3.5. Formación de dolicol-oligosacáridos conteniendo acetilglucosamina	182
3.5.1. Doliquil-P-P- (GlcNAc) ₂	182
3.5.2. Doliquil-P-P- (GlcNAc) ₂ - Man	
3.6. Formación de dolicol-oligosacáridos conteniendo glucosa	187
3.6.1. Identidad del material lipofílico	190
3.7. Dolicol-oligosacáridos en <u>Artemia sp</u> (crustácea)	195
3.8. Biosíntesis de glicoproteínas	196
3.8.1. Glicosilación a partir de nucleótido-azúcares	196
3.8.2. Glicosilación de proteínas a partir de dolicol derivados	197
3.9. Biosíntesis de derivados de dolicol en relación al ciclo de vida	202
3.9.1. Insectos: <u>Ceratitis</u>	202
3.9.2. Crustáceos: <u>Artemia salina</u>	205
3.10. Fosforilación de dolicol por enzimas de insecto	207
3.10.1. Evidencias indirectas	208
3.10.2. Formación de sustancias radiomarcadas con ³² P	209
3.10.3. Hidrólisis ácida	210
3.10.4. Hidrólisis alcalina	212
3.10.5. Adición de dolicol fosfato	214
3.10.6. Adición de dolicol	215
4. DISCUSION	218
5. CONCLUSIONES	233

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

A fines de agosto de 1949, el grupo de Leloir envió a Nature (1) la caracterización y la fórmula propuesta para el factor termoestable responsable de la interconversión enzimática de Gal-1-P en Glc-1-P (2): se trataba del descubrimiento del primer nucleótido-azúcar, el URIDIN difosfato glucosa. A partir de este hito fundamental en la química de carbohidratos, se han descrito durante los 20 años subsiguientes más de 100 nucleótidos azúcares y se ha conocido en detalle la participación de éstos en la biosíntesis de los principales hidratos de carbono, glicolípidos y proteínas glicosiladas (3) .

Ultimamente se han ido debilitando los esquemas demasiado simples con respecto a la estructura, composición y biosíntesis de polisacáridos y glicoproteínas (4, 5) . Esto ha sido posible gracias al empleo de nuevas técnicas y al mejoramiento de las preexistentes. Entre las primeras, han sido de decisiva importancia el uso de glicosidasas altamente específicas así como el empleo de la cromatografía de afinidad y de las lectinas. El mejoramiento de la tecnología ha sido notorio en las diferentes técnicas cromatográficas, en el instrumental para los distintos tipos de espectroscopía, en el análisis por difracción, etc. (4) .

En muchos polisacáridos antes clasificados como homogéneos (homopolisacáridos y heterosacáridos con unidades repetitivas) se han encontrado ahora pequeños porcentajes de unidades sacarídicas diferentes de la principal. Por otra parte se sabe ahora que muchos de ellos están covalentemente unidos a cadenas peptídicas (a la par que se conoce que muchas proteínas son, en verdad, glicoproteínas de muy bajo contenido sacarídico) .

En cuanto a la biosíntesis, tanto la de los denominados homopolisacáridos (glucógeno, almidón, celulosa, quitina, etc.) como en la de carbohidratos complejos, se sabe hace tiempo que, además del nucleótido azúcar dador de glicosilos, se necesita un aceptor pre-formado. Este está habitualmente constituido por una cadena del mismo polímero, de peso molecular relativamente bajo. Generalmente, no se sabe cuál es el menor tamaño de aceptor capaz de ser reconocido por las enzimas sintetizantes. En algunos casos, como en el glucógeno, la porción de cadena que es elongada para dar la macromolécula (el "primer", en las publicaciones inglesas) podría estar unido a una proteína (4,316) .

En lo que respecta a las glicoproteínas se acepta que la mayor parte de la cadena polisacáridica se forma por sucesivas transferencias de monosacáridos desde los respectivos nucleótidos azúcar a un oligosacárido primario unido a la cadena polipeptídica que constituye la parte interna de la molécula de hidrato de carbono.

El interés de muchos investigadores se centra precisamente en aclarar la biosíntesis de esa parte interna ya que, hasta hace poco, resultaba difícil entender el fenómeno de adición de las primeras unidades sacáridicas, mediada por derivados de nucleótidos, en ambientes fuertemente hidrofóbicos como las membranas.

El renovado énfasis en este tipo de estudios arranca del descubrimiento de los poliprenilfosfato-azúcares de bacterias y de eucariotes y adquirió gran impulso cuando - pioneros otra vez, veinte años más tarde - Leloir y su grupo identificaron al lípido intermediario en la glicosilación de proteínas de mamíferos como doliquil-fosfato (6) .

1.1.1. Transferencia de sacáridos mediada por intermediarios lipídicos en procariotes

En 1964, Rothfield y Horecker (7) descubrieron un lípido que actuaba como activador

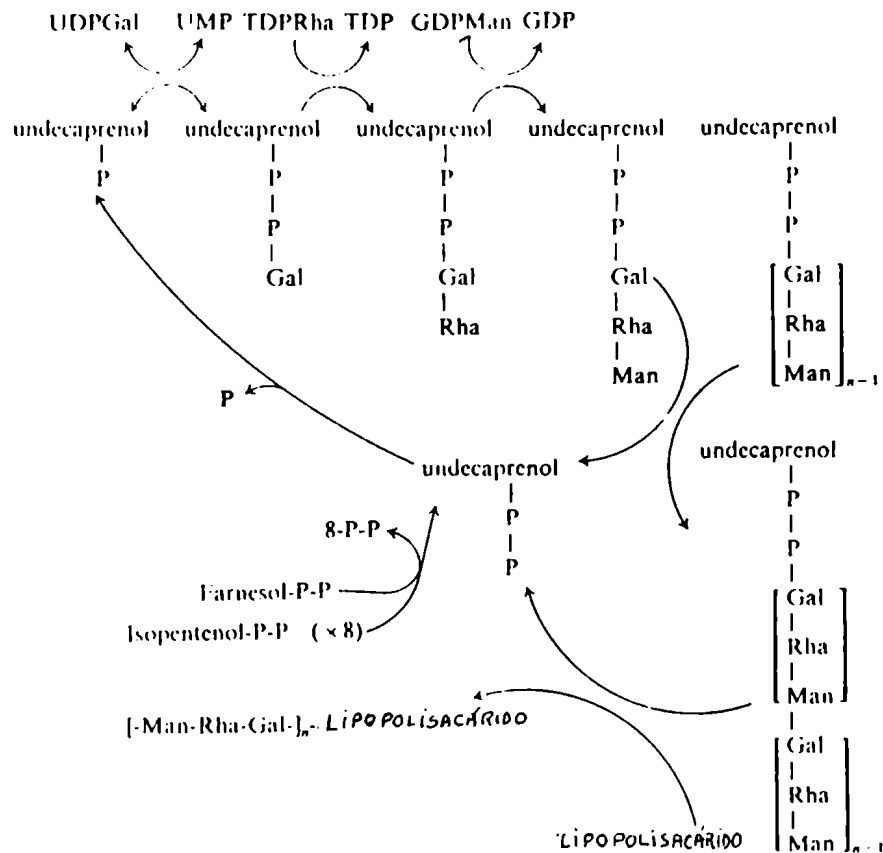
en la síntesis de lipopolisacáridos de Salmonella. Interpretaron erróneamente que el activador formaba un complejo con el lipopolisacárido.

Durante 1965 varios laboratorios publicaron casi simultáneamente que en la biosíntesis de ciertos polisacáridos de bacterias participaban sustancias con características lipofílicas que contenían fosfato y residuos oligosacáridicos. Strominger y col. (8) vieron que un glicolípido, sintetizado por enzimas de Staphylococcus aureus o de Micrococcus lysodeikticus, era intermediario en la formación del peptidoglucano de la pared. El glicolípido pentapéptido se formaba a partir de un lípido endógeno y de nucleótido-azúcar pentapéptido.

Poco después, Horecker y col. (9) y Robbins y col. (10) , describieron un lípido intermediario en la biosíntesis del antígeno O de Salmonella. Se formaba aquí un lípido fosfato mono, di o trisacárido.

Otra vez, simultáneamente el grupo de Robbins (11) y el de Strominger (12) identificaron el lípido intermediario como un undecaprenol unido por un puente difosfato al residuo hidrofílico. Estudios subsiguientes permitieron postular que el poliprenol fosfato participaba de un ciclo al término del cual volvía a estar disponible (13) . Como puede apreciarse en la Figura 1, el poliprenol fosfato acepta Galactosa-fosfato a partir del UDP-Gal y el glicolípido formado se elonga por adición de rhamnosa y manosa a partir de sus respectivos nucleótido-derivados (14) . El paso siguiente consiste en la polimerización de la unidad trisacáridica. La elongación y modificación del antígeno O ha sido íntensamente estudiada en diferentes especies de Salmonella , tanto en cepas salvajes como mutadas (14 - 18) .

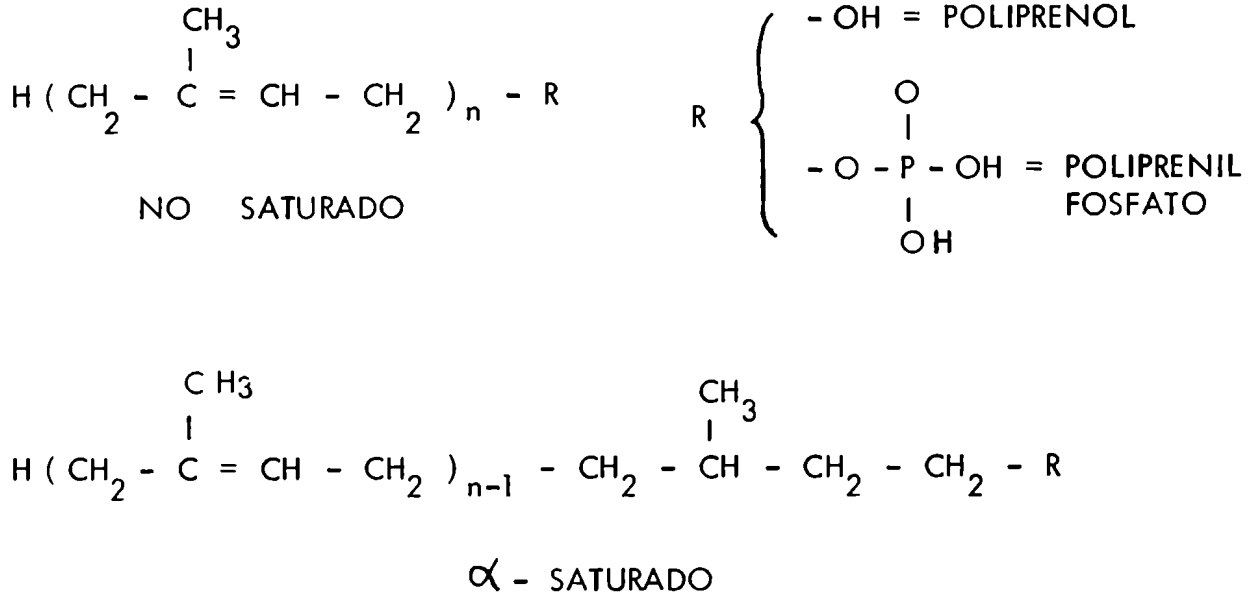
FIGURA 1 : Biosíntesis del antígeno "0" de Salmonella newington (Tomado de Hemming , F. W. (14)).



1.1.2. Características de los poliprenoles

Los prenoles son alcoholes primarios con una cadena constituida por n unidades isoprenicas cuyas dobles ligaduras pueden estar en posición cis (la mayoría) o trans y estar ocasionalmente saturadas (Figura 2) (ver Figura siguiente). El número de unidades de isopreno es variable . Se los ha encontrado en procariotes y eucariotes y se les ha dado nombres vulgares que aluden a la fuente natural de donde se obtuvieron y al tamaño de

FIGURA 2 : Fórmula química de los poliprenoles



la cadena (20). En la Tabla 1 se ve que, en general, los poliprenoles de bacterias y plantas (alílicos) tienen cadena relativamente corta, mientras que en hongos y animales (Tabla 2) predominan las cadenas largas (80 a 110 átomos de carbono). Estas últimas se las agrupa bajo el nombre de dolicoles (Dolikos : largo) y la unidad α -isoprénica está saturada. Los dolicoles de levaduras son algo menores (65 a 90 átomos de carbono). Los undecaprenoles de plantas son similares a los de bacterias, con la particularidad de estar siempre acompañados por isoprenoles de cadena más corta y/o más larga (21, 24, 26, 27). En los invertebrados marinos se encontraron dihydropoliprenoles (Tabla 2) (25). (Se ha detectado químicamente dolicol en Arum maculatum (112) lo que refuerza los datos que indican (58,62) que éste es el aceptor de glicosilos en plantas.

<u>ORGANISMO</u>	<u>NOMBRE COMÚN</u>	<u>Nº ISOPRENOS</u>	<u>CITAS</u>
<u>Bacterias</u>			
<u>M. lysodeikticus</u>	Undecaprenol	11	20
<u>L. acidophilus</u>	Bactoprenol	11	20
<u>S. aureus</u>	idem	11	20
<u>S. newington</u>	Undecaprenol	11	14
<u>Plantas</u>			
Abedul (<u>Betula</u> sp.)	Betulaprenol	6 o 9	20
Tabaco (<u>Solanum</u> sp)	Solanosol	9	27
Castaña (<u>Castanea</u> sp)	Castaprenol	9 o 13	20
Gomero (<u>Ficus</u> sp)	Ficaprenol	10 o 12	20
<u>Hevea brasiliensis</u> (árbol del caucho)	Heveaprenol	10 o 13	24
<u>Aglaonema robelini</u>	Agloprenol	10 o 13	24
<u>Tricosantes palmata</u>	Undecaprenol	11	26
<u>Pinus sylvestris</u>	Pinoprenoles	12 o 17	292
<u>Pinus strobus</u>	idem	18	293
<u>Abies alba</u>	idem	11 o 18	294
<u>Picea abies</u>	idem	12 o 18	294
<u>Juniperus communis</u>	Juniperoprenole	14 o 21	294
<u>Arum maculatum</u>	Dolicol	19	112

TABLE 2: Dolicoles B) Mammiferon.

<u>ORGANISMO</u>	<u>ORGANO</u>	<u>Nº ISOPRENOS</u>	<u>CITAS</u>
Cerdo	Hígado	17 a 22	24, 31
	Riñón	17 a 20	24
	Bazo	17 a 21	24
	Páncreas	17 a 21	24
Vacunou	Cerebro	19 a 21	30
	Intestino		30
Rata	Cerebro	18 a 21	30
	Hígado	17 a 21	29
Carnero	Cerebro		30
Conejo	Hígado)	
	riñón)	
	Intestino)	30
	Músculo esquelético)	
Humano	Riñón)	30
	Hígado)	

TABLA 2 : Colecciones A) B. G. G. P. S. L. V. P. I. C. I. T. A. S.

<u>ORGANISMO</u>	<u>Nº DE PÁGINAS</u>	<u>CITAS</u>
<u>Hongos</u>		
<u>Saccharomyces sp.</u>	14 a 18	20
<u>Aspergillus fumigatus</u>	18 a 24	20, 21
<u>Aspergillus niger</u>	18 a 24	23
<u>Invertebrados</u>		
<u>Espónjan</u>		
<u>Grantia compressa</u>		25
<u>Suberites sp.</u>		25
<u>Celenterados</u>		
<u>Metridium senile</u>	18 a 21	20, 24, 25
<u>Anélidos</u>		
<u>Nereis pelagica</u>		25
<u>Moluscos</u>		
<u>Nucella lapidus</u>		25
<u>Littorina littorea</u>		25
<u>Gibbula cineraria</u>)	
<u>Mytilus edulis</u>)	25
<u>Cardium edule</u>)	
<u>Equinodermos</u>		
<u>Asterias rubens</u>)	
<u>Ophiocumina nigra</u>)	25
<u>Panopaeus miliaris</u>)	
<u>Artrópodos (Insectos)</u>		
<u>Calliphora erythrocephala</u>	17 a 19	28
<u>Ceratitis capitata</u>)	
<u>Triatoma infestans</u>)	ESTA TESIS
<u>Mallophora ruficauda</u>)	
<u>Artrópodos (Crustáceos)</u>		
<u>Carcinus maenas</u>		25
<u>Eupagurus bernhardus</u>		25

La biosíntesis de los poliprenoles pirofosfato alílicos implica la síntesis del isopentenil pirofosfato a partir del ácido mevalónico y su isomerización dando el compuesto alílico dimetil alil pirofosfato (Figura 3) que se condensa entonces con otro isopentenil pirofosfato para dar geranil (o neril) pirofosfato (Figura 4) (19, 20, 22). Estos se elongan para dar sustancias de diferente largo de cadena por sucesivas adiciones de isopentenil pirofosfato (19, 22) (Figura 5). Para la biosíntesis de dolicoles (31) se supone también un mecanismo parecido (22). Se necesitaría también una enzima capaz de saturar la unidad α - isoprénica .

FIGURA 3 : Biosíntesis de iso pentenil pirofosfato

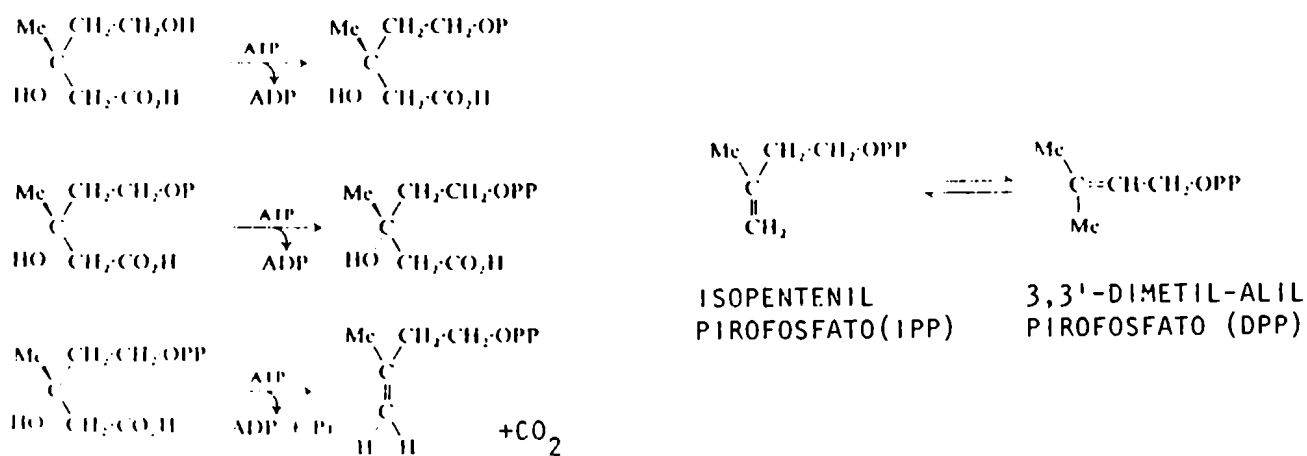


FIGURA 4 : Biosíntesis de geranil pirofosfato

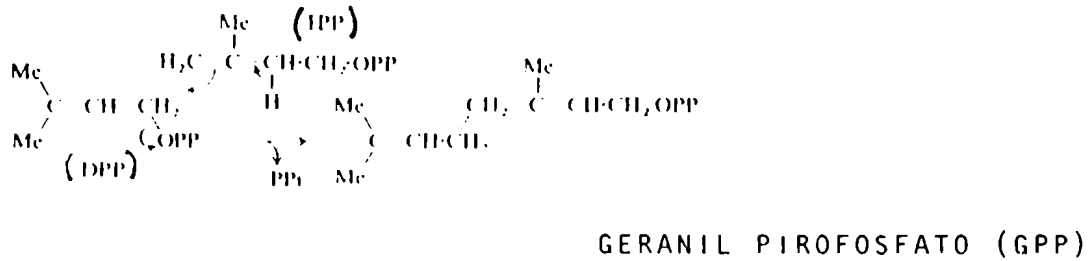
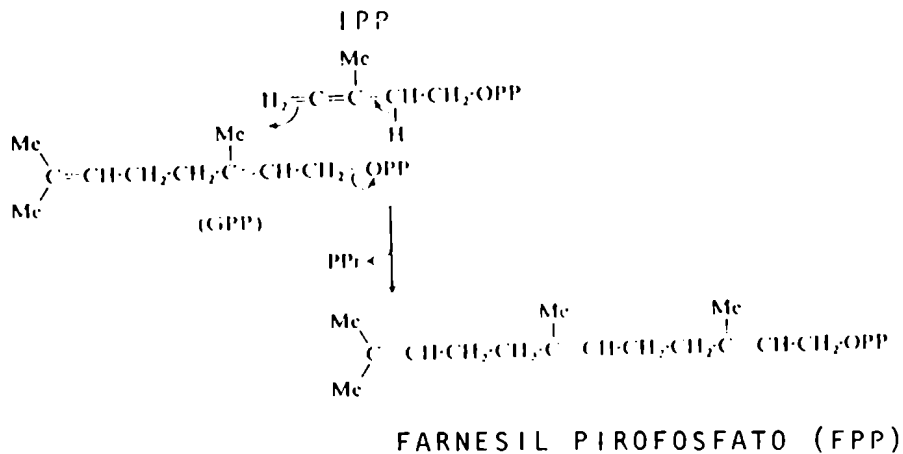


FIGURA 5 : Mecanismo de biosíntesis de poliprenoles

Se produce una reacción de condensación entre el isopentenil pirofosfato y el poliprenol (en la Figura, el geranil pirofosfato) para dar el miembro siguiente de la serie terpénica. (en la Figura, el farnesil pirofosfato).



Al margen del mecanismo principal , en las bacterias se ha descrito (32) la existencia de una poliprenil quinasa que podría significar una segunda vía biosintética, quizás

sujeta a regulación. No se ha encontrado una enzima similar en plantas o en mamíferos. En el presente trabajo se presentan evidencias de su existencia en eucariotes (Ver 3.10 página 207).

1.2. DERIVADOS DE DOLICOL EN EUCARIOTES

El descubrimiento de los derivados de poliprenoles como intermediarios en la transferencia de azúcares, en bacterias, hizo que en los estudios con eucariotes se tuviera en cuenta la posibilidad de existencia de mecanismos similares. Poco después de los hallazgos en procariontes aparecieron evidencias de la existencia - en animales y plantas superiores - de sustancias que se comportaban en forma similar a glicolípidos de cadena isoprenoide (33 al 37) .

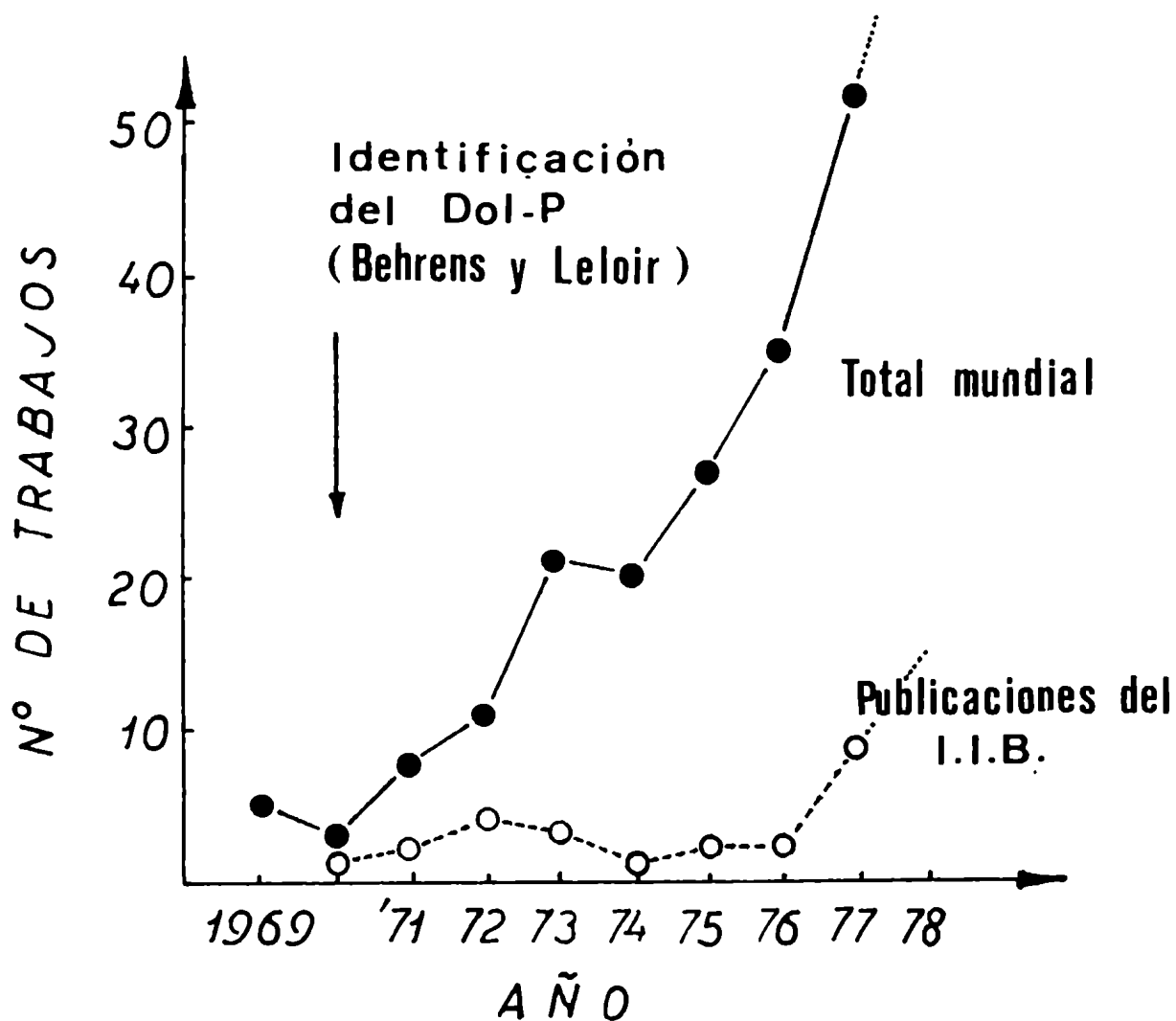
Behrens y Leloir demostraron en 1970 (6) que en el hígado de mamífero existía una enzima capaz de transferir la glucosa del UDP-Glc a un glicolípido inestable en medio ácido. El aceptor endógeno se comportaba como un poliprenol α - saturado.

A partir de este trabajo se ha originado un enorme interés en los poliprenil derivados de eucariotes, lo que se ha puesto de manifiesto en la gran cantidad de publicaciones (Figura 6) .

No se sabe con certeza si la glicosilación de la Vitamina A (38) y de la Vitamina K (39) se debe a lo inespecífico de las doliquil transferasas o a que estos lípidos desempeñan un papel propio como intermediarios lipídicos.

A la fecha de redacción de la presente Tesis se han publicado sucesivas revisiones del tema de doliquil derivados (14, 40 a 46) . Por lo tanto solamente se reseñarán aquí aquellos estudios en eucariotes de mayor interés para el desarrollo y posterior interpretación de los trabajos en insectos.

FIGURA 6 : Evolución del número de trabajos científicos relativos a derivados de dolicol desde el comienzo del tema hasta fines de 1977.



1.2.1. Dolicol libre. Esteres de dolicol. Dolicol fosfato.

Dolicol

En 1926 Channon y Marrian aislaron de la fracción insaponificable de hígado de cerdo una sustancia parecida al escualeno (47, 48). Se la encontró en hígado de otros animales y se la llamó Hepene (49), considerándola un hidrocarburo insaturado (no se había

detectado oxígeno en la molécula . Esta sustancia nunca volvió a ser caracterizada y cuando, en 1969, el grupo de Bioquímica de la Universidad de Liverpool intentó aislarlo en riñón humano (50) y luego en hígado (31, 51), encontraron en su lugar una sustancia de similares características, hidroxilada, de tipo poliisoprenólico y que llamaron dolicol debido a lo largo de su cadena (31) .

Se demostró su síntesis a partir de mevalonato en mamíferos primero (52) y en invertebrados después (25) . En este último, Walton y Pennock encontraron biosíntesis de dolicol en diferentes especies de poríferos, celenterados, anélidos, moluscos, equinodermos y crustáceos (Tabla 2 A) . Quedó en evidencia que todos los invertebrados marinos investigados convertían el mevalonato en dolicol y que en general el isoprenol más abundante era el C_{95} o C_{100} , siendo asimismo el sintetizado en mayor cantidad. Los datos indican que probablemente el dolicol es un terpenoide esencial para los eucariotes a diferencia de los esteroides que pueden ser obtenidos abundantemente en la dieta (53) .

La mayor parte del dolicol se encuentra como alcohol libre o en forma esterificada. Existe también una unión, aparentemente específica (54), a lipoproteínas de baja densidad, en plasma de mamíferos (55) .

Dolicol fosfato

El dolicol fosfato natural fue aislado primero por el grupo de Leloir (6), que también lo preparó sintéticamente (6) . Dallner y col. estudiaron la distribución subcelular en el hígado de mamífero (56) . Se lo halló en levaduras (57) y en plantas (58) , y luego, en el marco del presente trabajo de tesis, en insectos (Ver Resultados) . En la Tabla 3 se resumen los principales trabajos referentes a detección de dolicol fosfato.

TABLA 2 : Detección de Dolicol Fosfato en Eucariotes

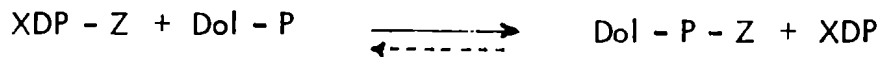
<u>ORGANISMO</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
Cerdo	Hígado	1970	6
Rata	Hígado	1972	56
Levadura	-	1973	57
Humano	Linfocitos	1974	59
Insectos	-	1975	ESTA TESIS (60)
Soja/Arveja	Brotes	1975	58
Arveja	-	1977	61
Soja/Arveja	-	1977	62
Conejo	Hígado	1977	63
Pollo	Hígado	1977	63
Gallina	Oviducto	1977	64

1.2.2. Dolicol monosacáridos

Los primeros trabajos en que se detectó en eucariotes un glico(fosfo)lípido con características de poliprenil derivado fueron los de Tanner (33), Caccam y col. (37) , Villemez y Clark (34) , y Zatz y Barondes (36) . Estos grupos hallaron que las membranas animales sintetizaban glicolípidos sensibles al ácido diluido (pH : 2.0) . El lípido aceptor, sin embargo, no fue identificado.

El ya mencionado trabajo de Behrens y Leloir (6) aportó evidencias de la naturaleza del lípido, al obtener creciente biosíntesis de lípido-glucosa por añadido de dolicol fosfato natural, extraído del hígado de cerdo, o preparado sintéticamente. Estos autores utilizaron como dador UDP-Glucosa radiomarcado con ^{32}P y demostraron que sólo se transfería

el azúcar al lípido. Sugirieron también que la glucosa estaba unida al fosforil dolicol en posición β . Se puede representar la formación de los poliprenil monosacáridos con la ecuación de tipo general :



donde X es un nucleósido genérico , y Z un monosacárido.

Se han realizado numerosos análisis del manosil derivado de dolicol que, en general, puede obtenerse con mucha facilidad y buen rendimiento en la mayoría de los sistemas y tejidos. Evans y Hemming (65, 67) y Baynes y col (66) determinaron la estructura del manolípido mediante espectrofotografía de masa. El primer grupo también utilizó en los análisis espectrofotografía infrarroja y resonancia magnética nuclear. El grupo de Hemming fabricó el manolípido radiomarcado en la manosa y en el dolicol simultáneamente (111). Finalmente se ha demostrado la configuración β en la unión de la manosa al fosfolípido (68, 69). Warren y Jeanloz sintetizaron químicamente el mannopiranosil doliquil monofosfato (70 a 72) y el Dol-P-P-GlcNAc (73).

En general la identidad de los monoglicosil derivados se infiere a partir de los datos de comportamiento en diferentes sistemas cromatográficos (columna,papel , capa fina/adsorción, partición, intercambio iónico, filtración molecular).

Las propiedades que habitualmente se someten a evaluación son:

- a) Solubilidad en solventes orgánicos (y cromatografía de Partición)
- b) Labilidad a los ácidos diluidos y subsiguiente liberación de monosacáridos
- c) Estabilidad al tratamiento alcalino suave, en condiciones de saponificación de los gli-

cerofosfátidos

- d) Liberación de monosacáridos fosfato por tratamiento alcalino fuerte
- e) Existencia de carga, puesta en evidencia por intercambio iónico en cromatografía en columna o papel impregnado con resina de intercambio
- f) Polaridad del glicolípido (en columnas de adsorción)
- g) Estimulación de la biosíntesis por agregado de poliprenol fosfato exógeno
- h) Inhibición de la biosíntesis por agregado de EDTA en la mezcla de incubación

Por otra parte en varios trabajos se demostró la reversibilidad de las reacciones, obteniéndose nucleótidos azúcar radiomarcados a partir del respectivo glicofosfolípido radioactivo.

Los sistemas enzimáticos glicosilantes de dolicol son sumamente inespecíficos con respecto al aceptor lipídico pudiendo ser éste de cadena menor o mayor, saturado o insaturado, del mismo o diferente organismo.

TABLA 4: Lista de los principales trabajos sobre Biosíntesis de Dol-P-Man en hongos.

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
ASCOMICETES		
• <u>Levaduras (Saccharomyces s p.)</u>	1969	33
	1971	74,75
	1972	76
	1973	77 a 79
	1974	80,81
	1975	82
	1976	83
	1977	84
• <u>Neurospora crassa</u>	1976	85
BASIDIOMICETES		
• <u>Aspergillus sp.</u>	1972	86
	1973	87
	1974	88
	1977	83-90
ZOOZOALES		
• <u>Dictyostelium sp.</u>	1977	91

TABLA 6 : Lista de los principales trabajos sobre biosíntesis de Dol-P-Man en Vertebrados.

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>Cerebro</u>	1969	36	<u>Hígado</u>	1969	37
	1971	104		1970	109
	1973	105		1971	104, 110
	1974	106		1972	111
	1976	107		1973	112 a 114
	1977	108		1974	115
<u>Páncreas</u>	1974	121, 122		1975	116
	1975	68, 123		1976	117, 118
				1977	119, 120
<u>Tiroides</u>	1973	124	<u>Oviducto</u>	1969	37
	1975	125		1973	124
	1976	126		1975	130, 131
<u>Parótida</u>	1975	127	<u>Aorta</u>	1975	128
<u>Intestino</u>	1974	115		1976	129
<u>Linfocitos</u>	1974	59, 122	<u>Médula adrenal</u>	1975	127
<u>Células de mieloma</u>	1969	37	<u>Retina</u>	1977	132

TABLA 8 : Principales trabajos sobre biosíntesis de Dol-P-Glc

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>Algas</u>	1978	137	<u>Vertebrados</u>		
<u>Hongos</u>	1973	138	• <u>Cerebro</u>	1971	104
	1976	139		1972	142
	1977	140		1973	105
<u>Plantas</u>	1973	101	• <u>Hígado</u>	1970	6
	1975	58		1971	104, 143
	1976	100		1972	142 a 146
	1977	62		1975	147
<u>Protozoos</u>	1973	141	• <u>Páncreas</u>	1977	148
	1975	133	• <u>Piel</u>	1971	104
(ESTA TESIS)			• <u>Fibroblastos</u>	1977	149
<u>Artrópodos</u>	(ESTA TESIS)		• <u>Reticulocitos</u>	1977	150
	1976	135	• <u>Eritrocitos</u>	1977	151
			• <u>Linfocitos</u>	1974	59

<u>TABLA 7 : Biosíntesis de Dol-P-Man en Invertebrados.</u>			<u>TABLA 8 : Lista de los principales trabajos sobre biosíntesis de Dol-P-Man en algas y plantas vasculares.</u>		
	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>PROTOZOOS</u>			<u>ALGAS</u>		
• <u>Tetrahymena pyriformis</u>	1975	133	• <u>Codium fragile</u>	1973	92
<u>EQUINODERMOS</u>			• <u>Prototheca sp.</u>	1973	123
• <u>Arbacia sp.</u>	1976	134	<u>PLANTAS VASCULARES</u>		
<u>ARTROPODOS (ESTA TESIS)</u>			• <u>Phaseolus sp. (poroto)</u>	1969	34,35
• Insectos y Crustáceos	1976	135		1970	93
	1977	136		1971	94
				1972	95
				1973	96
				1976	97
				1977	98
			• <u>Glycine sp. (soja)</u>	1975	58
				1977	62
			• <u>Pisum sp. (arvejo)</u>	1975	99
				1976	100
				1977	62
			• Raíces de tomate	1973	92
			• Fibras de algodón	1973	101
				1975	102
			• Células de sicomoro	1976	103

<u>TABLA 9 : Principales trabajos sobre otros derivados de dolicol.</u>			
	<u>AÑO</u>	<u>CITA</u>	<u>TEJIDO</u>
Dol-F-Xyl	1974	152	Oviducto
Dol-P-Gal	1975	153	Hígado
	1977	154	Células en cultivo
Dol-P-GlcUA (4?)	1977	155	Fibrosarcoma

En las Tablas 4 a 7 se han recopilado los principales trabajos "in vitro" sobre biosíntesis de Dolicol-P-Man en diferentes organismos y órganos. En la Tabla 8 se detallan los trabajos sobre biosíntesis del Dol-P-Glc y en la Tabla 9 la de los restantes monoglicosil derivados (Dol-P-Xyl, Dol-P-Gal, Dol-P-GlcUA).

La biosíntesis del N-acetil-glucosaminil derivado de dolicol merece considerarse aparte ya que la unión entre el lípido y el azúcar es de tipo pirofosfato, lo que afecta las propiedades cromatográficas y químicas de dicha sustancia. Además, los sistemas glicosilantes "in vitro" son de menor eficiencia y las transferasas sumamente lábiles. La reacción de

formación del Dol-P-P-GlcNAc se representa por la ecuación:



En la Tabla 10 se enumeran los trabajos sobre formación del acetil glucosaminil derivado

TABLA 10 : Principales trabajos sobre biosíntesis de Dol-P-P-GlcNAc

	<u>ANO</u>	<u>CITAS</u>		<u>ANO</u>	<u>CITAS</u>	
<u>Hongos</u>	1975	140,157	<u>Vertebrados</u>			
	1976	158		• <u>Páncreas</u>	1974	171
	1977	159			1978	172
	1978	160,161		• <u>Oviducto</u>	1975	130,131
<u>Plantas</u>	1975	102		1976	173	
	1976	97,162		1977	174	
	1977	62,163	• <u>Cerebro</u>	1973	105	
<u>Insectos</u> (ESTA TESIS) ^a				1974	106	
	1973	164		1977	175	
	1976	135	• <u>Tiroides</u>	1976	126	
<u>Vertebrados</u>			• <u>Eritrocitos</u>	1977	151	
	• <u>Hígado</u>	1971	165	• <u>Linfocitos</u>	1974	59
		1972	166	• <u>Fibrocarcoma</u>	1977	155
		1973	167	• <u>Fibroblastos</u>	1977	156
		1975	168 ^b			
		1976	169			
		1977	170			

a) Se ha identificado, además un lípido-P-(P)-GalNAc

b) En este trabajo se describió, además, un poliprenil pirofosfato N-acetilmanosamina

de Dol-P . Este parece ser el intermediario "soporte" en la biosíntesis de lípido-oligosacáridos (Ver 1.2.3.) . Todo indica que se elonga por sucesivas adiciones de GlcNAc y manosas, a partir de los respectivos nucleótidos azúcar (Ver más adelante) .

Se ha descrito también un poliprenil pirofosfato N-acetilmanosamina (168) .

Parece que los doliquil monosacáridos, pueden transferir directamente el azúcar a proteínas. Es el caso de la transferencia de manosa desde el Dol-P-Man a los grupos SER/THR del manano de levadura (80) y en la manosilación de proteínas de hígado de cerdo (111) y cerebro embrional de pollo (106) . El papel principal, sin embargo, parece ser el armado de los poliprenil-oligosacáridos que el trabajo de Parodi y col. (146) demostró participan en la síntesis de glicoproteínas.

Los estudios realizados "in vivo" sobre doliquil monosacáridos, (Tabla 11) , son convergentes con los datos "in vitro" . Además, se ha logrado realizar la síntesis química

TABLA 11 : Biosíntesis " in vivo " de doliquil monosacáridos : principales trabajos

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
Dol - P - Man	1974	176
	1976	177 o 179
Dol - P - P - GlcNAc	1973	164
	1976	160
	1977	181
	y ESTA TESIS	
Dol - P - Glc	ESTA TESIS	

de diferentes poliprenil derivados, lo que ha resultado de gran utilidad para demostrar la estructura anomérica y para su empleo como estándares. Esta línea ha sido desarrollada fundamentalmente por Warren y Jeanloz (Tabla 12) .

TABLA 12 - Síntesis química de poliprenil-oligosacáridos. (Miscelánea)

	<u>ANO</u>	<u>CITAS</u>
Dol - P - Man	1973	182
	1974	72
	1975	71
Dol - P - P - Man	1975	183
Gal - P - P - GlcNAc	1974	73
Fucose - P - P - GlcNAc	1973	184
Fucose - P - Man	1973	185
Ferresil - P - P - Gal	1972	136

1.2.3. Dolicol-oligosacáridos conteniendo glucosa

Un hallazgo metodológico, consistente en la utilización de una mezcla de cloroformo, metanol y agua en proporción 10:10:3, permitió a Leloir y su grupo solubilizar una sustancia, previamente estimada glicoproteína, y después caracterizada como poliprenil-oligosacárido (143). Esta sustancia fue denominada aceptor endógeno de glucosa por ser éste el azúcar que la radiomarcaba. La glucosilación del aceptor endógeno se obtenía a partir tanto de UDP-Glc como de Dol-P-Glc. Los autores representaron la reacción con la ecuación:



donde EA era el aceptor endógeno. El EA-Glc es insoluble en agua y en cloroformo y en mezclas de CH_2Cl_2 y CH_3OH que no sean la mencionada.

Por tratamiento ácido del EA-Glc se liberó un oligosacárido de 13-16 azúcares (302).

El comportamiento del EA-Glc en cromatografía de intercambio iónico indicó una unión pirofosfato entre la parte oligosacáridica y el lípido.

El tratamiento alcalino del lipo-oligosacárido ($\text{NH}_4\text{OH} / 100^\circ\text{C}$) liberó un oligosacárido cargado que se hizo neutro por tratamiento con fosfatasa alcalina. Tratando éste último con álcali más fuerte ($2\text{ M KOH} / 100^\circ\text{C}$) el oligosacárido se convirtió en dos sustancias cargadas positivamente que, por N-acetilación volvieron a ser una sola y neutra. Se interpretó de estos datos la presencia de dos grupos acetilhexosamina. Por otra parte se vió que la ^{14}C Glc no estaba situada en el extremo reductor del oligosacárido y que la parte lipídica parecía comportarse como dolicol cuando se formaba el correspondiente compuesto de inclusión con deoxicolato (143) y se filtraba por columna de Sephadex . En base a estas propiedades y al Peso Molecular aparente del residuo hidrofílico del EA-Glc (3550) se estimó que debía tener alrededor de 20 monosacáridos (143, 188). Posteriores estudios evidenciaron que debía ser más corto (187 a 193) y que existían diferencias de tamaño según los tejidos (192) y las especies (139-40). Debido al papel crucial que desempeñan estos lipo-oligosacáridos, y a que parecen ser los "últimos" intermediarios en la glicosilación de proteínas, numerosos grupos se dedicaron a elucidar la estructura que a la fecha de redacción de esta Tesis parece ser la que se muestra en la Figura 7 .

Los principales trabajos sobre biosíntesis de poliprenil oligosacáridos conteniendo glucosa se detallan en la Tabla 13 .

FIGURA 7 : Estructura actualmente aceptada para el oligosacárido del EA-Glc (según Li y col. (307)).

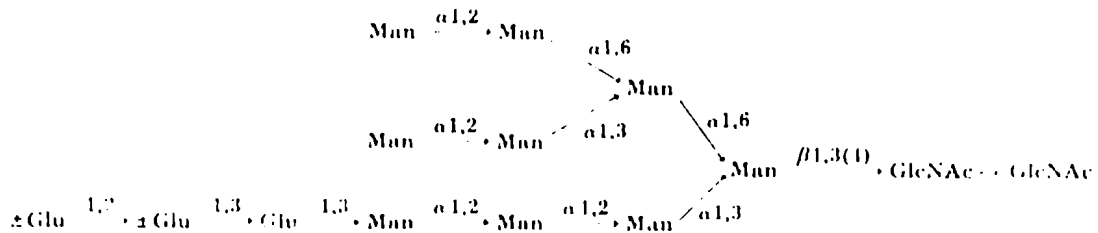


TABLA 13: Principales trabajos sobre biosíntesis de poliuronól-
oligosacáridos conteniendo glucosa.

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
Tetrahymena	1975	133	Tiroides	1973	188
Levadure	1976	139		1976	192 a 194
	1977	140	Páncreas	1976	194
Plantas	1977	62		1977	148, 110
	1978	137	Cerebro	1973	183
Hígado	1970	6		1977	195, 218
	1971	104, 143	Riñón	1973	183
	1972	144, 145,		1976	194
		146	Linfocitos	1973	188
	1973	188,	Fibroblastos	1977	149
	1976	189			
	1977	187, 190,	Eritrocitos	1977	151
		191	Reticulocitos	1977	150

1.2.4. Doliquil difosfato disacáridos

Leloir y col. (167) describieron la formación en hígado de rata del Dol-P-P-(GlcNAc)₂ por elongación del Dol-P-P-GlcNAc. Este hallazgo confirmó la presunción de que la

"médula" sacarídica de muchas glicoproteínas, constituida por quitobiosa unida a la proteína y ramas de manosas, podía ser sintetizada vía lípidos intermediarios. En numerosos trabajos se estudiaron los oligosacáridos radiomarcados con $[^{14}\text{C}] \text{GlcNAc}$ (Tabla 14).

TABLA 14 : Principales trabajos sobre biosíntesis de $\text{Dol-P-P}-(\text{GlcNAc})_2$

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>Hongos</u>		
<u>Saccharomyces</u>	1975	157
	1978	197
<u>Hígado</u>	1973	167
	1975	60
	1977	161, 170, 174
<u>Linfocitos</u>	1974	196
<u>Eritrocitos</u>	1977	151
<u>Páncreas</u>	1978	172
<u>Plantas</u>		
<u>Phaseolus sp.</u>	1976	97
<u>Glycine sp.</u>	1977	62
<u>Insectos</u>	1973	164
(ESTA TESIS)	1976	180, 185

En muchos de ellos, incluyendo lo realizado en la presente Tesis, se demostró la elongación del $\text{Dol-P-P}-(\text{GlcNAc})_2$ mediante el agregado de GDP-Man dando lipo-oligosacáridos indistinguibles de los biosintetizados directamente a partir de GDP-Man (Ver próximo párrafo).

Por otra parte, Turco y Heath (156) han descrito, en células transformadas, la formación de un doliquil pirofosfato-acetilglucosamina-ácido glucurónico, posible precursor

de proteoglicanos como la heparina.

1.2.5. Dolicol-oligosacáridos conteniendo manosa

Behrens y col. (198) descubrieron la formación de poliprenil oligosacáridos conteniendo manosa y después muchos grupos (Tablas 15 a 16), especialmente los dirigidos por Lennarz (124) y Heath (199), han estudiado estos derivados. Los ensayos revelaron propiedades similares a las del EA-Glc y ello con independencia del órgano u organismo estudiados(45).

TABLA 15 : Principales trabajos sobre doliquil-oligosacáridos que contienen manosa : plantas y grupos inferiores

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>Hongos</u>					
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	1977	140	Soja (Glycine)	1977	62
<u>Plantas</u>			Células de Sicomoro (cultivo)	1976	103
<u>Algodón</u>	1975	102			
	1977	163	<u>Artrópodos</u>		
<u>Poroto (Phaseolus)</u>	1976	97,162	<u>Insectos</u>	1977	136
	1977	62	ESTA TESIS	1978	203
			<u>Crustáceos</u>	ESTA TESIS	

TABLA 16 : Principales trabajos sobre doliquil-oligosacáridos de vertebrados que contienen manosa

	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>		<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
<u>Hígado</u>	1973	193			
	1974	38			
	1975	204,205,216,217	<u>Tiroides</u>	1973	124
	1977	213		1976	125,192,194
<u>Aorta</u>	1975	128		1978	212
	1976	129	<u>Mieloma</u>	1974	199
	1977	214		1977	209
<u>Oviducto</u>	1973	124	<u>Retina</u>	1977	210
	1974	201	<u>Parótida</u>	1975	127
	1975	130,131,200	<u>Eritrocitos</u>	1977	151
	1976	173,218	<u>Reticulocitos</u>	1977	150
	1977	206,208,219	<u>Linfocitos</u>	1974	196
<u>Cuerpo lúteo</u>	1975	215	<u>Fibroblastos</u>	1977	149,211
<u>Células de ovario</u>	1977	207			
<u>Páncreas</u>	1977	148,110			

Desde el punto de vista estructural, y sin que ello implique necesariamente una interrelación fisiológica, los lipo-oligosacáridos conteniendo manosa pertenecen a la misma familia química que el EA-Glc . Su fórmula general sería



donde n , habitualmente, es entre 1 y 9 . Las pruebas de la existencia de un grupo diacetilquitobiosa en el extremo reductor son conclusivas. Se obtuvieron principalmente en los derivados de oviducto de gallina (200) y de mieloma de ratón (199) .

Leloir y su grupo (200) lograron biosintetizar el trisacárido unido a lípido por elongación del Doliquil-P-P- $[^{14}\text{C}]$ -diacetil quitobiosa con GDP-Manosa.

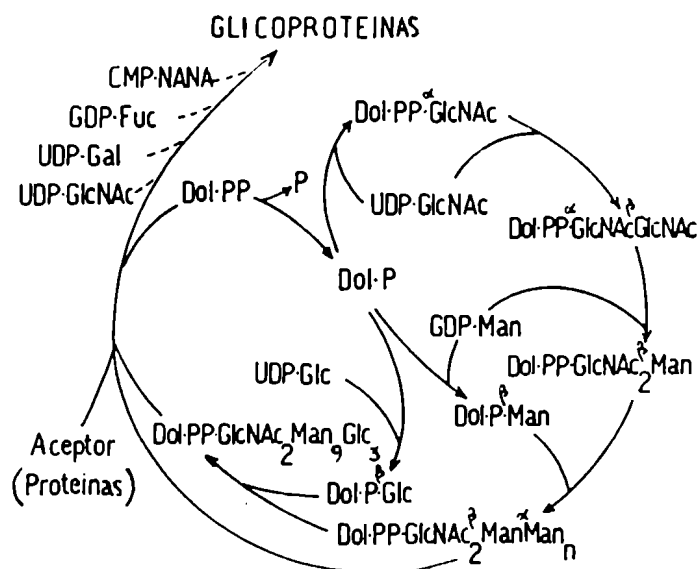
Utilizando Dolicol-P-P-(GlcNAc)₂ sintético, Wedgwood y col. (196) ratificaron que éste acepta un residuo manosa del GDP-Manosa (pero no del Dol-P-Man) para formar el lípido-trisacárido.

Otros trabajos similares (158, 173, 197, 202, esta Tesis) , confirmaron la igualdad entre los oligosacáridos radiomarcados con $[^{14}\text{C}]$ Man y los marcados con $[^{14}\text{C}]$ GlcNAc .

Los estudios " in vivo " han contribuido también a aclarar la formación fisiológica de estos poliprenil-oligosacáridos (176, 218, 221) .

El conjunto de datos químicos y enzimológicos indica que los poliprenil oligosacáridos se formarían según la secuencia de reacciones postuladas en la Figura 8 .

FIGURA 8: Secuencia postulada para las reacciones de formación del EA-Glc (Dol-P-P-GlcNAc₂-Man₉-Glc₃) y de glicosilación de proteínas. (Según Behrens, citado por Leloir (138), y modificado según datos de Li y col. (307)).



En general, los poliprenil-oligosacáridos radiomarcados en manosa se obtienen con facilidad y rendimiento aceptable. Es por ello que la mayoría de los autores ha preferido partir de éstos en experimentos de glicosilación de proteínas, que se discuten en el próximo capítulo.

1.3. BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS

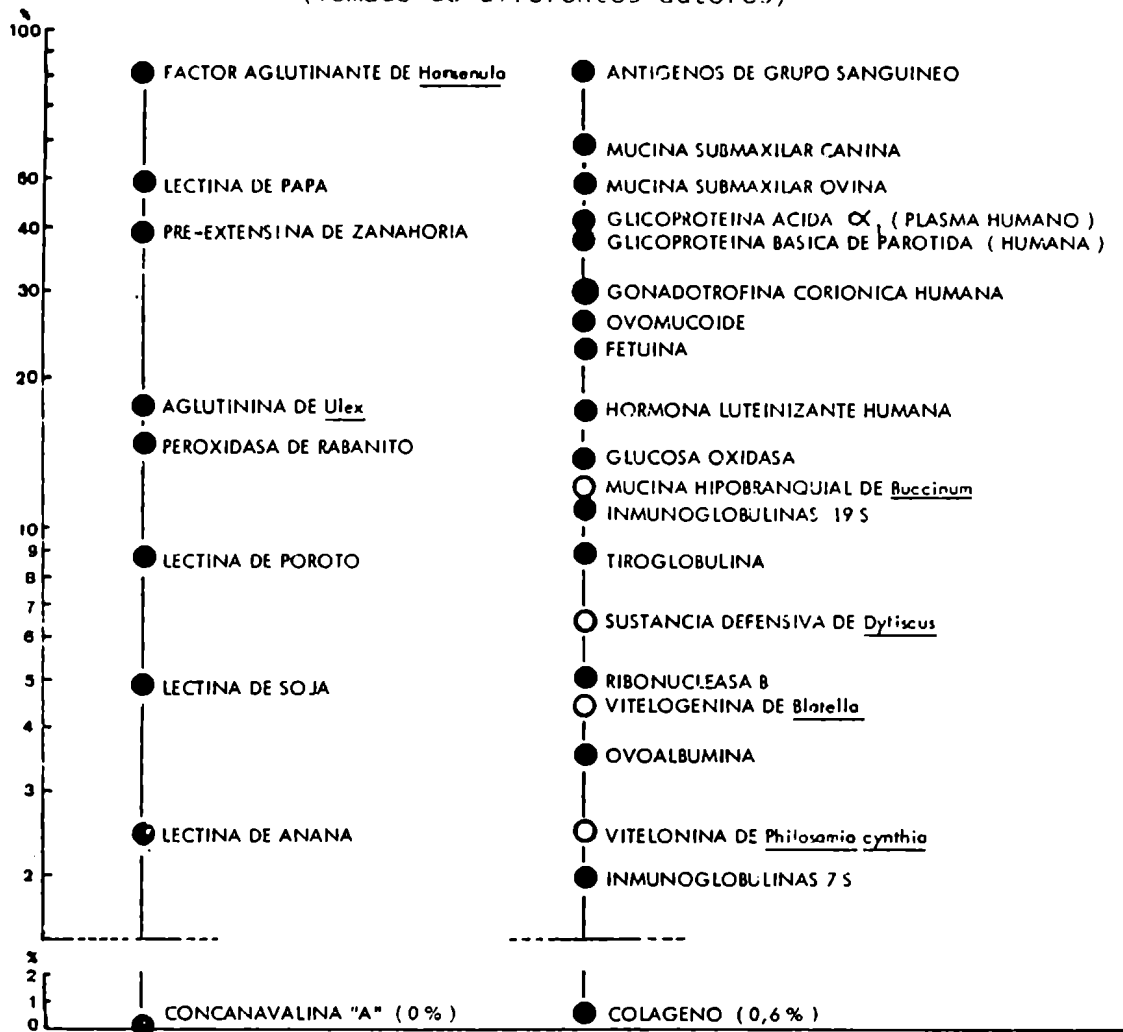
1.3.1. Generalidades

El Peso Molecular de las proteínas glicosiladas va desde 10.000 hasta 1.500.000 , es decir que por criterio de tamaño, no se agrupan en una clase especial de proteínas. Lo que es quizás más interesante tener en cuenta es la proporción de la parte carbohidrato en la molécula (Figura 9), el número de cadenas de carbohidrato por molécula de glicoproteínas y/o el número de aminoácidos entre las mismas (Tabla 17) (45, 222) .

TABLA 17 : Número y separación entre sí de cadenas de hidratos de carbono en glicoproteínas (datos tomados de Spiro (261) y otros)

<u>Nº DE CADENAS DE CARBOHIDRATO</u>	<u>SEPARACION ENTRE CADENAS DE H. de C. (Nº de aa)</u>	<u>GLICOPROTEINAS</u>
1	124	Ribonucleasa B (bovino)
1	270	Desoxirribonucleasa
2	375	Transferrina Humana
2	776	Inmunoglobulina G Humana
3	1000	Colágeno Escleritos Conejo
4	770	Colágeno Epidérmico Rata
4	51	Glicoproteína Ácida α_1 del Suero
6	60	Fetúina del Suero Fetal
8	135	Colágeno Epidermis Bovina
13	113	Haptoglobina Humana
19	296	Tiroglobulina Bovina
19	173	Colágeno de Córnea de Conejo
31	207	Macroglobulina α_2 Humana
500	8	Mucina Submaxilar Porcina
800	6	Mucina Submaxilar Ovina

FIGURA 9 : Proporción de carbohidratos en glicoproteínas
(Tomado de diferentes autores)



Una de las clasificaciones más aceptadas (5 223) diferencia las glicoproteínas de los proteoglicanos, en base a las características químicas y proporciones relativas de las cadenas de carbohidrato (224). En las primeras, la proteína es, con frecuencia, el constituyente cuantitativamente más importante y las cadenas oligosacáridos son - en general - cortas, ramificadas y heterogéneas en cuanto a los azúcares presente (los más comunes GlcNAc, GalNAc, Man, Xyl, Gal, Ara, NANA). Como rasgo general no se encuentran ácidos urónicos. Habitualmente no hay unidades heterosacáridicas repetitivas . En los proteoglicanos, ricos en mucopolisacáridos, la parte protéica es menos importante que la polisacáridica; ésta está formada habitualmente por unidades repetitivas, casi siempre

lineales (223, 224). Es raro encontrar ácido siálico y muy común los ácidos urónicos y las hexosaminas. La esterificación con sulfato es frecuente. La unión típica es entre una serina y una D-xilosa.

Los investigadores europeos han adoptado la denominación de glicoconjugados para la totalidad de glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos (223). En general no hay una nomenclatura racional para ninguno de estos sub-grupos (4 , 223). Las glicoproteínas de vertebrados se clasifican frecuentemente por su función y/o tejido de origen (Tabla 18).

TABLA 18 : Clasificación de glicoproteínas por su origen y/o función

. MUCOGLICOPROTEINAS	- sub-mandibulares y sub-linguales (salivares)
	- parotídeas y de las capas de enamel
	- de grupos sanguíneos
	- gastrointestinales
	- del tracto respiratorio
	- del mucus cervical
. GLICOPROTEINAS DEL PLASMA	
. INMUNOGLOBULINAS	
. GLICOPROTEINAS DE LA LECHE	
. GLICOPROTEINAS URINARIAS	- fisiológicas
	- patológicas
. GLICOPROTEINAS PROPIAS DEL SISTEMA NERVIOSO	
. ENZIMAS	
. HORMONAS	
. LECTINAS	

Las glicoproteínas de invertebrados han sido poco estudiadas. Quizás el grupo en que han sido más es el de los Mollusca (225).

Tabla 19 : Tipos de enlace en glicoproteínas

<u>ENLACE N-Glicosídico</u>	
• β -d-GlcNAc-ASN	• Pared celular de plantas superiores: Extensina en tomate, etc.
• Glicoproteínas del suero	• Colágeno de cutícula de anélidos (lombriz de tierra).
• Lectinas de plantas	• Glucosamiloasa de <u>Aspergillus</u>
• Albúmina de huevo	• Invertasa de levadura
• Manano de levadura	• Manano de levadura
• Sulfato de queratano, de la córnea	• Colágeno de cutícula de lombriz de tierra
• Mucina sub-maxilar, ovina, bovina y porcina	• Colágeno cuticular de anélidos
• Mucina gástrica humana	• Glicopéptidos fitotóxicos de hongos
• Mucina de carcinoma	• Colágenos y membranas basales de cordados
• Gastroferrina humana	• Extensina de pared celular y glicoproteínas de plantas
• Glicoproteínas de membrana	• Glicoproteína de endosperma de trigo
• Inmunoglobulinas	
• Fetuina	
• Glicoproteínas anticongelantes de pez antártico	
• Caseína K de vaca	
• Gonadotropina coriónica humana	
• Proteoglicanos (glucosamina-glicanos), excluidos el hialuronato y el sulfato de queratano	

<u>ENLACE O-Glicosídico</u>	
• α -d-GalNAc-SER	• -d-Gal-SER
• α -d-GalNAc-THR	• -d-Man-SER
	• -d-Gal-THR
	• -d-Man-THR
	• β -d-Gal-HYL
	• -L-Ara-HYP
	• -d-Gal-HYP

o) Datos tomados de Referencias : 4, 281 o 287
b) "Médula" del manano
c) Cadenas laterales del manano

• β -d-Xyl-SER

1.3.2. Unión péptido-carbohidrato

La característica esencial de las glicoproteínas es la unión covalente entre el carbohidrato y la cadena peptídica. Las uniones que se conocen involucran sólo 5 aminoácidos, dos de ellos raros - 4-hidroxi-lisina y 4-hidroxi-L-prolina y tres (L-ASN, L-SER y L-THR) que son habituales en todas las proteínas.

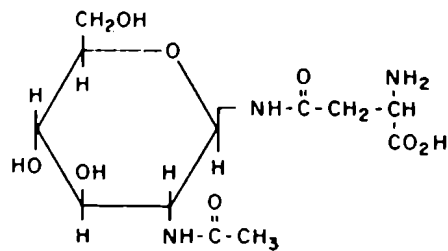
En la Tabla 19 (ver página anterior) se indican los tipos de uniones de las glicoproteínas divididas según sea el enlace N-glicosídico u O-glicosídico.

Unión ASN-GlcNAc

En las glicoproteínas con enlace N-glicosídico (Figura 10) éste se establece entre

FIGURA 10 : Estructura del N-acetilglucosaminil-asparagina

(2-acetamido-1-L- β -aspartamido-1,2-di-deoxi- β -D-Glucosa)



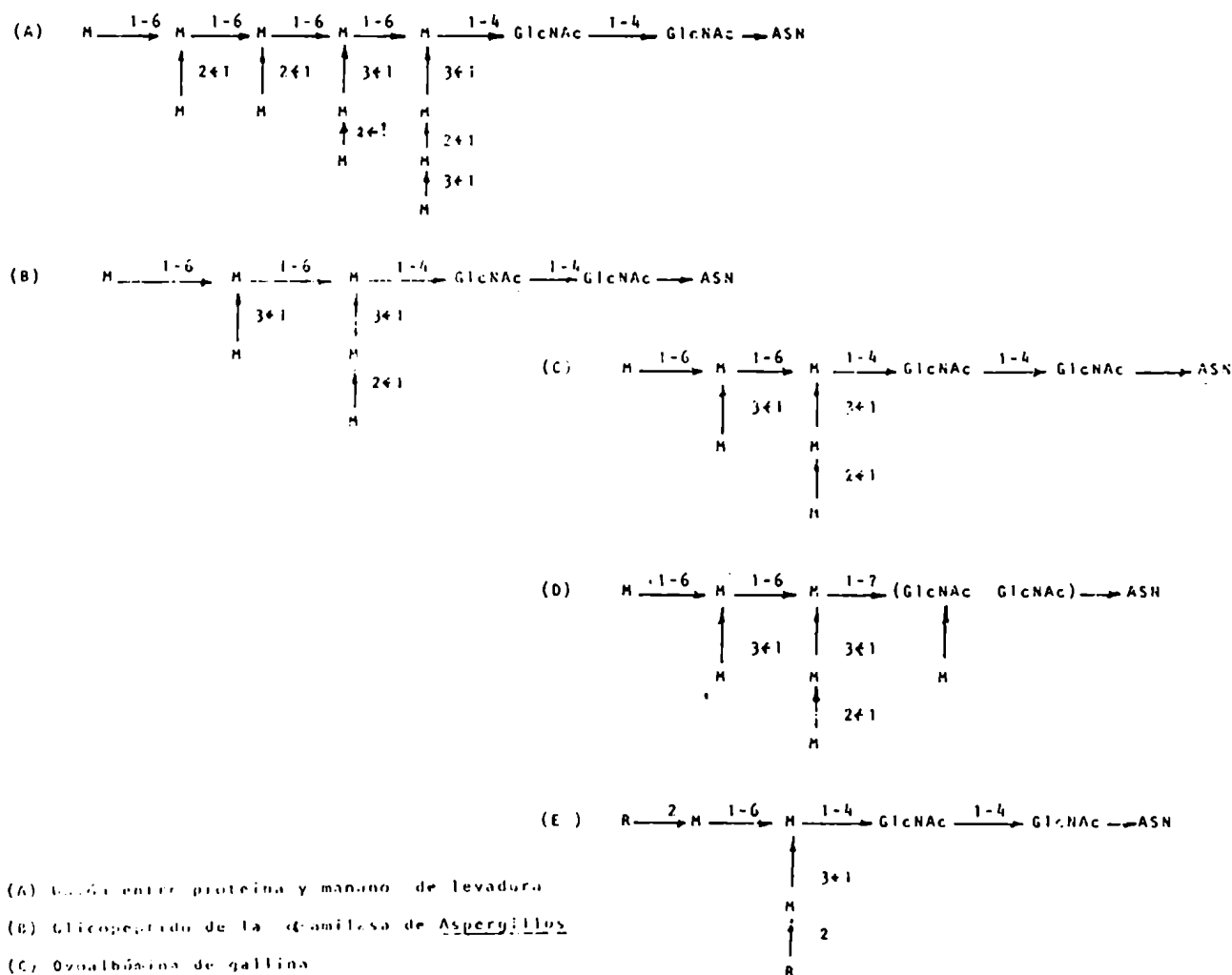
una N-acetilglucosamina y una Asparragina. Cabría esperar una participación importante de los lípidos oligosacáridos intermediarios en su biosíntesis ya que todos ellos poseen GlcNAc en el extremo reductor del oligosacárido (ver más adelante). El enlace ASN-GlcNAc es lábil al álcali (0.2 M NaOH / 100° C; tiempo medio de hidrólisis: 100 min.). La vida media en HCl 2 M / 100° C es de 17 min.

En la Tabla 20 se indican las principales glicoproteínas que poseen esta unión; en la Figura 11 se representan algunos de los principales tipos de glicopéptidos obtenidos por degradación de glicoproteínas ricas en manosa (222 a 226). Existe microheterogenidad en casi todos los glicopéptidos que se aíslan por degradación enzimática de glicoproteínas, como la ovoalbúmina (227) .

TABLA 20 : Glicoproteínas con enlace GlcNAc-ASN (Tomado, en parte, de (4) y (22))

<u>GlcNAc - ASN</u>	<u>Man β1-4</u> <u>GlcNAc β1-4</u> <u>GlcNAc - ASN</u>
Aglutinina de soja	Unión proteína - manosa en levadura
Avidina de pollo	α - amilasa de <u><i>Aspergillus</i></u>
RNAse porcina	Ovoalbúmina
DNAsa A bovino	Ovomucoide
Pigmento visual bovino	Tiroglobulina porcina
Sulfato de keratano	RNAse B bovino
Membrana basal glomerular bovino	Fetuna bovino
Sialoglicoproteína de membrana humana	IgG bovino
Macroglobulina α -2 humana	IgG murina
Glicoproteína ácida α -1 humano	IgG, IgA e IgE humanas
Conodotrolina humana coriónica	Lactotransferina humana
IgM y Ig E humanas	

FIGURA 11 : Glicopéptidos ricos en manosas (tomado de 222)



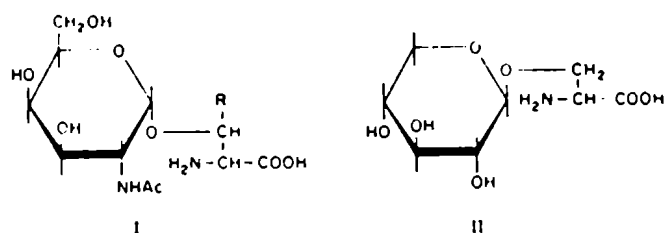
- (A) Unión entre proteína y manosa de levadura.
 (B) Glicopéptido de la α-amilasa de *Aspergillus*.
 (C) Ovalbúmina de gallina.
 (D) Glicopéptido 1 de la IgM humana.
 (E) Región interna de varias inmunoglobulinas.
 (R indica que son azúcares variables)

Enlaces O-glicosídicos

Los enlaces GalNAc-SER, GalNAc-THR y Xyl-SER (Figura 12) son sumamente lábiles al álcali, sujetos a β -Eliminación (0.05 a 0.1M NaOH / 25° C / 24 hs) (ver Métodos). Los enlaces Gal-Hyl y Ara-Hyp son muy estables al álcali (estable a 2 M NaOH / 90-105° C / 16-20 hs y también a 0.05 M SO_4H_2 / 100° C / 28 hs (Figura 12)).

ra 12). Los enlaces Man-SER o Man-THR son también lábiles al álcali.

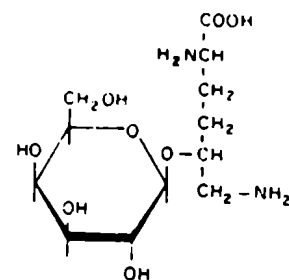
FIGURA 12 : Enlaces O-glicosídicos



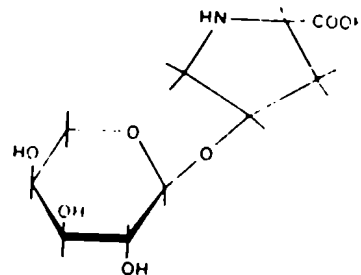
Enlaces O-Glicosídicos a serina ($R = H$)
o a threonina ($R = CH_3$).

(I) Enlace a GlcNAc, de tipo α .
(II) Enlace a xilosa, de tipo β .

Enlace O- Glicosídico Gal-HYL



Enlace O-Glicosídico Ara-HYP
(arbitrariamente dibujado en forma β ,
por no conocerse la real configuración)



1.3.3. Proteínas glicosiladas por dolicol derivados

Aunque ya había sido postulado (6, 109), la participación de los poliprenil-oligosacáridos en la glicosilación de una proteína eucariote no quedó firmemente establecida hasta el trabajo de Parodi y col. (146). En el mismo se demostró que el EA- (^{14}C) Glc , incubado con microsomas de hígado de rata era transferido a una glicoproteína (insoluble en TCA caliente). Lucas y col. (13) usaron precursores doblemente marcados con (^{14}C) Manosa y (^3H) GlcNAc - es decir en ambos extremos de la molécula oligosacáridica - y vieron que en la incorporación a glicoproteína la relación de marcas se mantenía constante. Ello indica que el oligosacárido se transfirió en bloque a la proteína.

Dado que en muchas glicoproteínas con enlace N-glicosídico la secuencia de los azúcares más próximos a la proteína es idéntica a la encontrada en los poliprenil oligosacáridos ((GlcNAc)₂ Man), se ha propuesto que la parte interna oligosacáridica de las glicoproteínas con unión ASN-GlcNAc se estructuraría vía lípidos intermediarios y que el resto de la cadena lo haría vía nucleótidos azúcar. A pesar de esta generalización no existen todavía suficientes datos sobre la identidad de la mayoría de las proteínas glicosiladas por los poliprenil-azúcares (230, 45).

Los datos publicados sobre la glicosilación, vía lípidos, de proteínas de oviducto indican que sólo un 10 % de las mismas reaccionaron con el suero antiovoalbúmina, a pesar de ser ésta la principal glicoproteína biosintetizada (131) y lo mismo sucedió con las cadenas de inmunoglobulina de mieloma de ratón (199). Estas tienen una estructura, en la médula del oligosacárido, similar a las de varias glicoproteínas plasmáticas (223). (Fig.11, pág.34).

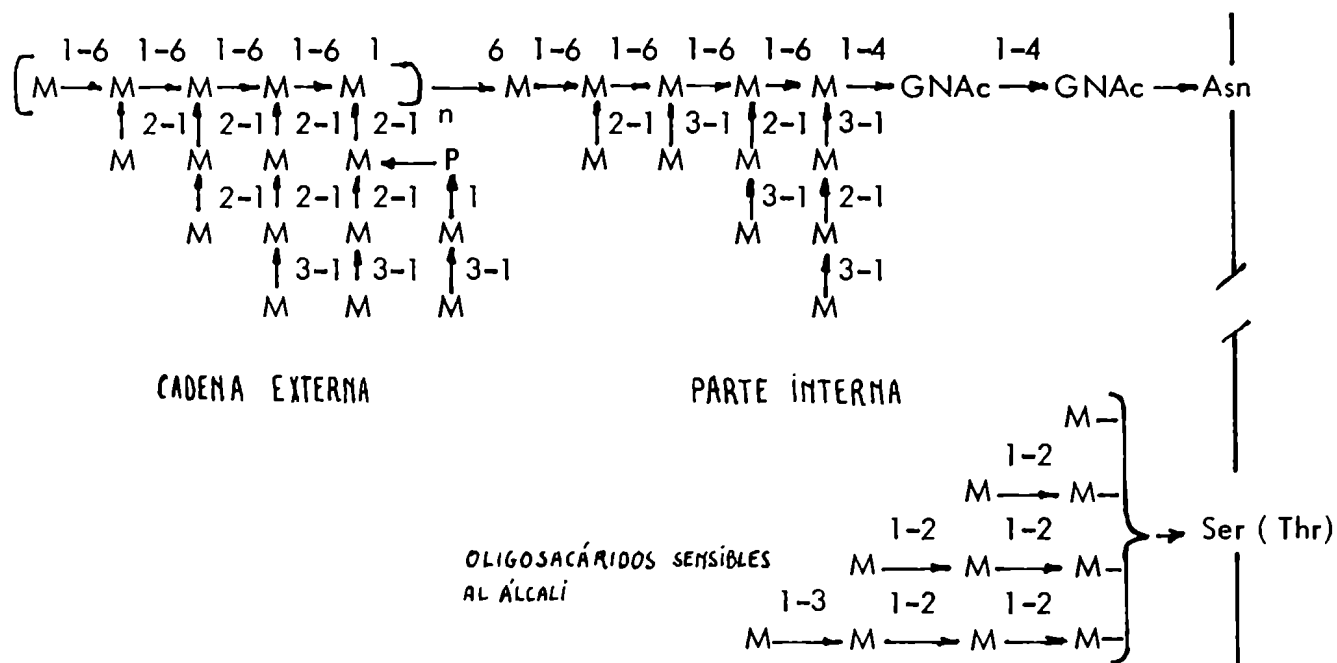
También se ha demostrado la participación de dolicol-derivados en la unión a serina o

threonina (enlace O-glicosídico).

El caso más ilustrativo para ambos tipos de transferencia es el de manano de levadura que contiene dos tipos de cadenas hidrocarbonadas (288 y 289): unas cortas, (1 a 4 manosas) unidas a SER o THR y otras largas y ramificadas unidas por $(\text{GlcNAc})_2$ a ASN con una parte interna de hasta 20 manosas y una periferia de hasta 150 manosas (289).

El Dol-P-Man es el precursor de las manosas unidas a SER / THR (81) mientras que la parte interna de las cadenas largas se sintetiza aparentemente a partir de Dol-P-P-
- $(\text{GlcNAc})_2 \text{Man}$ (97, 157, 158) y/o de poliprenil-oligosacáridos más largos (291) (Figura 13).

FIGURA 13 : Esquema de la parte interna del manano unido a proteína en levadura (sobre la base de (222), con modificaciones)



Además, Parodi (291) logró demostrar que el oligosacárido liberado del dolicol pirofosfato por hidrólisis ácido débil fue capaz de elongarse " in vitro " dando un polímero con las características típicas de la porción periférica de las cadenas largas del manano.

Simultáneamente a la redacción de esta Tesis han aparecido varios trabajos referentes a la glicosilación de glicoproteínas virales del tipo ASN: Li y col. (307) han confirmado que el oligosacárido unido a lípido (el EA-Glc del grupo de Leloir) se transfiere en bloque al polipéptido naciente. Tras lo cual, enzimas posiblemente específicas eliminan las glucosas y parte de las manosas. Robbins y col. (319) y Hunt y col. (318) han obtenido resultados parecidos con glicoproteínas virales y el modo de procesamiento parece muy general, a juzgar por los trabajos de Staneloni y Leloir en tiroides (212) y Ugalde y col. (321) en hígado. En este último trabajo se describe una glucosidasa que actuaría únicamente sobre estructuras como la del EA-Glc (ver Figura 7 , página 23). Este procesamiento específico de los glicopéptidos nacientes, a nivel de retículo endoplasmático (321) puede constituir una etapa crucial en la regulación del destino de la glicoproteína terminada.

En las Tablas 13 a 16 se citaron algunos de los trabajos esenciales sobre transferencia de azúcares de lípidos a proteínas. En la Tabla 21 se indican los trabajos más recientes, que eventualmente remiten a los anteriores.

TABLA 21 : Principales trabajos recientes sobre glicosilación de proteínas mediada por poliprenil azúcares.

<u>ORGANISMO</u>	<u>CITAS</u>	<u>ORGANISMO</u>	<u>CITAS</u>
.Algas	324	.Vertebrados	
.Levadura	140, 158 a 160	*Cerebro	195
.Arvejas	137	*Retina	132
.Virus	320, 322, 325	*Hígado	191
		*Tiroides	192 a 194, 212
		*Oviducto	208
		*Ovario	207
		*Fibroblastos	149, 211
		*Mielomas	209, 320

Se puede, por tanto, postular que en ambientes intracelulares hidrofóbicos la parte oligosacáridica de ciertas glicoproteínas se arma a través de lípidos intermediarios. Eso sería válido para glicoproteínas de membrana y también para glicoproteínas de exportación que se glicosilen en forma previa, simultánea o inmediatamente posterior a la penetración del péptido nascente en la cisterna del retículo endoplásmico (228, 229) .

1.3.4. Tunicamicina y otros antibióticos

Takatsuki y col. (326) aislaron del hongo Streptomyces lysosuperificus un antibiótico activo contra virus, bacterias Gram positivas y hongos. Lo llamaron Tunicamicina y

encontraron que contenía glucosamina. Kuo y Lampen (327) demostraron que en la levadura, la tunicamicina actuaba como inhibidor de la síntesis de glicoproteínas. Los mismos grupos observaron (328, 329) que el antibiótico interfería con la síntesis del Dol-P-P-GlcNAc . Esta inhibición, de tipo competitivo se producía solamente sobre la unión de la primera GlcNAc al doliquil y no sobre la incorporación de la segunda (337) . Otros grupos han confirmado este efecto (Tabla 22) y, actualmente, la TC se utiliza como una valiosísima herramienta para esclarecer la participación de lípidos intermedios en la biosíntesis de diferentes glicoproteínas (330, 331) .

TABLA 22 : Acción de la tunicamicina sobre la biosíntesis de Dol-P-P-GlcNAc y de glicoproteínas: Principales trabajos.

<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>	<u>AÑO</u>	<u>CITAS</u>
1971	326, 335	1976	337 a 339, 345
1972	336	1977	175, 219, 330
1974	327		343, 346
1975	328, 329	1978	331, 342, 344, 349

Kang y col. (332) han descrito la capacidad de la anfomicina, que es un antibiótico polipeptídico, para inhibir la biosíntesis del Dol-P-P-GlcNAc y la de Dol-P-Man. Por otra parte, Reuvers y col. (333) encontraron que un antibiótico similar, la bacitracina, inhibió la formación del Dol-P-P- (GlcNAc)₂ . Ambos antibióticos también inhiben la formación de derivados de undecaprenol en bacterias (332, 334) .

1.4. GLICOPROTEINAS DE INSECTOS

A pesar de que los artrópodos constituyen el phylum animal con mayor número de especies, su bioquímica está poco desarrollada. Gran parte de las falencias en los estudios realizados con artrópodos se deben a que han sido desarrollados por biólogos carentes de formación técnica para el trabajo a nivel molecular. Los bioquímicos, por su parte, prefieren frecuentemente trabajar con mamíferos, plantas u hongos. En los invertebrados, en general, los complejos de proteínas-hidratos de carbono sólo se han estudiado bien recientemente ya que gran parte de los trabajos de más de 15 años utilizaban técnicas de detección histoquímicas (225).

1.4.1. Mucopolisacáridos unidos a proteínas

La identificación histoquímica de proteínas asociadas a ácidos hialurónicos no se puede tomar como evidencia de una unión estable (225). Sin embargo, se han identificado varios aminoácidos en los hidrolizados del hialurónico constituyente de la membrana peritrófica de gusano de seda (231, 232). En secreciones de glándulas salivares de dípteros se ha descrito también una proteína aparentemente unida a hialurónico (234, 274). Estos datos se contradicen con lo encontrado en mamíferos, donde el hialurónico parece simplemente interaccionar específicamente con proteoglicanos, sin que medien uniones covalentes (4 y 5).

Por otra parte, existe una secreción polisacáridica en los tubos de Malpighi de varios insectos homópteros rica en ácido glucurónico, glucosa, Rhamnosa y glucosamina (UNAcetil).

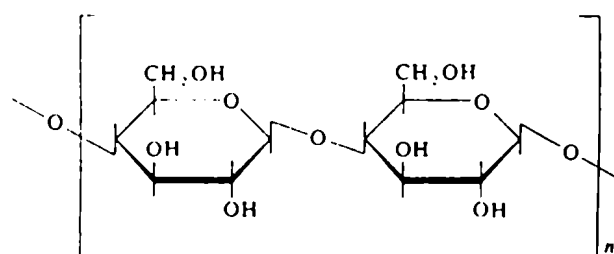
En Cosmocarta abdominalis el polisacárido ácido de malpighi parece estar asociado con proteína y es sensible a hyaluronidasa testicular (235, 236). Aquí también podría tratarse de un caso de unión no covalente.

1.4.2. Homopolisacáridos unidos a proteína

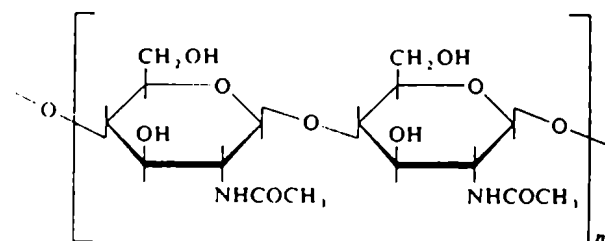
Quitina

La quitina es el polisacárido más abundante del reino animal. Es un polisacárido lineal de residuos GlcNAc unidos en forma β (1 \rightarrow 4). La estructura y propiedades son muy similares a las de la celulosa (Figura 14). Probablemente la quitina de invertebrados, en

FIGURA 14 : Estructura de celulosa y de quitina



CELULOSA

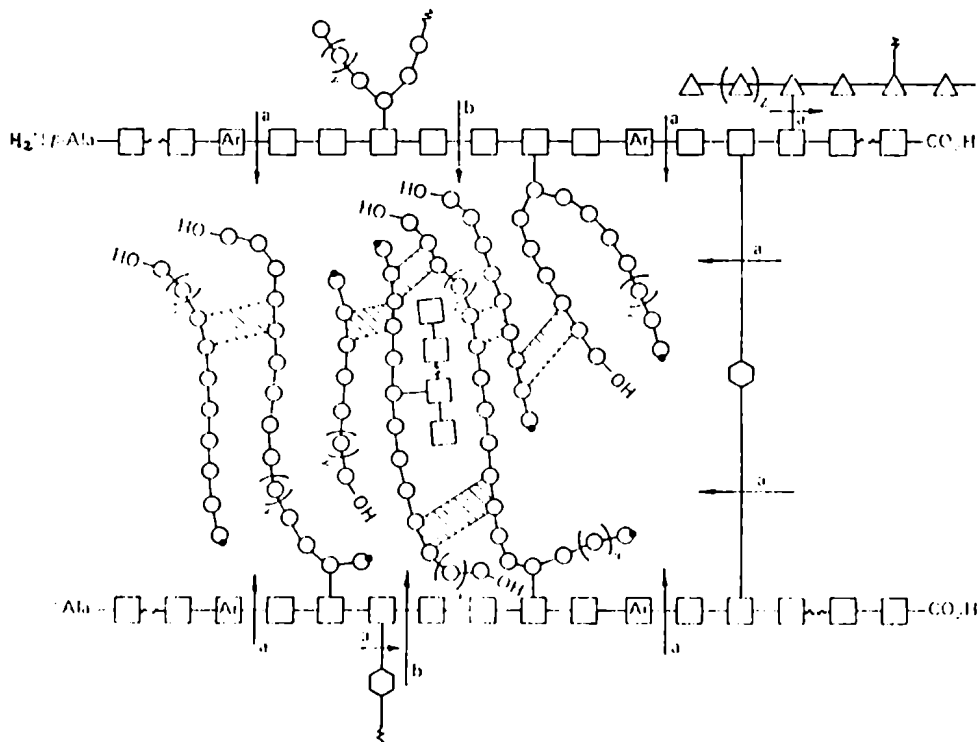


QUITINA

su estado natural, debe estar unida a proteína (308); sin embargo, debido al tipo de extracciones sumamente drásticas, se consideró durante mucho tiempo que se trataba de un " homopolisacárido " sin unión a otras sustancias.

Existen evidencias de que hasta un 10 % de azúcares de la cadena podrían estar desacetiladas (237, 308). Además, dependiendo del tejido de donde se extrae la quitina, habría pequeñas cantidades de otros azúcares neutros (309, 312). La quitina del exo- y endoesqueleto cuticular parece estar tan complejamente unida a proteína y otras moléculas (Figura 15) que más propio parece referirse al complejo como una glicoproteína de

FIGURA 15 : Modelo de estructura de cutícula
(tomado de Lipke and Geoghegan (310))



○ : N-acetilglucosaminil △ : Indolil □ : Aminoácido (Ar = aromático)
 ◻ : Polifenol . Las áreas rayadas indican interacciones no covalentes (a) Puntos sensibles a la oxidación con N-Bromo-succinimida. (b) Puntos sensibles a enzimas proteolíticas. (y) índice arbitrario que representa la polimerización de la quitina. (z) idem polimerización de la melanina.

cutícula (225, 308, 310 al 313, 233)

Los datos de cristalografía de Rayos X apuntan fuertemente en ese sentido (225, 314, 315). Se ha postulado que la artropodina, principal proteína de cutícula, interacciona con la quitina (debido a su configuración β) (238) pero probablemente se trate de interacciones débiles. Hackman (239, 240) eliminó el grueso de la proteína e identificó los aminoácidos más próximos a la matriz oligosacáridica como histidina y ácido aspártico, lo que sugeriría la existencia de un enlace entre el grupo amino de la hexosamina y el grupo β -carboxilo del ácido aspártico. Sin embargo otros autores han cuestionado estos resultados (241, 312).

En la epicutícula del arácnido Palamnaeus swammerdami se ha detectado principalmente ácido glutámico en los glicopéptidos de quitina (242).

Glucógeno

El glucógeno es un polímero α (1 \rightarrow 4) de glucosa, con cadenas ramificadas unidas por puentes α (1 \rightarrow 6). Se lo ha encontrado soluble en ácido tricloroacético (lio-glucógeno) e insoluble (desmoglucógeno). Se ha postulado que este último está covalentemente unido a proteína (316).

En el cestode Moniezia expansa el desmoglucógeno forma un complejo con proteína y se lo puede dividir electroforéticamente en dos fracciones que contienen un 40 % ("Baerina") y 90 % (" Moniezina ") respectivamente de proteína (243). Se ha encontrado la " baerina " en Taenia saginata (244) y otros organismos (245, 246).

En la pupa de mosca Calliphora erythrocephala existen cuatro fracciones de glucógeno que sólo difieren en su contenido peptídico y en el grado de ramificación (247).

Reynolds (317) ha sugerido que - al menos en cutícula - muchas interacciones entre hidratos de carbono (fundamentalmente quitina) y proteína pueden establecerse por medio de bases de Schiff.

1.4.3. Vitelogeninas

Los precursores de proteínas de vitelo, presentes en hemolinfa de hembras de algunos insectos, han sido llamadas vitelogeninas (248). Tras modificaciones en la molécula,

TABLA 23 : Porcentaje de azúcares en glicoproteínas de vitelo

<u>Insecto</u>	<u>Tipo de glicoproteínas</u>		<u>% H. de C.</u>	<u>Cita</u>
	Vitelogenina	Vitelinina		
Blatella germanica	+		4,5	154
Blatella germanica	+		8,0	154
Leucophaea maderae	+	+	8,6	252, 255 al 257
Locusta migratoria	+	+	13.3	250
Locusta migratoria		+	11.0	258
Locusta migratoria		+	14.0	251
Hyalophora cecropia	+	+	1.0	253, 259
Philosamia cynthia	+	+	2.5	249, 260, 261

pasan al vitelo y se las denomina viteloninas (249). Ambos tipos de molécula son lipoglicoproteínas y los azúcares predominantes son (¿NAC?) glucosamina y manosa (249, 250, 252). En la vitelonina de langosta se aisló un glicopéptido donde la manosa parece unida a Asparragina (251). En la Tabla 23 (ver página anterior) se han resumido los estudios sobre estas sustancias.

1.4.4. Calliforina

Las larvas de Calliphora erythrocephala contienen partículas de 10 nanometros de diámetro constituidas por una glicoproteína llamada calliforina (262). El contenido de carbohidrato es bajo (0,5 %) (263).

Se han encontrado también proteínas que dan inmunoreacción cruzada con la Calliforina en Bombyx mori (264) y en Drosophila (265 al 267) pero no se ha detectado carbohidrato.

1.4.5. Manoproteínas solubles

La muda en la cucaracha parece estar acompañada por cambios en los carbohidratos de glicoproteínas plasmáticas (269). Utilizando técnicas electroforéticas se han aislado dos glicoproteínas del plasma de la cucaracha Periplaneta americana (270, 271), que contienen 2-amino-2 deoxy-D-Glucosa, 2 amino-2 deoxy- D- Galactosa, manosa, galactosa, arabinosa y xilosa. En el día previo a la muda aparece una tercera glicoproteína en el plasma (271). (Ver también (198)).

El principal azúcar neutro en estas glicoproteínas parece ser la manosa.

En la secreción de las glándulas salivares de Drosophila viridis hay una glicoproteína

conteniendo glucosa, galactosa, manosa y 2-amino-2-deoxiglucosa (272). Este último azúcar ha sido hallado también en secreciones de la glándula salivar de la prepupa de Drosophila melanogaster (273). Otras glicoproteínas similares han sido detectadas en secreciones salivares de larvas de mosquito quironómico (274).

En la secreción salivar de Rhynchosciara americana se han detectado (295) por lo menos 9 posibles glicoproteínas. Aparentemente la función principal del fluido salivar en las larvas sería la secreción de las proteínas usadas en la construcción del Cocón. Utilizando este insecto, Santelli y col. (296) han descripto una alta actividad biosintética de nucleótidos azúcares, posibles precursores de glicoproteínas.

1.4.6. Fibroínas de la seda

Estudios recientes de Sinohara (347) han descripto que las fibroínas constituyentes de la seda de diferentes especies de mariposas Bombycidae y Saturniidae contienen hasta tres unidades de hidrato de carbono cada 100 mg de proteínas (Tabla 24).

TABLA 24 : Cantidad de carbohidratos (μ moles / 100 mg) en varias fibroínas de sedas de diferentes mariposas (tomado de Sinohara (347))

	Man	Gal	Glc	Fuc	NH	Glucosamina	Galactosamina	TOTAL
BOMBYCIDAE								
<i>Bombyx mori</i>		0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	1.94
<i>Bombyx mandarina</i>		0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	2.09
SATURNIIDAE								
<i>Trachea</i>	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27	0.22	0.66
<i>Bombyx mori</i> (seda)	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.11	3.31
<i>Trachea</i> (seda)	0.27	0.11	0.29	0.00	0.00	0.30	0.28	1.90
<i>Trachea</i> (seda)	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.19	0.84
<i>Bombyx mori</i> (seda)	0.29	0.00	0.25	0.00	0.00	0.18	0.21	0.89
<i>Yponomeuta cecropiae</i>	0.27	0.21	0.00	0.22	0.11	0.28	0.18	2.27
<i>Rhodanthea</i>	0.21	0.00	0.27	0.00	0.00	1.20	0.00	2.01

La unión del hidrato de carbono a la proteína sería del tipo ASN-GlcNAc (348).

1.4.7. Otras glicoproteínas de insectos

Los huevos de Drosophila contienen adhesivos (275, 276) aparentemente excretados por las glándulas accesorias de las hembras (277) y que contienen 2 amino-2-deoxy-D-Glucosa. Los del saltamontes Achaeta domestica también contienen en su cáscara una especie de lubricante (para pasar por los ductos genitales) que es una glicoproteína conteniendo hexosaminas la cual parece tener propiedades de inhibidor de tripsina (278) .

Anderson (279) describió una secreción de las glándulas accesorias de aparato copulatorio masculino que parece ser una glicoproteína asociada a un fosfolípido y cuya naturaleza no pudo dilucidar debido a que usó técnicas histoquímicas.

Por otra parte Sissackian y Veinora (280) demostraron la presencia de un glicopéptido ácido soluble conteniendo 4 % de arabinosa en el fluido celómico de pupas de gusano de seda (Bombyx mori); hidrolizados de una fracción de un precipitado acetónico de dicho fluido redissuelto en agua dieron presencia de glucosa y manosa además de la arabinosa dominante. La fracción insoluble en agua parece ser una clase de nucleótido-glicopéptido de nuevo tipo.

Finalmente hay una larga lista de citas sobre glicoproteínas solubles, detectadas en base a evidencias histológicas, que son difíciles de evaluar (225, 268) .

1.4.8. Circulación y reconocimiento de glicoproteínas en insectos

Varios grupos de investigadores han observado que ciertas proteínas específicas de insectos, circulantes en hemolinfa, desaparecen de ésta por captación a nivel de cuerpos grasos

(297) . Muchas de estas proteínas, como la Calliphorina , son PAS positivas y se las encuentra también en células de cuerpos grasos, acumuladas en gránulos (298, 299) . El proceso de captación parece altamente selectivo (299) lo que sugeriría, por analogía con el hígado de los vertebrados (300) , la posible existencia en células del cuerpo graso de lectinas (o glicosiltransferasas) capaces de reconocer los carbohidratos de las glicoproteínas circulantes. Si así fuera, el proceso sería diferente de la desialización en los mamíferos (297) ya que no se ha detectado ácido siálico en proteínas solubles de insectos (301) .

1.5. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Como se ha expuesto en esta introducción, en el momento de iniciarse la presente Tesis, diferentes investigadores habían caracterizado derivados de dolicol en mamíferos, aves y hongos. Otros pocos trabajos habían extendido los estudios a las algas (dos trabajos), plantas (un trabajo) y a un protozooario, como único invertebrado (un trabajo). En varios grupos de trabajo, incluyendo el del Director de esta Tesis, se realizaban en ese tiempo, además de los estudios con mamíferos, nuevos estudios en plantas.

Los insectos y otros invertebrados interesaban al autor por sus particularidades fisiológicas y bioquímicas y su importancia económica y sanitaria. El punto de partida de la presente Tesis - como ya se ha indicado - fue la detección por el autor, de un glicolípido, con propiedades similares a las de los poliprenil-azúcares, en Triatoma infestans primero y en otros insectos después.

Los objetivos de la presente investigación han sido:

- 1°) Esclarecer la naturaleza y propiedades del poliprenil de insecto (hasta ese entonces desconocido) y de sus derivados fosforilados y glicosilados.
- 2°) Estudiar las relaciones metabólicas de esos poliprenil-derivados entre sí y el papel que cumplirían como intermediarios en la glicosilación de proteínas.
- 3°) Buscar correspondencias entre los datos obtenidos "in vitro" e "in vivo" , tratando de correlacionar con el ciclo de vida y estudiando posibles puntos de regulación.
- 4°) Extender los conocimientos obtenidos en insectos a organismos filogenéticamente cercanos (crustáceos) y establecer analogías con los resultados obtenidos por otros autores en eucariotes.

La presente Tesis contiene los trabajos realizados exclusivamente por el autor, bajo supervisión del Director. También contiene aquellos experimentos, de los trabajos realizados en colaboración, en que la participación del autor ha sido relevante y se omiten aquellos en que no ha tenido participación directa.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ORGANISMOS UTILIZADOS

El grueso de los experimentos descritos en el presente trabajo de Tesis se realizó con estadios larvales y adultos de " mosca de la fruta ", Ceratitis capitata, y de la " vinchuca "; Triatoma infestans

Se los seleccionó utilizando tres criterios principales:

- a) Posibilidad de conseguir suficientes cantidades de material;
- b) Posibilidad de determinar el momento del ciclo de vida y, en lo posible, poder manipular éste, y
- c) Detección de poliprenil transferasas.

Se han utilizado también, para experimentos especiales otros artrópodos que cumplieron alguna de estas premisas:

Tenebrio molitor (Escarabajo de panadería) (b, c)

Palendus dermestoides (Escarabajo de semillas) (a, b, c)

Camponotus mus (pupas) (Hormiga corredora) (b y c)

Periplaneta americana (Cucaracha) (b y c)

Aeschna bonaerensis (Libélula del Delta) (a en forma estacional)

Mallophora ruficauda (Moscardón de los colmenares) (a en forma estacional y c)

Apis mellifera (Abeja doméstica) (a y b)

Porcellio sp (Crustacea) (Bicho bolita) (a y c)

Artemia salina (Crustacea) (a, b, c)

Con el objeto de establecer paralaes con organismos filogenéticamente distantes de los insectos, pero con analogías metabólicas, se realizaron estudios en:

Neurospora crassa (Hongo ascomycete)

Phycomyces blakesleanus (Hongo zygomycete)

Euglena viridis (Zooflagelado fotosintético)

En la obtención rutinaria de enzimas y/o sustratos se han utilizado preparaciones de tejidos de mamífero (hígado de rata, de cerdo, etc.) y de aves (oviducto de gallina).

2.2. SUSTRATOS

A lo largo del presente trabajo se utilizaron diferentes lotes de cada droga radiomarcada.

Se utilizaron los siguientes nucleótidos-azúcares, preparados en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, de acuerdo al método de Wright y Robbins (303) con las necesarias modificaciones:

- UDP- $[^3\text{H}]$ -Glc de 3.46 Ci/mol y UDP $[^{14}\text{C}]$ Glc entre Ci/mol y 268 Ci/mol
- GDP- $[^{14}\text{C}]$ -Man de 180 Ci/mol
- UDP- $[^{14}\text{C}]$ -Gal de 268 Ci/mol
- UDP- $[^{14}\text{C}]$ -GlcUA de 268 Ci/mol

De fuentes comerciales se utilizaron:

- $[^{14}\text{C}]$ -Glucosa entre 260 y 268 Ci/mol de New England Nuclear
- $[^{14}\text{C}]$ -Manosa entre 50 y 100 Ci/mol de New England Nuclear
- $[^{14}\text{C}]$ -Glucosamina 200 Ci/mol de Amersham
- GDP $[^{14}\text{C}]$ Man entre 208 y 40 Ci/mol de New England Nuclear
- UDP $[^{14}\text{C}]$ - NAcetilglucosamina entre 45 y 60 G/M de New England Nuclear o Amersham
- UDP $[^{14}\text{C}]$ - NAcetilgalactosamina 47.0 Ci/mol de New England Nuclear
- UDP $[^{14}\text{C}]$ Arabinosa 183 Ci/mol de Amersham

- UDP [^{14}C] Xilosa 100 Ci/mol de New England Nuclear

^{14}C El [γ ^{-32}P] ATP se preparó según el método de Glynn y Chappell (304). La Trehalosa de 25 Ci/mol se preparó por síntesis enzimática mediada por Trehalosa fosforilasa según el método de Belocopitow y Maréchal (305). Se la obtuvo también por biosíntesis, en cultivo de cuerpos grasos de *Triatoma* con [^{14}C] Glucosa.

Los poliprenil derivados radiomarcados se obtuvieron de acuerdo a las técnicas expuestas en la presente Tesis.

Todas las demás drogas son de origen comercial. Los solventes orgánicos fueron generalmente destilados antes del uso, especialmente cloroformo, metanol y piridina.

2.3. ENZIMAS AUXILIARES

- Proteasa de *Streptomyces griseus* o Proteinasa de estreptococos (Pronasa) (Ec. 3.4.22.10) (Sigma y Calbiochem respectivamente)
- Quitinasa de *Streptomyces griseus* . Se purificó por el método de Cabib y Bowers (306)
- Emulsina y lisozima, de clara de huevo (Nutritional Biochemical Corp.)
- Celulasa de *Aspergillus niger* y β -glucosidasa de almendras (Sigma)
- El jugo de hepatopáncreas de caracol terrestre se preparó de acuerdo al método de Myers y Northcote (350)
- Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Sigma)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de levadura (Sigma)
- Hexoquinasa de levadura (Sigma)
- Peroxidasa de rabanito (Sigma)
- Fosfatasa alcalina bovina (Sigma)

2.4. EXPERIMENTOS " IN VIVO "

Para los mismos, se utilizaron, principalmente, diferentes estadíos larvales de *Triatoma*

infestans y de Periplaneta americana. En experimentos preliminares se determinó que, para Triatoma, la máxima incorporación de radioactividad a componentes cuticulares y a glicolípidos lábiles al ácido se verificaba en ejemplares recién mudados a adulto, durante el período en que la cutícula todavía es translúcida. Después de anestesiar con frío o con CO_2 , el precursor radioactivo se inyectó en hemolinfa con una microjeringa Hamilton. Con la aguja se perforó la pared abdominal flexible, entre dos piezas esternales previamente esterilizadas con etanol 96 %. La perforación se obturó con parafina caliente y, en caso de pérdida de hemolinfa, ésta se tomó con papel de filtro y se contó en centelleador para conocer la cantidad real de radiomarca inyectada. El animal se mantuvo a temperatura ambiente por el tiempo de marcación. Como vehículo se utilizaron soluciones fisiológicas de Hoyle o de Chen (Tabla 25).

TABLA 25: Medios de cultivo y soluciones Ringer de insecto

<u>Medio Semi-Completo</u>	<u>mg</u>	<u>Medio Mínimo</u>	<u>mg</u>
CaCl_2	300	NaCl	7000
ClNa	1050	KCl	550
KH_2PO_4	300	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	385
NaHCO_3	350	$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	530
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1800	$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	220
KCl	875	CO_3HNa	300
Acetato $\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100	Sacarosa	3500
Acido α -cetoglutárico	300	H_2O bidestil. csp	500 ml
Acido maleico	340	<u>Ringer de Hoyle (398)</u>	<u>mg</u>
Acido fumarico	205	NaCl	8200
Fructosa	700	KCl	700
Sacarosa	5600	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	800
Aibúmina bovina V	320	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300
Lactalbúmina	550	NaHCO_3	300
L-Glutamina	490	NaH_2PO_4	800
Hidrolizado lactalbúmina	990	Agua csp	1 lt.
Agua destilado csp	500 ml	<u>Ringer de Chen (399)</u>	<u>mg</u>
Penicilina G sódica Squibb		NaCl	7500
Estreptomicina Squibb		KCl	350
		CaCl_2	210
		H_2O csp	1 lt.

Para analizar la marca incorporada se disecaron los ejemplares sobre placa de parafina cuidando eliminar cabeza, hemolinfa y sistema digestivo y el resto se procesó para extracción con solventes.

2.5. CULTIVO DE TEJIDOS

Se utilizaron larvas de 5° estadio de Triatoma infestans y adultos recién mudados, preferiblemente en la etapa en que la cutícula aún es translúcida (son visibles las insectorubinas de la epidermis).

Se disecaron los animales esterilizados externamente con etanol, anestesiados por frío y decapitados, separándose los cuerpos grasos, las alas membranosas y las paredes tergaes y esternales del abdomen (los tubos de Malpighi se separaron por flotación en solución fisiológica). Todo el manipuleo se realizó en la forma lo más estéril posible, bajo campana de flujo frontal. Como medio de cultivo completo se utilizó hemolinfa de langosta de mar diluida al 25 % con una parte de Tris HCl pH 7.4 10mM y dos partes de medio mínimo o semi-completo (Tabla 25) (ver página anterior).

Se añadió (^{14}C) Glc, (^{14}C) Man o (^{14}C) Trehalosa, según los casos, y después de la incubación se lavó abundantemente con medio de cultivo nuevo tras lo cual se disgregaron las muestras en homogeneizador Potter/Eveljheim con émbolo de Teflón, accionado a motor.

Los homogenatos se extrajeron con cloroformo/metanol 3:2, calculando el volumen de las muestras como un 50 % de agua y completando para la partición con MgCl_2 4mM.

Diseño de una solución fisiológica y un medio de cultivo (Tabla 25)

El medio mínimo se preparó de acuerdo a los siguientes criterios: sustituir parte del NaCl de la solución fisiológica de Chen (399) por $\text{Na CO}_3\text{H}$ y $\text{Na PO}_4\text{H}_2$ como recomiendan Hoyle (398) y Madrell (400); además se añadió SO_4Mg . Se añadió sacarosa como estabilizante para disminuir roturas de células en cultivo.

El medio semi-completo (a completar con hemolinfa de langosta) se diseñó sobre la base de los requerimientos estudiados por Grace (401), sustituyendo los aminoácidos por hidrolizado de lactalbumina, suprimiendo las vitaminas, y estableciendo las proporciones de sales inorgánicas de acuerdo a los criterios generales para soluciones fisiológicas, con cuidado de evitar la formación de precipitados.

2.6. AISLAMIENTO DE DOLICOL DE INSECTO

- Método A:

Se homogeneizaron 250 g de pupas de *Ceratitis* en una licuadora Sorvall Omnimixer durante 3 min a velocidad máxima. El tampón de homogeneización contenía: Tris-HCl pH 7,35 50 mM; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 1 mM y 2,6-ditert-butil cresol (BHT) 0,1 g/litro como antioxidante. Se centrifugó a 13.200 x g en centrífuga refrigerada durante 10 min (el sobrenadante se puede utilizar como fuente de fracción microsomal). El precipitado se resuspendió en 1 litro de agua: acetato de etilo (100: 8) y se transfirió a un balón de 5 lt. Se añadieron 2 lt de metanol destilado conteniendo 150 g de KOH 85 % y 40 g de ácido pirogálico. Se reemplazó el aire del balón por N₂ y se dejó agitando por 2 hs a 37° C, después de lo cual se calentó a reflujo durante 4,5 hs a 70° C. Se dejó una noche a 20° C bajo atmósfera de N₂ y se extrajo con eter etílico una primera vez con 2,5 lt y una segunda vez con 1,5 lt. La fracción etérica se lavó con agua repetidamente (1 vez 2 lt y 6 veces de 1 lt) y se añadió al balón sulfato de sodio anhidro en exceso para eliminar el agua residual. Al extracto así obtenido se lo denominó: extracto saponificado. Se esquematiza la marcha de la extracción en la Figura 16. A partir de este extracto se

FIGURA 16: Extracción de dolicol de insectos=Método A. Obtención de Extracto saponificado libre de esteroides.

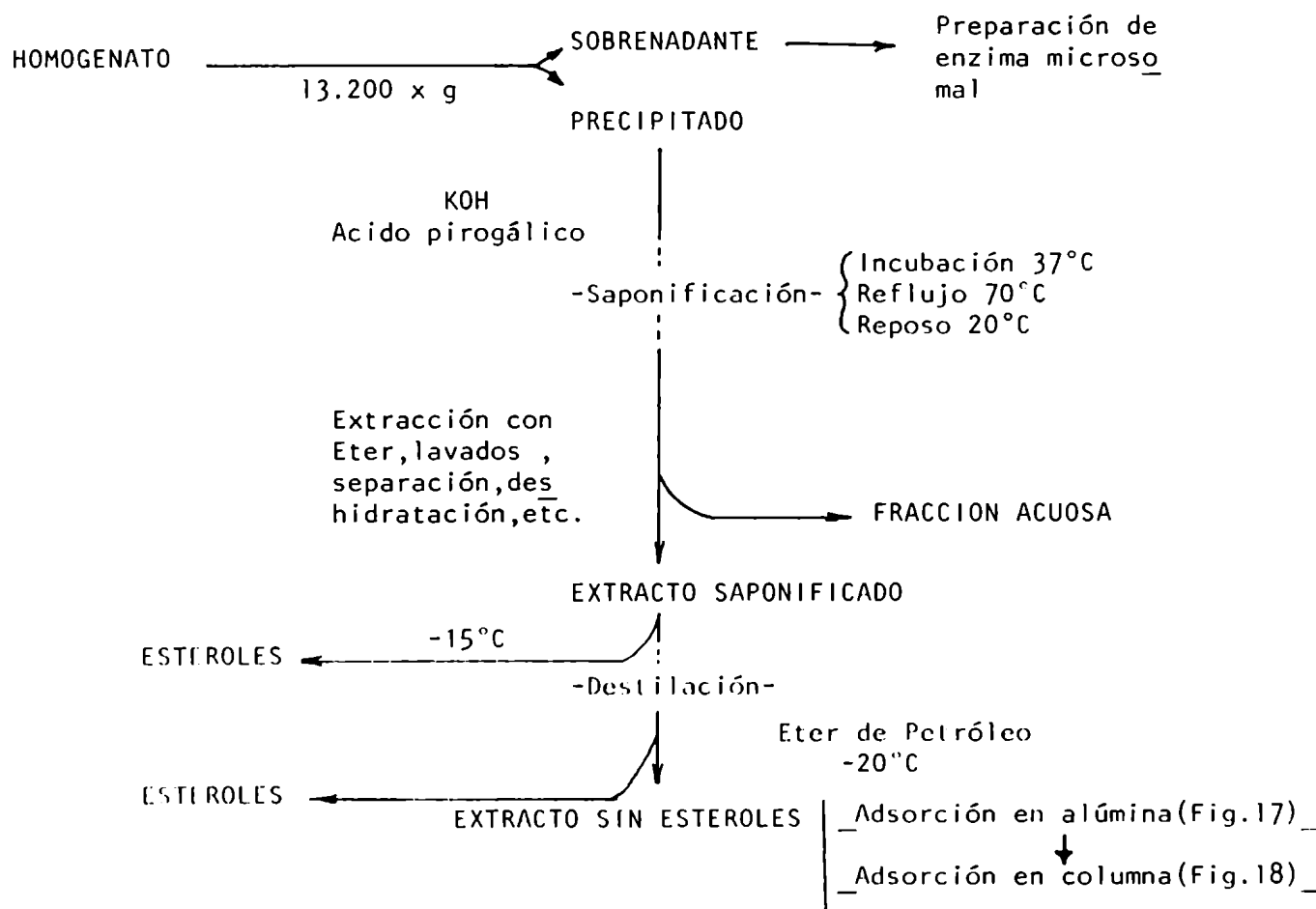
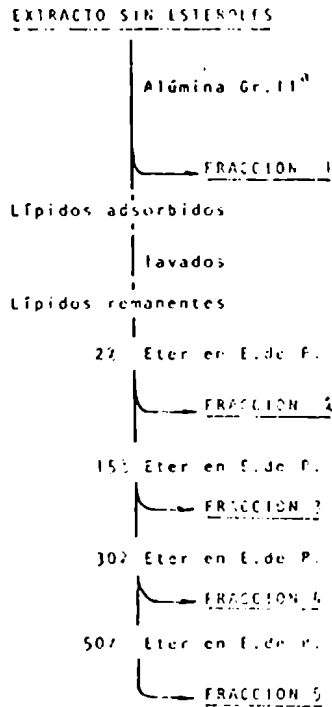
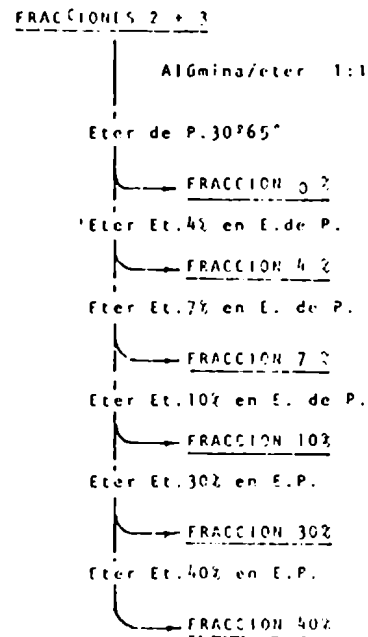


FIGURA 17 Purificación en alúmina



(a) La relación lípidos/alúmina en peso aproximadamente de 1:60.

Figura 18 :Columna Cromatográfica de alúmina^a

(a) Columna de 1.8 x 20,0 cm. Las eluciones se realizaron con 150cc de cada solución.

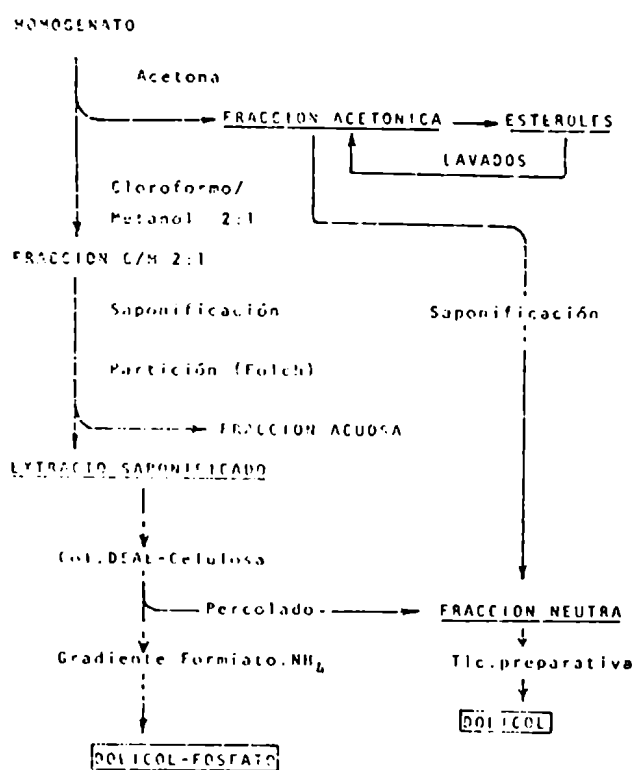
fraccionaron las clases de lípidos según el método de Burgos y col. (31) con leves modificaciones. Para ello se dejó una noche a -5° C el extracto saponificado, al cabo de la cual precipitaron esterole que se descartaron. Se destiló el extracto hasta volumen reducido (150 ml), se le añadieron 2 vol de éter de petróleo 30-65° C y se llevó a -20° C en congeladora. Los esterole precipitados se eliminaron por filtración en Buchner en ambiente frío y se lavaron con éter de petróleo frío repetidamente. Los filtrados combinados se volvieron a llevar a -20° C durante una noche y después de eliminar los esterole remanentes se redujo el volumen de los extractos a 100 cc bajo vacío. Este extracto se fraccionó por adsorción sobre 40 g de alúmina grado II (SERVA) en vaso de precipitado según el esquema de la Figura 17. Las fracciones 2 y 3 se mezclaron así como las 4 y 5, fraccionándose nuevamente por cromatografías en columnas de alúmina grado II (SERVA). Los lípidos adsorbidos se eluyeron de la columna según el esquema de la Figura 18 y se analizaron por cromatografía

de capa fina.

- Método B :

En un método alternativo de obtención de dolicol se utilizó la fracción acetónica del método de obtención de dolicol fosfato (ver más adelante). Después de eliminar los esteroides por repetidas precipitaciones a -20°C al extracto acetónico se le añadieron las fracciones neutras de la columna de DEAE-Celulosa del método de obtención de Dolicol-P. El extracto se redujo en volumen volviéndose a eliminar los esteroides por congelación y filtración y se lo purificó o bien por el método A o bien por sucesivas cromatografías del material en capa fina preparativa (0.7 mm de espesor). La obtención se esquematiza en la Figura 19.

Figura 19: Purificación de Dolicol de Insecto (Método B) y de Doliquil fosfato



Ocasionalmente, se utilizó el método de extracción de Walton y Pennock (25) como alternativa al método A , obteniéndose resultados similares.

2.7. EXTRACCION DE DOLICOL FOSFATO DE INSECTO

Se utilizaron 30 g de pupas de Ceratitis (en el momento en que comienza la pigmentación de los ojos) o larvas de 5° estadio de Triatoma infestans. Se homogeneizaron en cinco volúmenes de acetona y se filtraron. El residuo seco se volvió a extraer dos veces con 3 volúmenes de cloroformo/metanol 2: 1 y se filtró. Los extractos cloroformo-metanólicos se llevaron a 0.1 N de NaOH y se incubaron por 15 min a 37° C. Después de neutralizar con HCl y de llevarse a partición según el método de Folch y col. (355), la fase orgánica se lavó de acuerdo al mismo método repetidas veces con cloroformo/metanol/agua 1:16:16.

El extracto se hizo pasar por una columna de intercambio aniónico de DEAE-Celulosa (forma acetato) de 1,0 x 20,0 cm preparada en metanol 99 % y luego equilibrada con cloroformo/metanol 2: 1 . Después de reciclar el material lipídico de insecto, se siguió lavando con cloroformo/metanol 2: 1, para eliminar los lípidos neutros remanentes. Para la elución de la columna se utilizaron o bien un gradiente de concentración de formiato de amonio 0-200 mM en cloroformo/metanol 2: 1 o bien un gradiente discontinuo de 10, 20, 50, 100 y 200 mM de la misma sal en idéntico solvente. En ambos casos se recogieron fracciones de 2-3 ml a las cuales se les eliminaron las sales por el método de Folch y col. (355). En preparaciones masivas se cambiaron las proporciones de la columna de acuerdo a una relación empírica de 10 g de resina seca por cada 0,5 g de lípidos totales del extracto. El dolicol fosfato se detectó en la columna mediante el ensayo de glucosilación, utilizando enzimas de hígado de rata o de insecto.

2.8. PREPARACION DEL LIPIDO ACEPTOR DE INSECTO. EXTRACCION ANALITICA.

Treinta gramos de pupas o larvas de Triatoma se lavaron superficialmente con abundante solución Ringer de insecto (ver Tabla 25) helada, se congelaron con nitrógeno líquido o en congeladora a -70° C. Se redujo a polvo el material congelado y se liofilizó hasta peso constante. El polvo liofilizado se extrajo con 2 volúmenes de acetona durante 24 hs a 30° C. Se eliminó la acetona por filtración y se secó el residuo en corriente de aire. (El extracto acetónico puede utilizarse para preparar dolicol). El residuo seco se extrajo dos veces de 12 hs con 3 volúmenes de cloroformo/metanol 2: 1 y se filtró. (El filtrado cloroformo-metanólico puede servir como fuente de dolicol fosfato y de dolicol monofosfato azúcares).

El residuo se secó y se extrajo con cloroformo/metanol/agua 10:10:3. El extracto se llevó a seco, se resuspendió en solvente y se pasó por una columna de intercambio iónico de

DEAE-Celulosa (forma acetato) equilibrada con el mismo solvente. Después de reciclar la muestra se lavó la columna con 200 ml de cloroformo/metanol/agua 10: 10: 3 . En esas condiciones los dolicol pirofosfato derivados quedan unidos a la resina (143). La columna se eluyó en etapas con 20, 100 y 200 mM formiato de amonio en el mismo solvente (100, 150 y 150 ml respectivamente) . Las fracciones conteniendo sales se lavaron por partición según Folch y col (355) y se dosó la capacidad de las mismas para estimular la biosíntesis de poliprenil oligosacáridos. El lípido estimulador eluyó en la fracción de 100 mM de formiato de amonio.

Extracciones en gran escala

Con objeto de obtener cantidades de lípido aceptor suficientes para numerosos experimentos se partió de 300 a 500 g de insectos y los extractos se fraccionaron en columna de DEAE de 5.0 x 60 - 70 cm de DEAE-Celulosa. En esos casos se eluyó la columna con un gradiente entre 0 y 200 mM de formiato de amonio en cloroformo/metanol/agua 10:10:3 (5 litros) . La fracción que eluyó a 60 mM de concentración salina (1.150 ml) resultó rica en el lípido aceptor de insecto. (En estas extracciones el autor de esta Tesis solamente realizó los dosajes enzimáticos) .

2.9. PREPARACION DE DOLICOL Y DOLIQUIL DERIVADOS DE HIGADO

Se preparó el dolicol de hígado de cerdo de acuerdo al método de Burgos y col (51). El doliquil fosfato de hígado de cerdo se purificó siguiendo el método de Behrens y Leloir (6) .

Para las preparaciones de aceptores de hígado (mezcla de doliquil pirofosfato sacáridos) se siguió el método de Parodi y col. (145) .

Se sintetizó doliquil fosfato a partir de dolicol de hígado de cerdo siguiendo la técnica de Popjack y col. (351) con las modificaciones de Behrens y Leloir (6) y Tábora (187).

2.10. PREPARACION DE ENZIMAS

Homogenatos de hígado

Siguiendo la técnica de Moulé y col. (352) con algunas modificaciones, se prepararon microsomas de hígado de rata. A los animales ayunados 20-24 hs se les inyectó intraperitonealmente insulina (15-30 unidades) y se los dejó reposar 45-60 min. Se los sacrificó por decapitación y los hígados se cortaron a tijera y se homogeneizaron en un homogeneizador

Potter-Eveljheim.

El tampón helado utilizado contenía: Tris-Maleato pH 7.7 0.1 M; sacarosa 0.8 M y EDTA-Na 3 mM. Se eliminaron los desechos celulares por centrifugación a 7500 x g durante 10 min y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 x g durante 90-120 min. El precipitado rico en microsomas fue resuspendido en: Tris-Maleato a pH 7.7 0.1 M; EDTA-Na 0,3 mM; 2-mercaptoetanol 1 mM hasta una concentración final de proteína de 120-160 mg/ml. Se subdividió en tubos de 0,5 cc y se conservaron parte a -70°C (para usar 1 sola vez) y parte a -20°C (para usar varias veces).

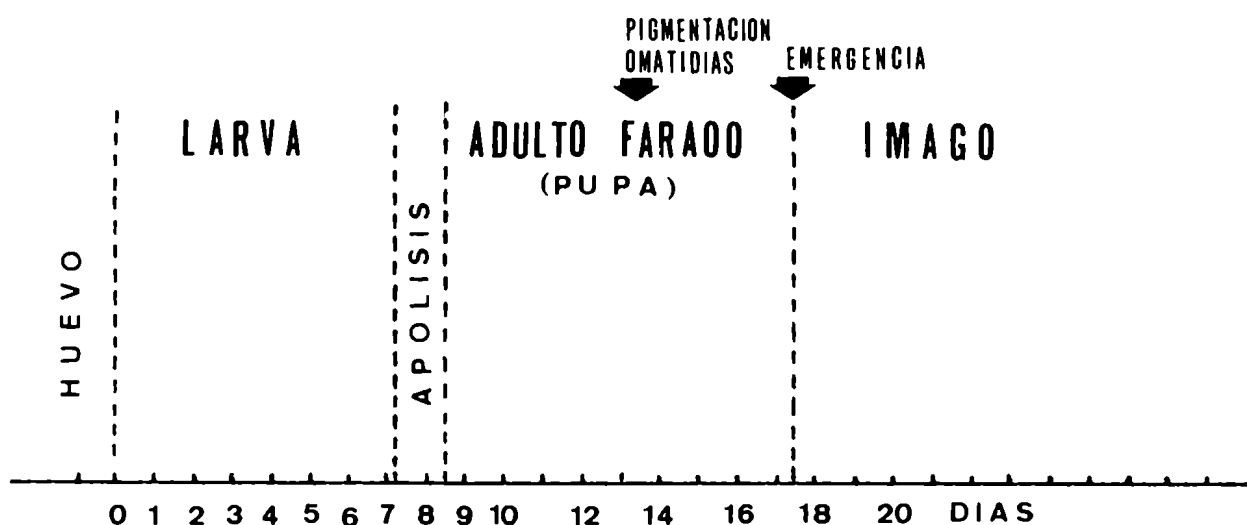
Homogenatos de insectos

Se han utilizado diferentes tipos de preparación enzimática, dependiendo de las necesidades. En las preparaciones de insectos grandes (Triatoma, Periplaneta) se realizaron disecciones para eliminar las fuentes de enzimas degradativas (cabeza, tórax, gónadas, sistema digestivo, Malpighi, etc.). Después de lo cual en algunos casos se los congeló mediante N_2 líquido o congeladora y en otros solamente se los enfrió a $1-4^{\circ}\text{C}$.

En el primer caso el material se molió en mortero de cerámica congelado (con o sin alúmina) o se lo rompió por impacto en una prensa ad hoc, mientras que en el último caso fueron disgregados en mini-licuadora Sorvall Omnimixer. Ambas preparaciones se homogeneizaron en homogeneizador de Potter-Eveljheim con émbolo de Teflon accionado a motor.

En la preparación de homogenatos de Ceratitis se utilizó el animal completo. En el caso de larvas se las lavó superficialmente con Ringer de insecto y se las homogeneizó en homogeneizador con émbolo de Teflon. Cuando se las congeló con N_2 líquido, primero se redujo a polvo en mortero.

FIGURA 20 : Ciclo de vida de Ceratitis capitata



La determinación de edad de las larvas se basó en el calendario de eventos del ciclo de desarrollo (Figura 20) (ver página anterior) y por observación bajo lupa binocular. Para determinar el desarrollo de las pupas fue necesario eliminar la teca oscura y observar bajo lupa ya que en este período la variabilidad es mayor y muy dependiente de la temperatura y humedad ambiental (210). En la mayoría de los experimentos se obtuvieron mejores actividades enzimáticas con adultos farados sacrificados en el momento en que aparece la pigmentación en las ommatidias. Una vez determinada la edad, se siguieron dos procedimientos alternativos: para pequeñas cantidades de insectos se los lavó exhaustivamente con Ringer y se los congeló con N_2 líquido, se eliminaron las tecas con flujo de aire y los insectos se redujeron a polvo en mortero o por impacto y se homogeneizaron en homogeneizador de Potter-Eveljheim. Para grandes cantidades, se lavaron las pupas con $MgCl_2$ 4 mM en H_2O destilada (en vez de solución fisiológica) y después de secarlas entre papeles de filtro, se las procesó en el Omnimixer durante 40 sec. a máxima velocidad. En general, se las re-homogeneizó en homogeneizador de Potter. Los tampones de homogeneización más usuales se detallan en la Tabla 26. En experimentos en que la posible contaminación externa podía interferir, las

TABLA 26: Soluciones tampón para homogenizaciones de insectos

H_1	TRIS-HCl (pH entre 7.6 y 7.8)	40-50 mM
	$MgCl_2$ (optativo)	4- 5 mM
	EDTA.Na	1 mM
	2-mercaptoetanol	3- 4 mM
H_2	Los anteriores mas:	
	Sacarosa	250 mM
H_3	Igual a H_2 , pero se utilizó Tris-Maleato pH 7,4 en lugar del Tris-HCl	

Se han utilizado pequeñas variantes de éstas soluciones (Ver pág.57).

En gran número de experimentos se han adicionado pequeñas cantidades de sustancias anti-oxidantes (α -tocoferol, BHT, etc).

pupas se trataron con hipoclorito de Na al 0,1 - 1 % . En todos los casos se incorporó al tampón un antioxidante, generalmente BHA : (2 (3) Tert-butyl-4-hidroxi-anisol, mezcla de isómeros) . Se utilizó a veces α -tocoferol como antioxidante, con excelente resultado; lamentablemente el vehículo (aceite de oliva) produjo inhibición en algunas glicosil transferasas.

Fraccionamiento

El método de preparación de fracciones ricas en vesículas microsomales se basó en el descrito por Porter y Jaworski (353), con modificaciones. Todas las operaciones se llevaron a cabo en frío (1-4 ° C). Los homogenatos se centrifugaron durante 10 min a 2000 x g en centrífuga refrigerada. El precipitado volvió a resuspenderse en el tampón de homogeneización y se repitió la centrifugación. Estos precipitados contienen fundamentalmente las células intactas y las membranas plasmáticas . Se juntaron los sobrenadantes, y se los centrifugó a 10000 x g por 15 min. En esta fracción se obtienen los núcleos y mitocondrias con algunos microsomas. El sobrenadante fue separado del tapón lipídico, y centrifugado a 140.000 x g durante 90 min.

La fracción precipitada contiene habitualmente restos de mitocondrias, casi todos los microsomas rugosos y lisos y el complejo de Golgi.

Esta fracción enriquecida en microsomas no puede asimilarse a una preparación "purificada" de microsomas, según los métodos de centrifugaciones en gradiente (354), pero tiene la ventaja de la rapidez y la poca manipulación. A lo largo del trabajo se la denomina "extracto (o preparación) microsomal".

Se la resuspendió en el tampón de homogeneización, generalmente sin sacarosa, a una concentración de proteína entre 120 y 200 mg/ml, y se guardó en fracciones de 0,5 ml en congeladora a -70° C .

2.11. MEZCLAS PARA INCUBACIONES " IN VITRO "

Se han utilizado muy diferentes condiciones de incubación dependiendo de la actividad enzimática que se deseaba detectar. Como regla general, las enzimas presentes en preparaciones microsomales necesitan la adición de detergentes cuando son suplementadas con lípidos exógenos. Las enzimas que transfieren monosacáridos del nucleótido derivado al poliprenil necesitan cationes divalentes y son inhibidas por EDTA. Las poliprenil-oligosacárido transferasas pueden o no precisar cationes.

En general, el trazador radioactivo junto con las sales y los lípidos exógenos se llevaron a seco con flujo de N₂ en el tubo de reacción y después se añadieron los restantes componenu

tes. Las incubaciones, a 25° C generalmente, se iniciaron con el añadido de la preparación microsomal. Al inicio y a la mitad de la incubación se agitó fuertemente para homogeneizar la mezcla. Al término de la incubación, generalmente entre 20 y 60 min, se la interrumpió por desnaturalización de la proteína con 1 ml de cloroformo/metanol 3:2 .

En la Tabla 27 se indican las mezclas de incubación más utilizadas.

TABLA 27 : Principales mezclas de incubación utilizadas

a) Biosíntesis de doliquil monosacáridos

Tris-HCl	pH = 7,8	0,1 M
2 - mercaptoetanol		80 mM
MgCl ₂		20 mM
EDTA ²⁻ -Na		3 mM
Deoxicolato-Na	0,5 % o Tritón X-100	0,25 %
Dol-P		10 - 30 nanomoles / 50 ul en P lábil
UDP-GlcNAc		40 μM (10 ⁵ cpm) ó
UDP-Glc		6-10 μ M (0.8 - 1.2 x 10 ⁵ cpm)

Para la formación de Dol-P-Man se utilizó la misma mezcla

b) Formación de lípido-oligosacárido-(glucosa)

Tris-Maleato	pH = 8.0	0.1 M
2 - mercaptoetanol		60 mM
MgAcetato ₂		20 mM
EDTA-Na ²		4 mM
UDP-Glc		6-10 μ M (80 - 120.000 cpm)

c) Formación de lípido-oligosacárido-(manosa)

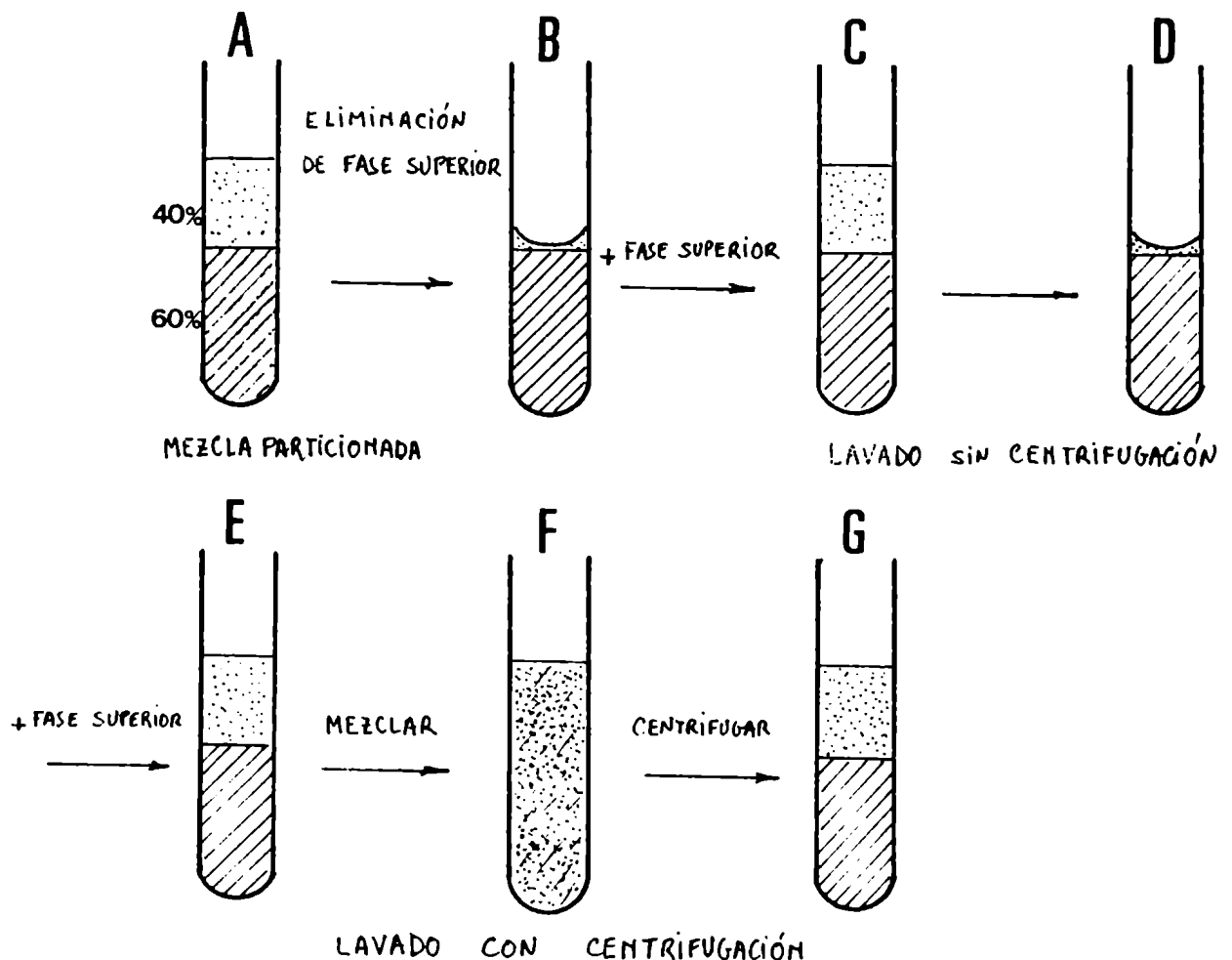
Tris-HCl	pH = 7.4	82 mM
2 - mercaptoetanol		80 mM
Tritón X -100		3,3 %
MgCl ₂		8,2 mM
EDTA ²⁻ Na		3,2 mM
GDP-Man		6.6 μ M (10 ⁵ cpm)
aceptores de insecto		

Otras mezclas de incubación se indicarán en la figura o tabla respectiva.

2.12. PROCESAMIENTO DE LOS INCUBADOS

Una vez interrumpida la reacción con la mezcla cloroformo/metanólica, se procesaron los incubados de acuerdo al método general de Folch y col. (355) de reparto en solventes, con algunas modificaciones introducidas en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas . Se separó el material insoluble del liposoluble por centrifugación y se lo re-extrajo con cloroformo/metanol 3:2 (1 ml). Se volvió a separar el material insoluble y se juntaron los sobrenadantes cloroformo/metanólicos de ambas extracciones (\approx 2.0 ml). Se añadieron 0.4 ml de $MgCl_2$ 4 mM con objeto de particionar en dos fases, la superior acuosa y la inferior orgánica. (Cuando la mezcla de incubación ya estaba excedida en sales, la partición se provocó con agua) (Figura 21 A).

FIGURA 21 : Lavados de la fase inferior de una partición realizada según el método de Folch y col. (355)



Para la aislación y lavados se siguió la técnica de Leloir (comunicación personal) :

- 1°) Después de centrifugar para separar las fases, se descartó la superior por succión, dejando un menisco para evitar turbulencias y pérdida de fase inferior (Figura 21, B).
- 2°) Se añade lentamente fase superior teórica (cloroformo/metanol/agua 3:48:47) hasta 40 % del volumen final, con objeto de diluir las sustancias acuosolubles remanentes en el menisco (Figura 21, C).
- 3°) Sin centrifugar, se elimina nuevamente la fase superior (Figura 21, D).
- 4°) Se repite el lavado sin centrifugar (pasos C - D).
- 5°) Se añade nuevamente fase superior teórica, manteniendo la proporción de 40 % del volumen final. Se agita vigorosamente y se centrifuga para separar las fases (Figura 21, E a G).
- 6°) Se repiten el lavado sin centrifugación (2 veces) (B - D).
- 7°) Se realiza una vez más el ciclo completo de lavados (E a G y luego B - D 2 veces).

Se obtuvo así una "fase inferior" limpia en la que habitualmente se encuentran glicolípidos y fosfolípidos de hasta mediana polaridad. Con esta fracción se extrajeron los poliprenil-fosfato-monosacáridos y los poliprenil-oligosacáridos de hasta 6-8 azúcares. En los lavados se arrastró menos del 5 % de estas últimas sustancias.

La proteína parcialmente deslipidificada se lavó exhaustivamente con la fase superior teórica, luego con metanol anhidro para secar, se evaporó ligeramente el metanol hasta casi sequedad, y se extrajo la proteína con el solvente de Leloir (143), cloroformo/metanol/agua 10:10:3 . Este solvente posee la propiedad de solubilizar materiales muy polares y cargados como los poliprenil pirofosfato oligosacáridos (146). Su empleo ha significado un importante avance técnico en lo relativo a la detección de dichas sustancias.

Como Lucas y Waechter (43) han hecho notar, es de presumir que en muchos estudios previos sobre biosíntesis de glicoproteínas, en los cuales éstas no han sido debidamente caracterizadas, se hayan cometido errores de interpretación en los datos. En efecto, los poliprenil oligosacáridos permanecen unidos a las porciones membranosas después de las extracciones "típicas" con cloroformo/metanol y los tratamientos con TCA.

Los residuos radiomarcados insolubles en el solvente de Leloir se procesaron por varios métodos, según las sustancias que se deseaban medir.

Los principales tratamientos se detallan en la Tabla 28 .

TABLA 28 : Medición de radioactividad en precipitados

A) Radioactividad en material "TCA insoluble"

- Se pasó el material insoluble en cloroformo/metanol/agua 10:10:3, secado ligeramente con N_2 y resuspendido en TCA 10 % frío, por filtro de papel de vidrio (Whatman GF/C). La evaporación por lo menos del cloroformo del solvente " 10:10:3 " es esencial para evitar que, con el ácido, se disuelva casi toda la proteína.
- Se lavó con TCA 5 % frío y con agua abundante.
- Se secaron los filtros bajo lámpara.
- Se contó la radioactividad usando 4 % de Omnifluor en tolueno como líquido centelleador.

B) Radioactividad en material "TCA caliente insoluble" (según Parodi, comunicación personal)

- Se resuspendió el material insoluble en solventes orgánicos, después de evaporar las trazas de éstos, en TCA 10 % (1 ml) .
- Se calentó 3-5 min a $100^\circ C$ en baño de agua con objeto de hidrolizar los posibles poliprenil derivados (especialmente oligosacáridos) contaminantes (145). Además, los eventuales remanentes de nucleótido-azúcar o azúcar-P lábil también se hidrolizan.
- Se eliminó el material soluble en TCA caliente y se lavó el insoluble con 1 cc de TCA 10 % frío (2 veces) .
- Se lavó con 1 cc de éter etílico.
- Se lavó con 1 cc de metanol.
- Se añadieron 200 μ l de protosol o soluol y se calentó 1 a 3 min a $100^\circ C$ (hasta clarificación de la suspensión) .
- Se añadió mezcla de Bray (356) como centelleador, neutralizando con 5 μ l de ácido acético concentrado para evitar la activación por el álcali .

En caso de quererse preservar la muestra, después de los lavados con metanol, se filtró a través de filtro de Millipore o papel de vidrio y se contaron los filtros secos en Omnifluor 4 % en tolueno. Después se lavó el filtro varias veces con tolueno y se secó, pudiéndose recuperar la proteína.

C) Radioactividad en glucógeno o en quitina

- Para medir radioactividad en glucógeno se siguió el método de Krisman (372).
- La radioactividad en quitina se midió por el método de Keller y Cabib (357) utilizando precipitados resuspendidos en etanol 66 % . Como métodos alternativos se utilizaron los de Porter y Jaworski (353) y de McMurrough y Bartnicki-García (358).

2.13. DEGRADACION QUIMICA Y ENZIMATICA

2.13.1. Tratamientos con ácido

- a) Suave: Para reconocer poliprenil - monofosfato-azúcares se los sometió a una hidrólisis a pH : 2.0 que cliva el enlace entre el fosfato proximal al azúcar y éste. Es una sensi-

bilidad al ácido típica, no conociéndose otros glicolípidos con esa labilidad. Si existe un enlace pirofosfato, el enlace entre el fosfato y el primer azúcar también se rompe.

Procedimiento: Se llevó a seco la muestra de glicolípido, en un tubo de 1 cm de diámetro, bajo flujo de nitrógeno a presión. Se añadieron 5 μ l de Timol azul como indicador y 5 μ l de butanol saturado de agua como emulsionante y se agitó intensamente en vibrador de tipo "vortex" con HCl 0,01 N, en un volumen final de 200 μ l. (La sonicación no mejoró las tasas de hidrólisis).

Se tomó el "rosado incipiente" del indicador como control del pH correcto (pH 2.0 \pm 0.2). El tubo se tapó con bolita de vidrio, se calentó a 99 \pm 1° C en baño de agua por el tiempo deseado y se interrumpió pasando a agua helada. Se añadió 1 ml de cloroformo/metanol 3:2 y se formó la partición de Folch (355). La fase superior contiene los productos hidrosolubles de la hidrólisis y la inferior el glicolípido remanente y los productos liposolubles.

Otros tratamientos alternativos : metanólisis con HCl 0.01 N en metanol 99 % o en metanol 50 % .

Se puede también hacer una hidrólisis con HCl 1 N en propanol 50 % durante 15 min a 50 °C pues es aproximadamente equivalente al tratamiento a pH 2 descrito arriba para derivados monofosfato azúcar.

b) Intermedia: Igual procedimiento que el anterior pero a pH 1.0 con HCl 0.1 M. La mayoría de los glicolípidos es resistente a este tratamiento por tiempos cortos. El dolicol fosfato también lo resiste.

c-e) Fuerte: Para la liberación de azúcares neutros y para romper oligosacáridos se usó:

c) 1 M SO_4H_2 , 6 horas, 100 °C (en ampolla sellada) (liberación de GlcN de quitina protegida en la cutícula)

d) 4 M HCl , 12 horas, 100 °C (en ampolla sellada) (liberación de monosacáridos de oligosacáridos y glicoproteínas)

Para hidrolizar esteril-glicósidos y otros glicósidos:

c) 3 N HCl , 3,5 horas , 100 °C (ampolla sellada)

f) Hidrólisis con fenol de poliprenil-azúcares: Se utilizó el procedimiento de García y col. (359). Se secó la muestra bajo chorro de N_2 y se la resuspendió con fuerte agitación en 200 μ l de fenol destilado al 50 % . Se calentó a 68 \pm 1 °C agitando ocasionalmente. Al término de la incubación se centrifugó para separar la fase fenólica de la acuosa y se lavó la primera con agua que se mezcló con la fase acuosa. Los restos de fenol

se eliminaron con éter etílico.

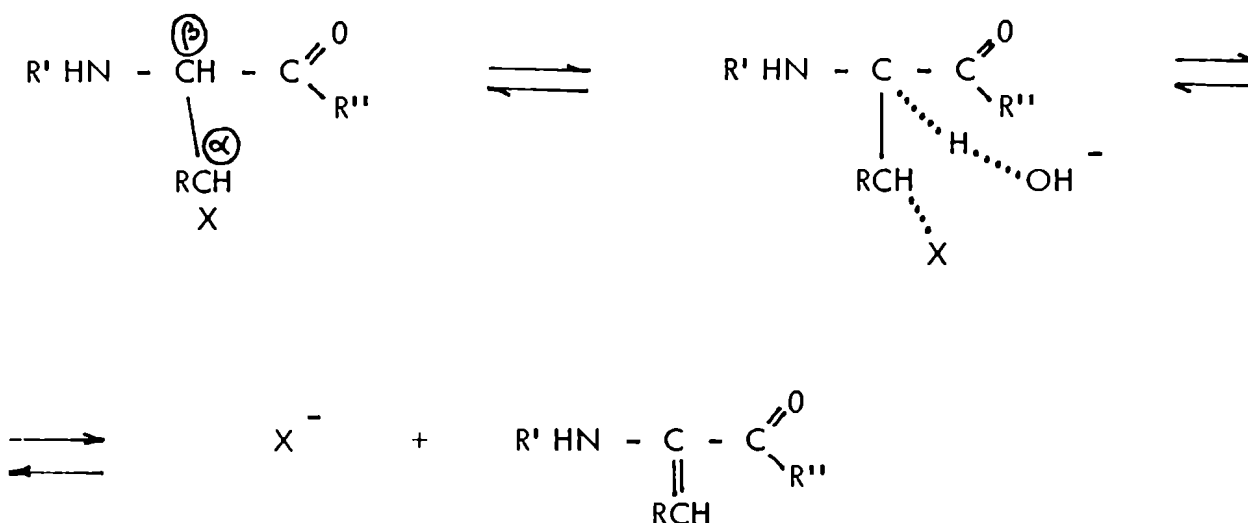
g) Metanólisis de azúcares: Se colocó la muestra en tubos de vidrio y se secó en desecador bajo KOH y P_2O_5 durante una noche. Se añadió HCl 1 M en metanol. Se sellaron los tubos bajo llama (cuando se sustituyó el aire por N_2 se utilizaron ampollas de vidrio, más fáciles de cerrar). Se incubó en estufa a $100^\circ C$ durante 6 hs. Se abrieron después de dejar 10 min a $0^\circ C$ y se evaporó el metanol-HCl bajo nitrógeno seco. Se resuspendió en metanol y se repitió 2-3 veces.

2.13.2. Tratamientos con álcali

a) Suave: (β -eliminación): Se utilizó el tratamiento con 0.05 a 0.1 M de NaOH a temperatura ambiente y por 18-24 hs. para clivar uniones péptido-carbohidrato en glicoproteínas de enlace O-glicosídico a serina o threonina (ver pág.35).

El mecanismo se puede representar por ^{las}reacciones de la Figura 22 .

FIGURA 22 : β -eliminación.



X puede ser GalNAc o Xyl, R es H en la serina o CH_3 en la threonina y R' y R'' son los aminoácidos vecinos de la cadena peptídica.

Para este tipo de reacción la notación β corresponde al carbono que usualmente es α en la nomenclatura de aminoácidos y viceversa.

b) Suave: (Saponificación de lípidos acompañantes y deacetilación de ésteres (NO para tratamiento de poliprenil azúcares))

- Se disolvieron los lípidos en 1 cc de cloroformo/ metanol 1:4.
- Se añadió 0.1 cc de NaOH 1 M.
- Se incubó 10 min a 37 ° C y se neutralizó con formiato de etilo o ácido acético.
- Se añadió cloroformo/metanol 9:1 , 2 cc y agua, 2 cc separando las capas acuosa y orgánica.

c-e) Tratamiento alcalino de poliprenil-azúcares

- c) 0,1 M NaOH en cloroformo/metanol/agua 6:4:1 por 10 min a 37° C . Los poliprenil monosacáridos son resistentes a este tratamiento.
- d) 0,1 M KOH en n-propanol por 30 min, a 64°C (Método de Parodi y col. (145)).
- e) 0.1 M NaOH en 50 % n-propanol por 90 min a 68 ° C . Los poliprenil monosacáridos se clivan a nivel del enlace ester entre fosfato y lípido. Se deacetilan parcialmente los glicolípidos que contienen NAcetil glucosamina.

f-h) Tratamiento de glicoproteínas

- f) 0.2 M NaOH a 100° C 2-4 hs.
- g) 1 M NaBH₄ + 1 M NaOH 100 ° C 4-6 hs. Con estos tratamientos se rompen uniones del tipo ⁴ASN-GlcNAc. El NaBH₄ se añade junto con el álcali para prevenir, que, una vez rota la unión ASN-GlcNAc por acción del álcali, prosiga la degradación del oligosacárido por el extremo reductor susceptible al álcali. El borohidruro reduce a alcohol estable (340) .
- h) 2 M NaOH 100°C , 12-18 hs. Este tratamiento permite detectar uniones que lo resisten, del tipo HYL-Gal, etc.

i) Tratamiento alcalino de oligosacáridos : Se redujo el oligosacárido con borohidruro de sodio (15 mg/ml) durante 1 hr a 21° C , para proteger el extremo reductor, llevando

a alcohol estable (ver arriba , g)). Se paró la reacción añadiendo resina de intercambio catiónico Dowex X-50 (forma H^+) para eliminar el borohidruro en exceso. El resto de los cationes se eliminaron pasando la muestra por una columna de 0.6 x 1.0 cm de la misma resina. Se llevó a seco bajo chorro de nitrógeno, se añadió metanol para eliminar el ácido bórico por evaporación, repitiéndose dos veces.

El material reducido se calentó a 100° C en 2 M KOH. La de-acetilación completa de las acetilhexosaminas se alcanzó a los 120-150 min.

2.13.3. Tratamientos mixtos

1) Desproteización de cutícula (generalmente para experimentos "in vivo")

Las condiciones son similares a las de numerosos autores. El ácido fórmico elimina pigmentos y otras sustancias que hacen la quitina más accesible a quitinasa.

- Se trató la muestra con NaOH 10% a 70° C durante 18 hs.
- Se lavó con agua destilada.
- Se resuspendió en ácido fórmico al 80% durante 1 hr.
- Se lavó con ácido fórmico 10% y se dejó 12 hs en el mismo.
- El residuo rico en quitina se lavó con etanol 95%.
- Se deshidrató con etanol absoluto.
- Se extrajo con eter etílico y se evaporó éste a sequedad.
- El residuo se consideró era la "quitina" habitualmente aceptada en la bibliografía.

2) Desproteización suave de cutícula (según Lipke y col. (271) con variantes)

- Se suspendió la muestra en ClNa 1% un día y se lavó.
- Se hirvió el residuo en etanol durante 10 min.
- El residuo resultante se extrajo con cloroformo/metanol 3:2.
- El residuo se lavó con Triton X-100 1% y luego intensamente con agua.

- Se hirvió en agua durante 20 min.
- Se trató el residuo con NaOH 0.1 N, 24 hs a 4°C.
- Se eliminó el NaOH y se resuspendió en ácido fórmico 20% durante 12 hs a temperatura ambiente.
- Se dializó contra agua y se liofilizó el residuo.

2.13.4. Degradaciones enzimáticas

- Pronasa o proteasa de Streptomyces griseus : las muestras se incubaron en 0,15 ml de Tampón Tris-maleato 100 mM a pH 7.5 y CaCl_2 8 mM; se añadió a las 0, 24, 48 hs 50 μl de solución enzimática de 20 mg/ml en un tampón Tris-maleato 100 mM a pH 7.7. En el caso de la pronasa debe pre-incubarse ésta para eliminar otras enzimas contaminantes (especialmente glicosidasas). Las incubaciones se llevaron a cabo en atmósfera de tolueno.
- La quitinasa comercial de Streptomyces se utilizó después de purificarla por el método de Cabib y Bowers (306). A pesar de ello no estuvo enteramente libre de quitobiasa. Se utilizaron también quitinasas de caracol terrestre y de otras fuentes, con abundante quitobiasa. En todos los casos la mezcla de incubación estuvo constituida por un tampón citrato 0.83 M/ fosfato disódico 0.66 M a un pH 5.3 y EDTA 0.8 mM en un volumen final de 100 μl , durante 48 hs a 21° C con agitación, bajo atmósfera de tolueno.

2.14. METODOS ANALITICOS

2.14.1. Análisis espectrofotométrico

Se realizaron en Coleman 2000 para mediciones de macromuestras de tipo rutinario y en diferentes modelos Gilford, con monocromador Beckman DU 2, para micromuestras.

- Fósforo : Para mediciones de fosfato (inorgánico y orgánico) se siguió el método de Fiske-Subbarow (360) con ligeras modificaciones. Para requerimientos de mayor sensibilidad, se midieron fosfatos por el método de Chen y col. (361) . En ambos métodos se mide la reducción del complejo fosfomolibdico a óxido molibdoso (azul de molibdeno) (660 nm) .
Para mediciones del orden del nanomol de fosfato se siguió el método de verde de malaquita de Chalvardjian y Rudnicki (362) modificado por Tábora (187) , con variantes: a 350 μ l de la muestra se le añadieron 50 μ l de molibdato de amonio al 2,5 % y 50 μ l de ácido sulfúrico 5 M. Se agitó fuertemente y se añadieron 50 μ l de Tween-20 al 1,5 % agitando suavemente y 50 μ l de verde de malaquita al 0,15 % . Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 660 nm. El fosfato total se dosó calentando a la llama la muestra seca con 70 μ l de ácido sulfúrico 5 N : ácido perclórico 70 % (5:2) hasta eliminación del perclórico. Se añadieron 300 μ l de agua y se calentó a 100° C durante 10 min y luego se siguió como arriba.
- Proteínas : Se estimó proteína en forma no destructiva por el método de Warburg y Christian (363) (midiendo la extinción a 260 nm y 280 nm y calculando el cociente para obtener el factor de corrección de la lectura a 280 nm) .
- Proteínas : Se dosaron proteínas en forma destructiva por el método de Lowry y col. (364) . La coloración se origina en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por la tirosina y triptofano sumado a la formación del complejo entre las sales de cobre y los N de la unión peptídica en medio alcalino (500 nm) . En general se utilizó albúmina bovina como patrón aunque en el caso de proteínas de insectos, la relación densidad óptica a peso seco de proteína es variable. Se observó que aumentó la coloración en muestras conteniendo fenoles (cutícula, hemolinfa, etc.) . El Tampón Tris-HCl, en cambio disminuyó la absorbancia.
- Azúcares reductores : Se utilizó el método de Somogyi-Nelson (365) con ligeras modificaciones. Los azúcares reductores, en medio alcalino, reducen las sales de Cu a hidróxido de Cu el cual reduce el reactivo arseno-molibdico dando azul de molibdeno (660 nm) . Se dosó también poder reductor por el método de Orcinol (366) (condensación de orcinol con el hidroximetil furfural (naranja 540 nm) .

- Azúcares totales : Se midieron por el método de Dubois y col. (367) de formación de furano-derivados en medio ácido (Método de fenol-sulfúrico) (amarillo-naranja 485 nm) .
- Amino azúcares y NAcetil amino azúcares : Para aminoazúcares se siguió el método de Elson Morgan (368) . Para acetilhexosaminas el método de Morgan y Elson (378) modificado por Reissig y Leloir (369) y Reissig y col. (370) . Estos trabajos mejoraron una modificación anterior de Aminoff y col. (384) . En medio alcalino se forma un intermediario cromógeno que reacciona con el p-diametil-amino-benzaldehido en medio ácido dando un color malva (585 nm) .
- Pentosas : Se midieron por el método de Orcinol (371) (complejos Orcinol-furfural, verde azulado 670 nm) .
- Glucógeno : Se midió con el reactivo de iodo, de acuerdo a Krisman (372) (amarillo pardo, 460 nm) .

2.14.2. Cromatografía y electroforesis

1) Cromatografía en papel

- Generalmente descendente, en papeles Whatman N° 1 o Schleicher y Schüll 2043 a .

Los solventes más utilizados fueron:

- A) 1-Butanol/piridina/agua (6:4:3) (383)
- B) Los mismos, en proporción (4:3:4) (384)
- C) idem (10:3:3) (también ascendente) (385)
- D) 2-Propanol/ácido acético glacial/ agua (27:4:9) (386)
- E) Etanol 95% / tampón acetato amonio pH 3.8 (7,5:3) (387)
- F) Etanol 95% / amoníaco conc. (7,5:3) (388)
- G) Agua/nitrometano/1-Propanol (3:2:5) (413)
- H) Agua/nitrometano/2-Propanol (3:2:5)
- I) 1-Butanol/piridina/ácido acético conc. (6:4:3) (389)

J) Cloroformo/metanol/agua (10:10:3) (usado también con papeles impregnados).

Para separar Glc de Gal o cualquiera de ellos de (GlcNAc)₂ y GalNAc de GlcNAc se impregnó Whatman 1 con tetraborato de Na y se cromatógrafió con el solvente A (390, 391). Para separar GlcN de GlcNAc se impregnó el papel en 0.1 n ZnSO₄ y se cromatógrafió con el solvente A (167). Al parecer el ión sulfato es el responsable de la separación (Leloir y Parodi, datos no publicados).

- Para cromatografía de sustancias lipofílicas se usaron papeles impregnados con ácido silícico (Whatman SG 81) tratados con EDTA (392) y el desarrollo se realizó en forma ascendente.

Los solventes más usados fueron :

K) Cloroformo/metanol/agua (60:35:6) (393)

L) Di-isobutil-cetona/ácido acético/agua (20:15 :2) (393)

2) Electroforesis con alto voltaje en papel

- Generalmente en Whatman Nos. 1 o 3, con enfriamiento por inmersión en tetracloruro de carbono (394). Las diferencias de potencial utilizadas fueron de 1000 a 1500 volt. , obteniéndose un campo promedio de 20 a 30 volt/cm en el papel.

Los tampones más utilizados fueron :

I) Acetato de piridina 1.4 mM a pH 6.5

II) Acido fórmico al 5%

III) Borato de sodio 0.03 M

3) Cromatografía en capa delgada

- Gel de sílice : Se utilizaron varios tipos de placas:

a) Para cromatografías de rutina y para fines preparativos y de purificación se confeccionaron cromatoplasmas de diferentes tamaños de Sílica gel tipo 60 y Sílica gel H, ambas de Merck, sobre base de vidrio (0.5 - 0.7 mm de espesor).

b) Como placas analíticas para sustancias radiomarcadas, se utilizaron placas de Sílica gel en base de plástico (Eastman 6061 o Schleicher y Schüll 355100) (0.25 mm de espesor).

- c) Cuando el revelado de las placas analíticas requirió el empleo de ácidos fuertes se utilizaron placas de Sílica gel sobre vidrio, comerciales (Merck 5721/0025) de 0.25 mm de espesor.
- d) Para microanálisis en capa fina, en bandas de 2 cm de ancho, se utilizaron, como sustituto de las placas confeccionadas manualmente con portaobjetos de microscopía (0.5 mm de espesor), placas con soporte de aluminio (0.25 mm de espesor) (Merck 5554/0025 - Kieselgel F 254). Estas placas llevan incorporado un amplificador de fluorescencia.
- Tierra de infusorios : (Kieselgur - Merck) : Se utilizó para propósitos especiales, como cromatografía en fase reversa o para mezclas con el gel de Sílice. Las cromatoplasmas se confeccionaron poco antes de su uso .
- Preparación de placas de sílice : Se utilizó el método general de Kates (395) . Las placas de vidrio entre 1 y 2 mm de espesor, se lavaron con detergente y se secaron por escurrimiento. En el momento del uso se limpió la superficie con cloroformo. Las proporciones utilizadas de polvo a agua fueron : 33/67 o 20/45 o 40/86 g/ml. Antes de cargar el aplicador de Gel (Desaga de Brinkman Instruments Inc.) se agita la mezcla fuertemente y se deja reposar 1 min. Las placas confeccionadas se secaron al aire y se cromatografiaron en metanol/ácido clorhídrico concentrado 9:1 para eliminar el hierro y otros metales pesados. Se secaron hasta eliminación del HCl. Para activarlas se las mantuvo entre 1 hs y 12 hs a 110-120° C.
- Elución de lípidos de cromatoplasmas de sílice :
- . Para lípidos no polares y lípidos polares neutros se utilizaron extracciones sucesivas con cloroformo/metanol/éter etílico (1:1:1) .
 - . Para lípidos polares neutros o ligeramente acídicos se utilizó cloroformo/metanol/agua (1:2:0.8) , o la mezcla solvente J .
 - . Para los lípidos polares acídicos se utilizó cloroformo/metanol/ HCl 0.2 N acuoso (se neutralizó con amoníaco 0.2 N en metanol y se lavó con el método de Folch) .
- Preparación de placas para cromatografía en fase invertida : Se prepararon placas de tierra de infusorios (Kieselgur) de 0.3 a 0.4 mm de espesor y se impregnaron con parafina líquida al 5 % en éter de petróleo (30-65 ° C) según el método de Stone y col. (396) . Los solventes usados fueron:
- M) Acetona/agua/parafina líquida (65:35:0,5) (fase inferior)
- N) 5 a 14 % agua en acetona, saturado con parafina.

- Principales solventes para cromatografía en sílice :

- O) 2-Propanol/ agua (7:3) (también 1-Propanol)
- P) Cloroformo/metanol/agua (65:25:4)
- Q) idem (60:25:4)
- R) Eter isopropílico/éter de petróleo (30° - 65°) (1:4)
- S) Cloroformo/metanol/ácido fórmico (70:10:1)
- T) Metanol/benceno (1: 99)
- U) Hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1)
- V) 2-Propanol/amoníaco/agua (6:3:1)

- Celulosa y PEI-celulosa : Se utilizaron placas comerciales con base plástica, como alternativa a la cromatografía en papel de sustancias hidrosolubles (placas: celulosa 6064 de Eastman y PEIOF de Baker and Co.).
El solvente usado fue:

Y) Acido isobutírico/amoníaco (5:3)

- Diseño de un solvente para cromatografía de poliprenil azúcares

Uno de los problemas que se presentaron al comienzo de esta Tesis fue la ausencia en la bibliografía de sistemas cómodos y rápidos de identificación y separación de poliprenil-azúcares con diferente largo en la cadena isoprenoide.

Se partió de la premisa de que la rapidez se lograría con un sistema de cromatografía de adsorción/partición en capa fina de gel de sílice.

Para el diseño del solvente no se tuvieron en cuenta los ya existentes para fosfolípidos y glicolípidos, intentando modificarlos, prefiriéndose en cambio el diseño basado en la serie mixotrópica de solventes.

Los requisitos que se buscó cumpliera el solvente fueron:

a) Sustancias liposolubles :

- 1) que los poliprenil azúcares cromatografiaran en una zona "típica" y de ser posible se separaran los derivados de bactoprenol de los derivados de dolicol .
- 2) que los lípidos neutros de cadena isoprenoide no migraran con el frente, con objeto de poder identificar al dolicol y otros isoprenoides.

3) que la mayor parte de las sustancias liposolubles se separaran netamente de las hidrosolubles.

b) Sustancias hidrosolubles

- 1) que migraran netamente separadas de los derivados de poliprenoles.
- 2) que se separaran entre sí los monosacáridos y oligosacáridos como los maltooligosacáridos.
- 3) que los nucleótidos-azúcar, azúcares fosfato, etc. permanecieran en el origen

El solvente que cumplió esos requisitos fue :

X Cloroformo/2-Propanol/Etanol/ácido acético 1 N (2:2:3:1)

En la Tabla 29 se encuentran las movilidades relativas de muchas de las sustancias analizadas en esta Tesis. Los ejemplos corresponden a desarrollos en cuba de vidrio, totalmente saturada, a temperaturas entre 19° C y 22° C, en cromatoplasmas de sílica gel comercial de 20 x 20 (ver Materiales) con origen a 2,5 cm y frente a 3,5 cm de los bordes. Previamente lavadas por cromatografía en metanol - HCl (9:1)

TABLA 29: Movilidad cromatográfica de diferentes sustancias en el Solvente X y similares.

	R_{fs}			
	X_a (EtOH 96%)	X_b (EtOH abs)	(1)	(2)
Colesterol	.76			
β -sitosterol	.74			
Escualeno		.83		
<u>Dolicol</u>		.35		
Cerebrósidos	.77	.66		
hDol-P-Glc	.65	.79	.78	.71
iDol-P-Glc	.62	.75	.78	.70
hDol-P-Man	.54	.71		
iDol-P-Man	.54	.70		
Fic-P-Glc	.55		.76	.65
Fic-P-Gal	.50	.68	.75	.62
Dol-P-P-Oligosacáridos (3-4)		.44		
Glc	.35	.34	.38	.21
Man	.42	.39		
GlcNAc		.35		
GlcN	.19	.22	.24	.27
Trehalosa	.17	.20		
Rafinosa		.11		
Maltosa	.17	.20		
Maltotriosa	.12	.13		
Maltotetraosa	.07	.08		
GlcUA		.05		
Hexosas fostato	.00	.01	.02	
Nucleotidos-azúcares	.02	.02	.07	.03

Variante (1): Cloroformo/2-propanol/Etanol absoluto/Agua=(1:2:2:1)

(2): " / " / " / Amoníaco(2:4:5:3)

Las movilidades indicadas en la Tabla son el promedio de numerosas cromatografías, para cada sustancia, en las mismas condiciones de trabajo. Por ello, en una cromatografía aislada, las relaciones de movilidad entre sustancias pueden variar ligeramente. Por otra parte numerosos parámetros hacen variar, en forma independiente, las sustancias hidrofílicas y las lipofílicas = La falta de saturación de la cuba adelanta los lípidos; la temperatura aumenta la movilidad de todas las sustancias y varía las relaciones entre ellas. Muy ligeros aumentos del agua aumentan movilidad de azúcares. La presencia de distintos tipos de "binder"(yeso, etc) ocasiona variaciones.

Etcétera.

4) Cromatografía de adsorción en ácido silícico

Se utilizó unisil (Clarkson Chem Co.) 100-200 mes h que se activó cada vez a 120°C durante las 12 hs previas a la cromatografía. Generalmente se utilizaron columnas de 1.0 x 12.0 cm que se armaron con el ácido silícico suspendido en cloroformo destilado. Después de colocar la muestra las columnas se eluyeron habitualmente con 10 volúmenes de cloroformo, 5 de cloroformo/acetona (1: 1) , 10 de acetona y 15 de cloroformo/metanol/agua (10:10:3).

5) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE- celulosa

Se utilizó DEAE-celulosa comercial preparada para cromatografía de lípidos según el método general descrito por Rouser y col. (397) con pequeñas variaciones. Se suspendió la resina en 1 N HCl y se filtró por embudo de Buchner utilizando tela de queso como filtro (la succión se hace con bomba de agua). Se lavó hasta el pH del agua destilada y se añadió sucesivamente:

- KOH 0.1 N
- Agua destilada hasta alcanzar el pH de la misma (pH : 5,5)
- Se repitieron los 2 fases anteriores 2 veces más.
- Se secó la resina al aire y se la resuspendió en ácido acético glacial durante una noche para convertir la resina a la forma acetato.
- Se lavó en embudo Buchner con metanol 99 % , hasta neutralidad y se guardó con abundante metanol 99 % en frasco color caramelo hasta el uso. En general las columnas se armaron con la DEAE suspendida en metanol 99 % y luego se pasaron al solvente deseado.
- Columnas microanalíticas: Se utilizaron columnitas de 0.6 x 1-3 cm de alto equilibradas con cloroformo/metanol 2:1 o cloroformo/metanol/agua 10:10:3. Este tipo de columnas permiten rápidas purificaciones de poliprenil derivados (136,143) . En la Tabla 30 se indica el comportamiento habitual de estas sustancias .

TABLA 30 : Columnas microanalíticas de DEAE-celulosa (Ver 143)

a) Columna microanalítica equilibrada con cloroformo/metanol 2:1

- Percolado C/M 2:1 (10 vol de columna)	Colesterol, dolicol
- Gradiente escalonado de acetato de amonio en C/M 2:1 (10 vol de columna de c/u) 10 - 30 mM	-
- 40 - 55 mM	Poliprenil-P-Monosacáridos Poliprenil-P (parte)
- 60 - 100 mM	Poliprenil-P (parte) Poliprenil-P-P-GlcNAc Poliprenil-P-P-oligosacáridos
- más de 100 mM	Poliprenil-P-P-oligosacáridos muy polares

b) Columna microanalítica equilibrada con cloroformo/metanol/agua 10:10:3

- Percolado C/M/H ₂ O 10:10:3 más lavado con el mismo solvente (10 vol de columna)	Poliprenil-P-Monosacáridos (probablemente debido a sales residuales)
Formiato de amonio en C/M/H ₂ O 10:10:3 (10 vol de columna c/u)	
- 3 mM a 5 mM	Poliprenil-P-Monosacárido (restos) Poliprenil-P-P-GlcNAc Poliprenil-P Poliprenil-P-P-oligosacárido
- 12 mM	Poliprenil-P-P-oligosacáridos (restos)

Cuando la presencia de lípidos no cargados lo hizo necesario, se combinaron los dos tipos de columna pasando a eluir las sustancias pegadas a la columna con cloroformo/metanol 2:1 , con el mismo solvente en proporción 1:1 y luego pasando a cloroformo/metanol/agua 10:10:3 .

- Columnas analíticas:

- . Columna de 1.2 x 40 cm con DEAE-celulosa equilibrada con metanol 99% y a la cual se aplicó un gradiente de concentración de acetato de amonio en metanol 99% entre 0 y 200 o 400 mM. Habitualmente se tomaron fracciones de 1,5 a 3,0 cc.
- . Columnas de 1.0 x 30 cm que se armaron con DEAE en metanol 99% y luego se equilibraron con cloroformo/metanol 2:1 .
Se pasaron : cloroformo/metanol 2:1 10 volúmenes
idem 1:1 5 volúmenes
cloroformo/metanol/agua 10:10:3 10 volúmenes
En este punto se pasaron gradientes continuos o discontinuos de formiato (o acetato) de amonio en C/M/H₂O 10:10:3 desde 0 hasta 100-200 mM . Se tomaron fracciones de 1.0 a 1.5 cc.

- Columnas preparativas: Variaron según la disponibilidad de material. En general se usaron dos tipos : de 2,5 x 30 cm de alto y de 4,6 x 55-60 cm de alto. Se utilizó el mismo diseño de elución que en las analíticas y se verificó que para eluir los poliprenil derivados se precisó mayor concentración salina que en éstas.

6) Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó en geles cilíndricos según la técnica de Fairbanks (414) durante 8 hs, estableciéndose un campo eléctrico promedio de 10 V/cm. El pH del tampón para el armado fue de 8,3 y se desarrolló la electroforesis a un pH de 9,5 .

2.14.3. Identificación en cromatografía y electroforesis

1) Reveladores generales

- Sustancias reductoras, con el reactivo de nitrato de plata alcalino (379) y sus modificaciones (382) .
- Fosfatos: En papel con el reactivo de molibdato (380) y en capa fina con el de verde de malaquita (362) , con las modificaciones de Tábora (187) .
- Aminoácidos y péptidos con ninhidrina (376 , 381) y proteínas con azul coomassie (376) .
- Nucleósidos y nucleótidos se visualizaron bajo luz ultravioleta .

2) Teñido de geles de poliacrilamida

Se utilizó azul de coomassie, según la técnica de Fairbanks (414).

3) Radioactividad

Las sustancias radiomarcadas se localizaron mediante un radiocromatógrafo Packard, modelo 7201 .

En otros casos se realizaron autoradiografías utilizando placas radiográficas estándar reveladas según recomendaciones de los respectivos fabricantes y, eventualmente, se realizó la impresión de la imagen positiva en papel fotográfico.

También se cortaron los cromatogramas (papel o capa fina flexible) o se eluyó la sustancia (papel, sílice, celulosa) o se raspó el soporte (sílice) y se contó la muestra en centelleador líquido.

4) Revelado de lípidos en capa delgada y papel

a) Reveladores inespecíficos

- Iodo : La placa se sometió (en un desecador o cuba de vidrio estancos) a vapores de iodo. Todo enlace insaturado fija al iodo, por lo que el revelado es inespecífico. Los lípidos saturados también disuelven iodo, pero la coloración es menos intensa. Para establecer la intensidad del teñido conviene mirar bajo luz ultravioleta. Un procedimiento que se usó frecuentemente fue dirigir los vapores de iodo (mediante cristales en una pisseta con intermediario para soplar) a zonas limitadas del cromatograma. Esto resultó de gran utilidad para revelar únicamente estándares o revelar superficialmente placas con base plástica.
- Rhodamina 6 B : se utilizó preferentemente para revelar en papel. Se prepararon soluciones entre 1 y 10 % en agua / etanol 1:1 y se pulverizaron sobre el cromatograma. Se analizaron bajo lámpara ultravioleta en mojado y en seco.
- Rhodamina 6 G : Es mucho más sensible que la Rhodamina B. Se utilizó una solución Stock de Rhodamina 6 G al 0.12 % en agua destilada (estable a la oscuridad). En el momento de usar se preparó una solución de 0.0012 a 0.0020 % diluyendo con agua/etanol 6:4.
Se sumergió el papel durante 3 min moviendo.
Se lavó con agua destilada para eliminar el exceso.
Se miró bajo luz ultravioleta; mientras está húmedo, los lípidos aparecen ligeramente fluorescentes. Los colores que se obtienen (variables según la pureza de la sustancia) son :

lípidos neutros

amarillo y naranja

ácido fosfatídico fosfatidil inositol fosfatidilserina	azul violáceo
fosfatidil etanolamina	amarillo
fosfatidil colina	azul
dolicol	azul púrpura
vitamina A	púrpura

Cuando se utilizó capa delgada se pulverizó con solución diluida (0.0012 %) y no se lavó .

- Fluoresceina : Se utilizó una solución de 0.01 % P/V en etanol 66% . Los poliprenoles se ven amarillo-verdoso fluorescentes bajo lámpara de ultravioleta. Otros lípidos neutros son amarillos o naranja muy claro.
- Vainillina : Se la usó para revelar sustancias lipídicas conocidas, por ser económico. Se prepararon soluciones entre 0,5 y 1.0% en ácido sulfúrico conc./etanol 4:1 .
- Acido fosfomolibdico : Es un reactivo inespecífico pero que revela mejor fosfolípidos. Se prepara en el momento una solución entre 4.5 y 20 % (P/V) con la que se pulveriza la placa (o sumerge el papel) . (411)
Los fosfolípidos y glicolípidos se tiñen en azul intenso sobre fondo ligeramente amarillento cuando se calienta a 85 ° C . Llevando a 100-110° C aparecen otros lípidos teñidos pero aumenta el fondo.

b) Reveladores específicos

- α -Naftol : Para revelar glicolípidos se utilizó una solución de α - Naftol 0,5% en metanol/agua 1:1 . Se roció la placa hasta humectarla y se secó con aire frío forzado. Se pulverizó levemente (desde suficiente distancia) con ácido sulfúrico concentrado/agua 95:5. Se desarrolló el color entre 100 y 120 ° C. (371)

cerebrósidos	azul purpúreo
fosfolípidos (P-Etanolamina, P-serina)	amarillo
colesterol esteroles otros lípidos neutros	rojo grisáceo
dolicol	pardo rojizo

- Revelador de orcinol: Por acción del ácido sulfúrico en caliente, las hexosas se deshidratan produciendo α -hidroximetilfurfural (inestable) que se condensa con el 3,5-dihidrotolueno (orcinol) dando color.

Como revelador específico para glicolípidos, se utilizó el siguiente método:

Se preparó una solución de 200 mg de orcinol en 100 ml de ácido sulfúrico conc./ agua 3:1 (puede mantenerse en heladera y frasco oscuro por 15 días). Se roció suavemente la placa y se calentó a 90-100° C cuidando no pasarse de revelado. Los glicolípidos dan un color diferencial pardo violáceo o violeta virando a malva.

Se utilizaron otras variantes del método para medición de glicoproteínas solubles (375) (0.1 % orcinol en sulfúrido 4 mM en etanol) y de azúcares diversos (376) .

- Revelador de p. anisaldehido : ($\text{CH}_3 \text{O C}_6\text{H}_4\text{CHO}$) (4-Metoxi-Benzaldehido) : Por acción del ácido sulfúrico en caliente se obtienen coloraciones específicas para los poliprenoles y poliprenil derivados (377, 24). También los colores para ciertos azúcares son característicos .

Se preparó anisaldehido purísimo (Fluka) al 5% y SO_4H_2 para análisis (Merck) al 5% en etanol absoluto y se roció la cromatoplaaca varias veces muy levemente. Se calentó a 110-130° en estufa.

Para el reconocimiento de un lípido en el cromatograma se utilizaron siempre los siguientes parámetros, además de la posición:

1°) velocidad de revelado cuando se calentó la placa desde 80 a 120 ° C .

2°) color inicial del lípido revelado (bajo luz natural y ultravioleta).

3°) color revelado a 120°C .

4°) color "de retorno" cuando se enfrió la placa (luz natural y ultravioleta).

5°) color final cuando se quemó la placa a 130-140 ° C .

La observación permitió distinguir lípidos con revelados finales idénticos pero con diferencias en las etapas 1 a 4 .

Los colores variaron según la pureza de las sustancias y la velocidad de revelado. Fueron diferentes cuando la cromatoplaaca fue previamente expuesta a vapores de iodo. Por ello, la identificación por color sólo es válida comparando en una misma placa y no de placa a placa. Las indicaciones de la bibliografía son escasas (377, 376) y frecuentemente diferentes de lo que se obtiene con anisaldehido comercial.

A lo largo de la presente Tesis se logró estandarizar aceptablemente las coloraciones con anisaldehido . (Tabla 31) .

TABLA 31 : Ejemplo de coloraciones obtenidas en revelados estándar^a con anisaldehido/SO₄H₂

<u>Sustancia</u>	<u>Color inicial^b</u>	<u>Color final^c</u>
nerolidol	violeta	verde grisáceo
fitol	violeta	azul oscuro
fitosterol	azul	verde esmeralda
geraniol	azul	azul oscuro
geraniol-geraniol	rosa solferino	violeta
citronelol	rojo	violeta
escualeno	pardo	violeta
linalool	granate	pardo oscuro
<u>dolicol de hígado</u>	verde hoja	verde oscuro
colesterol y esteroides	verde azulado	azul de prusia
cerebrósidos (mezcla)	azul verdoso	violáceo
ceramida-glucosa	pardo	pardo oscuro
ácido fosfatídico	ocre	pardo rojizo
ácidos grasos	verde hoja	verde hoja
glucosa	verde	verde
acetil glucosamina	ocre claro	pardo anaranjado
maltooligosacáridos	verde	verde
quito-oligosacáridos	ocre claro	ocre
glucosamina	pardo verdoso	pardo

ácido glucurónico ^d	naranja	verde
ácido neuramínico ^d	salmón	borravino a violeta

- a) Placas rociadas a 70 cm de distancia sin que lleguen a impregnarse totalmente
- b) Color de aparición de la sustancia
- c) Color a 130-140° C
- d) Revelado sumamente específico, muy útil para distinguir ambos ácidos, de similar movilidad en numerosos solventes.

2.15. Nota sobre los Materiales y Métodos utilizados

La forma en que se desarrollan las actividades de investigación en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas hace que exista entre sus miembros un continuo intercambio de drogas, preparaciones de todo tipo e información (bibliografía, técnicas). Por ello sería largo particularizar toda la ayuda recibida, que se agradeció globalmente en la sección correspondiente. Quiero destacar aquí, sin embargo, las repetidas donaciones recibidas de: N.H. Behrens, J. Martín-Barrientos y A.J. Parodi (dolicol y doliquil-fosfato); E. Tábor y P.A. Romero (ficaprenol y ficaprenil-derivados).

3. RESULTADOS

Los estudios realizados en el transcurso del presente trabajo de Tesis tomaron como punto de partida el trabajo de Licenciatura sobre Síntesis de Quitina en Insectos (164). En el mismo se obtuvo la evidencia de la formación de un acetilglucosaminil derivado de un poliprenol endógeno.

Al inicio de los presentes trabajos se desconocía la existencia en insectos de poliprenoles de cadena larga como los encontrados en bacterias y mamíferos. Por ello, los estudios se desarrollaron en forma paralela, caracterizando tanto la actividad de las glicosil transferasas como los sustratos lipídicos endógenos que las mismas utilizaban.

Una vez detectados el dolicol y el dolicol fosfato presentes en los extractos lipídicos de insecto y estudiada la biosíntesis de los principales poliprenil-monosacáridos, pudo encararse la de los lipo-oligosacáridos. Las sustancias obtenidas fueron ensayadas como sustratos de nuevas reacciones. Asimismo se estudiaron posibles factores de regulación a lo largo del ciclo de vida y enzimas-clave como la quinasa de dolicol descrita en el capítulo 3.8, primera de este tipo detectada en eucariotes.

Se describen los resultados obtenidos en orden de complicación creciente tratando de que la información necesaria para la comprensión de cada capítulo esté contenido en los precedentes.

3.1. EXISTENCIA EN INSECTOS DE DOLICOL LIBRE Y DE DOLICOL FOSFATO

La detección en los extractos lipídicos de insecto del dolicol artropodiano y de sus derivados metabólicamente activos fue la consecuencia inmediata del descubrimiento en Triatoma infestans de la GlcNAc-poliprenil transferasa, mediante el uso de trazador radioactivo (capítulo 3.3 y Ref. (164)).

Ante la evidencia de que extractos butanólicos o cloroformo/metanólicos de insectos incrementaban la síntesis de poliprenil derivados, se estudiaron sistemáticamente las propiedades de la sustancia estimuladora.

3.1.1. Evidencias de que el lípido de insecto aceptor de monosacáridos se comportó como doliquil fosfato

Los extractos cloroformo/metanólicos de Ceratitis y Triatoma se utilizaron como estimuladores de la formación de poliprenil-monosacáridos catalizada por enzimas microsomales de hígado de rata (6). En la Tabla 32 se observa que se estimularon levemente tanto la

TABLE 32 : estimulación de la biosíntesis de Dol-P-azúcares y glicoproteínas, catalizada por microsomas de hígado, por extractos crudos de Ceratitis copitata

Sustratos		cpm incorporados a	
Hidrosoluble	Liposoluble	Fase inferior	Glicoproteínas
UDP- (14 C) Glc (6 μ M ; 10^5 cpm)	ENDOGENO	1.279	1.057
	DOL-P	3.686	6.444
	EXTRACTO DE <u>Ceratitis</u>	1.401	1.258
	DOL-P + EXTR. <u>Ceratitis</u>	3.308	4.206
UDP (14 C) GlcNAc (40 μ M ; $5,5 \times 10^4$ cpm)	ENDOGENO	177	00
	DOL-P	1.300	1.178
	EXTRACTO DE <u>Ceratitis</u>	682	498
	DOL-P + EXTR. <u>Ceratitis</u>	1.546	1.406

El extracto cloroformo/metanol 2:1 de Ceratitis es el extracto de partida en el Método B (página 59). El Dol-P corresponde a 24 nanomoles de fósforo total. La mezcla de incubación contenía : NaCl 12 mM ; EDTA , Na 2 mM ; Tampón Tris-Maleato 0.1 M a pH 7.4 ; 2 mercaptoetanol 0.1 M ; Tritón X-100 , 2 0.6 % en el caso de UDP-Glc o deoxicolato , Na , 0.3 % en el caso de UDP-GlcNAc. Enzima = 2 mg de proteína. Las incubaciones se realizaron a 30 ° C por 20 min. "Glicoproteínas" indica material radiomarcado insoluble en TCA caliente (Métodos).

síntesis de poliprenil-azúcares como la de glicoproteínas. Dichos extractos se purificaron en columnas de DEAE-celulosa y las fracciones, libres de sales, volvieron a dosarse mediante el ensayo con enzimas de hígado de rata, que se trató fueran pobres en doliquil fosfato endógeno. El material lipídico que emergió a la concentración salina de 50 mM estimuló la incorporación de glucosa al Dol -P-Glc y de GlcNAc a Dol-P-P-GlcNAc (Tabla 33) (Ver también Figura 25 y Tabla 35).

TABLA 33: PURIFICACION PARCIAL DEL LIPIDO ACEPTOR DE TRIAATOMA INFESTANS

ACEPTORES	cpm incorporadas en	
	Lípido-Glucosa	Lípido-GlcNAc
ENDOGENO	932	353
+ Dol-P	3.638	1.273
Eluatos de Columna		
+ 10 mM	1.079	377
+ 20 mM	820	364
+ 50 mM	2.596	723

Condiciones como las de la Tabla 32. Se utilizó una columna de DEAE-Celulosa de 1 x 20 cm.

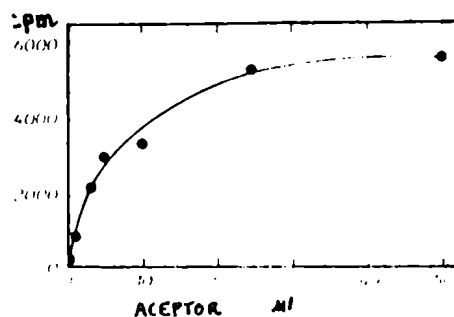
Se comprobó que la estimulación no fue debida a un efecto de detergente de los fosfolípidos contenidos en los eluatos de la columna de DEAE : en la Tabla 34 se observa que la estimulación debida a detergentes o a cardiolipina no pasó del 30% sobre la biosíntesis endógena. (Ver página siguiente)

Se dosó la capacidad estimuladora de los lípidos purificados de Ceratitis y de Triatoma comparada con la del dolicol fosfato preparado sintéticamente a partir de dolicol de hígado. En la Tabla 35 se aprecia que tanto la glucosil transferasa como la N-acetilglucosaminil transferasa de hígado de rata reconocieron los lípidos de insecto como sustratos.

TABLA 34: CONTROL DEL EFECTO "DETERGENTE"
EN LA FORMACION DEL DOL-P-Glc

	cpm incorporadas
ENDOGENO	1.260
+ Triton 0,1 %	1.571
+ Nandef P.40 0,1 %	1.602
+ Cardiolipina 0,1 %	1.643
+ Lípido <i>Triatoma</i> (Cruda)	1.708
+ Lípido <i>Triatoma</i> (Col. DEAE)	4.376

FIGURA 23 : Efecto de la concentración del Dol-P de insecto en la biosíntesis de Dol-P-Glc



Condiciones del ensayo como en Tabla 32. Cada microlitro del extracto que contiene Dol-P proviene de 100 mg de insecto vivo. El tiempo de incubación fue de 1 hora. Figura publicada en Quesada y col. (60).

TABLA 35 : Dosaje del aceptor de insecto purificado en columna de DEAE con Dol-P sintético como patrón

Adiciones.	UDP- ¹⁴ C glucosa		UDP- ¹⁴ C N-acetilglucosamina	
	Exp. I	Exp. II	Exp. I	Exp. II
	cpm		cpm	
ninguna	1705	220	325	35
Dol-P de <i>Ceratitis</i>	6120	9560	1350	540
Dol-P de <i>Triatoma</i>	4580	1280	950	250
Dol-P ^o	9023	13140	1220	1150

a) Se usaron 10 nanomoles de Dol-P sintético, en términos de fósforo total

Condiciones como en Tablas precedentes. En los experimentos I y II se utilizaron diferentes preparaciones enzimáticas (Tabla publicada en Quesada y col. (60))

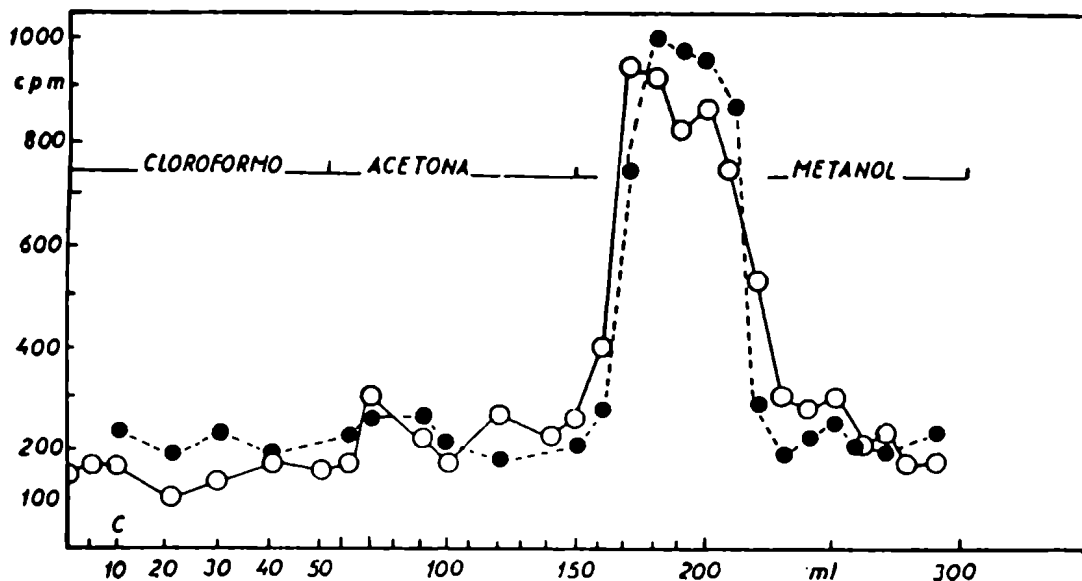
El efecto de la concentración de lípido de mosca en la síntesis del Dolicol-P-Glc se aprecia en la Figura 23 . (arriba)

3.1.2. Propiedades del lípido de insecto aceptor de monosacáridos

La naturaleza lipídica de la sustancia estimuladora de insecto parece evidente a partir de sus propiedades de solubilidad: es soluble en mezclas de cloroformo/metanol (3:2 / 2:1 / 1:1 / 5:2), en cloroformo/metanol/agua (10:10:3), etc. Es insoluble en soluciones acuosas. Cromatografiado en una columna de ácido silícico equilibrada con solventes poco polares, el glicolípido de insecto se adsorbió a la misma y permaneció retenido cuando se pasó por la columna cloroformo y acetona. Cuando se hizo pasar metanol la sustancia estimuladora eluyó junto con el Dol-P de hígado. En esta misma fracción eluyeron habitualmente los glicerofosfolípidos (Figura 24). El lípido de insecto fue retenido por columnas de resina de intercambio aniónico, como DEAE-celulosa forma acetato (Figura 25). Esta es la propiedad que se utilizó en el presente trabajo como método primario de purificación (ver también Tabla 33). De los datos de cromatografía en columna ya se pudo colegir que se estaba en presencia de un fosfolípido. Teniendo en cuenta que el extracto había sido previamente saponificado quedó descartada la posibilidad de que lípidos conteniendo ácidos grasos fueran receptores de glucosilos.

El comportamiento en cromatografía de capa fina del lípido de insecto y del dolicol monofosfato de hígado fue similar (Figura 26, a, b) y ambos cromatografiaron con ligeras diferencias a como lo hizo el ficaprenol de Ficus elástica fosforilado químicamente (Figura 26, c).

FIGURA 24 : Comportamiento del lípido de insecto aceptor de monosacáridos en cromatografía de adsorción de ácido silícico



Método ver página 82. ● --- ● Dol-P de hígado. ○ --- ○ Dol-P de Triatoma (fluoración 50 mM de columna DEAE. Ver Figura 25). En la figura se han superpuesto las eluciones sucesivas de ambas sustancias, en la misma columna. Dosaje: ver Métodos y Tabla 32.

TABLA 36 Tratamientos ácido y alcalino del aceptor de insecto.

A) Estimulación de la GlcNAc-transferasa de hígado.

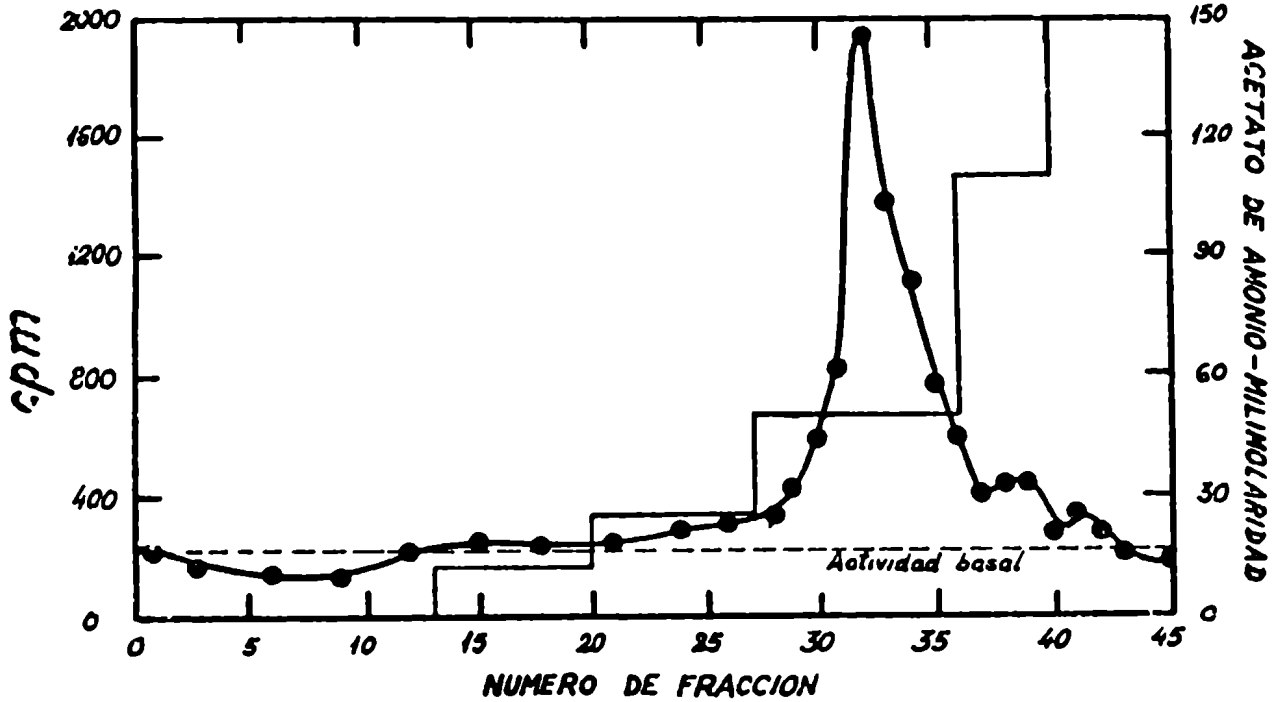
ACEPTORES	cpm incorporadas
ENDOGENO	556
+ Dol-P	1.131
+ Dol-P; H ⁺	1.100
+ Fic-P	712
+ Fic-P ; H ⁺	322
+ Extracto de <u>Triatoma</u>	634
+ Ext. de <u>Triatoma</u> ; H ⁺	595

Ensayos como en Tabla 32 (página 92). (A) H⁺ indica que antes del dosaje, el aceptor fue sometido a hidrólisis ácida (0.1 N 3 hs a 37 °C). Los extractos de Triatoma se refieren a elutos de columna de DEAE (Figura 25). (B) Se saponificó según el método C (página 72).

B) Estimulación de la Glc-transferasa de hígado.

ACEPTORES	TRATAMIENTO (cpm incorporadas)		
	NINGUNO	ACIDO	ALCALINO
Endógeno	1.202	-	-
+ Dol-P	7.284	8.270	4.607
+ Fic-P	2.071	1.115	-
+ Extracto <u>Triatoma</u>	4.460	4.533	2.775

FIGURA 25 : Comportamiento del lípido de insecto aceptor de monosacáridos en una columna de DFAC-celulosa



Ver Métodos . Los lípidos eluidos se dosaron como en Tabla 32 . Los sales se eliminaron por el método de página 66 (Falch / Leloir),

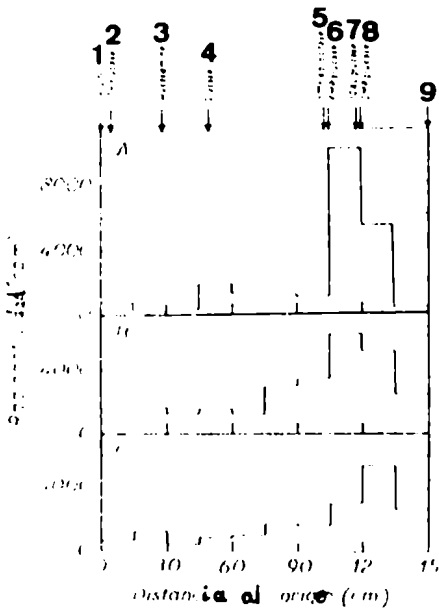


FIGURA 26 : Cromatografía en capa fina del lípido de insecto

A) Dol-P de hígado B) Lípido de insecto C) Fic-P (sintético). Los lípidos se cromatografiaron en cromatoplaques de Sílica gel pre-lavadas. Se las desarrolló con cloroformo/etanol absoluto/ ácido acético 1 N (10:15:4). Después se raspó la sílica, se extrajeron los lípidos con HCl 0.6 N en cloroformo/metanol (2:1) y se los dosó según se describió en Tabla 32 . 1 : origen . 2 : UDP-Glc . 3 : GlcN . 4 : Glc . 5 : Fic-P-Gal . 6 : Fic-P-Glc . 7 : Dol-P-Glc (hígado) . 8 : Dol-P-Glc (hígado) . 9 : Frente del cromatograma . Figura publicada en Quesada y col. (60) .

Por otra parte se trató el lípido de insecto con HCl (0,1 N durante 5 min a 100° C o 3 hs, a 37° C); al cabo de ambos tratamientos la actividad estimuladora permaneció incólume (Tabla 36). El dolicol fosfato se comportó en la misma forma.

Esta parece ser una característica de los poliprenoles monofosfato con la primer unidad isoprénica α -saturada (Dankert y Behrens , 20). Con los mismos tratamientos el ficaprenol monofosfato perdió el fosfato (359) y, por consiguiente, su capacidad aceptora de glicosilos (Tabla 36). Esta labilidad parece debida a su estructura alílica (20, 359).

Por otra parte, sometidos a un tratamiento alcalino suave, el Dol-P de hígado y el aceptor de insecto retuvieron gran parte de su capacidad estimuladora (Tabla 36, B). Esto coincide con el hecho de que el aceptor de insecto aparece siempre activo en la fracción no saponificable de los fosfolípidos.

Propiedades del aceptor de insecto glicosilado

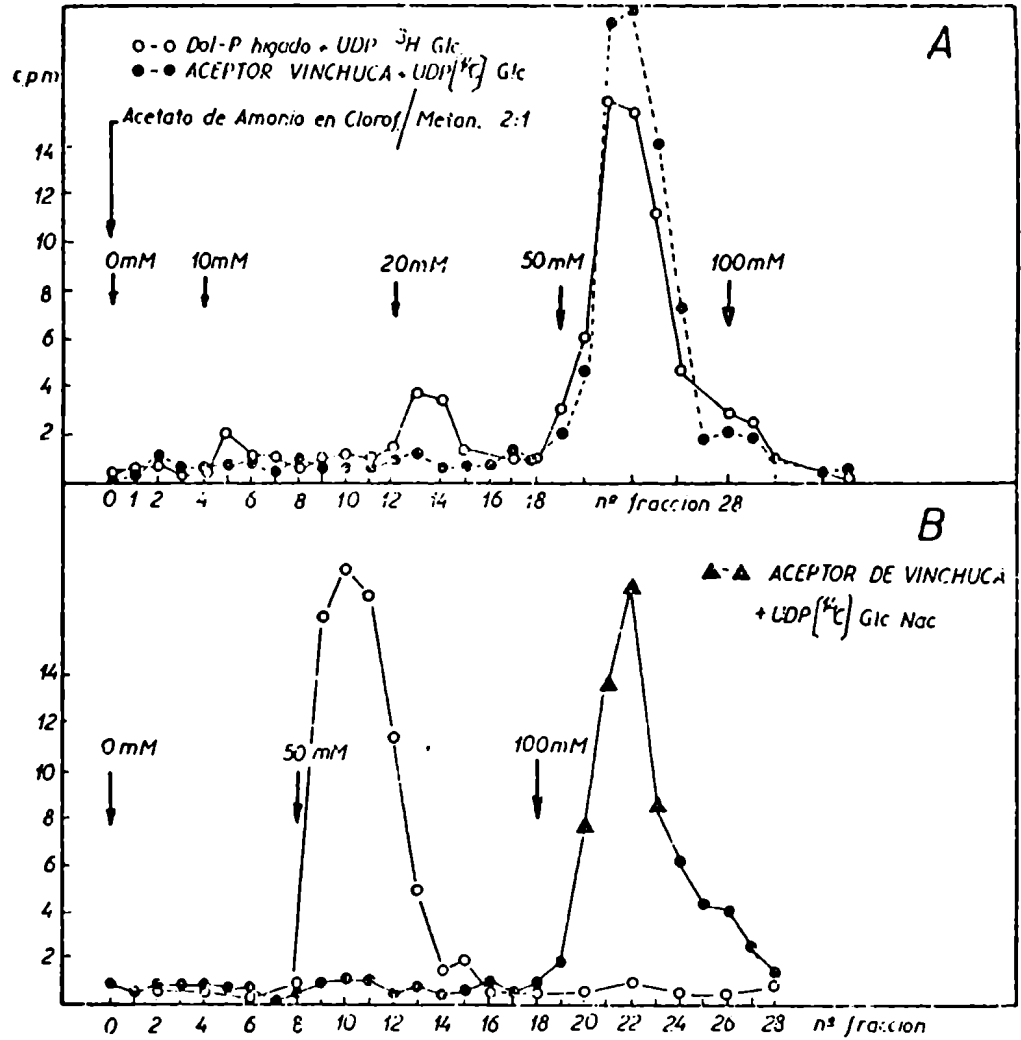
Se estudiaron los glicolípidos radioactivos obtenidos por incubación del lípido de insecto con las enzimas de hígado de rata: el producto radiomarcado con glucosa co-cromatografió en la columna de DEAE-celulosa con el Dolicol-P-Glc sintetizado a partir de Dolicol-P de hígado de cerdo y enzima de hígado de rata (Figura 27). Ambos emergieron de la columna a la concentración de 50 mM de acetato de amonio.

El producto radiomarcado con N-acetilglucosamina quedó retenido en la columna después de la elución del Dol-P-Glc de hígado, eluyendo a la concentración de 100 mM de acetato de amonio (Figura 27, B). El comportamiento de ambas sustancias es típico de los poliprenil derivados.

Cromatografiados en papel con diferentes solventes los glicolípidos se comportaron también como los poliprenil derivados de bacterias o de mamíferos. Las cromatografías en el solvente D permitieron excluir una posible unión no covalente entre el lípido y el azúcar radiomarcado.

FIGURA 27

Las cromatografías microanalíticas en DEAE-Celulosa se realizaron como se indicó en Métodos (página 82)
 (A) (o - o) Dol-P de hígado + UDP [³H] Glc. (o - - - o) idem aceptor de vinchuca + UDP [¹⁴C] Glc.
 (B) (▲ - ▲) idem aceptor de vinchuca + UDP [¹⁴C] GlcNac. 0 - 100 mM se refiere a las concentraciones de acetato de amonio en cloroformo/metanol (2:1)



El tratamiento ácido suave (0.1 N HCl a 100° C por 20 min) liberó la mayor parte de la radioactividad que se volvió hidrosoluble. La identidad de la sustancia liberada se comprobó por cromatografía en papel (Figura 28). Se ve que los azúcares continúan siendo los mismos entregados por los nucleótidos derivados.

El tratamiento del lípido-glucosa con 0.1 M NaOH liberó 1-6 anhidroglucosano como se observa en la Figura 29 . Este resultado es idéntico al obtenido por tratamiento alcalino

FIGURA 28 : Identificación de sustancias liberadas del lípido de insecto: A Lípido-Glc hidrolizado B Lípidos-azúcares sin hidrólisis (1) Lípido-Glc (2) Lípido-GlcNAc C Lípido-GlcNAc hidrolizado D idem, papel impregnado con 0.2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (390, 391). Solvente A. O: origen F: Frente

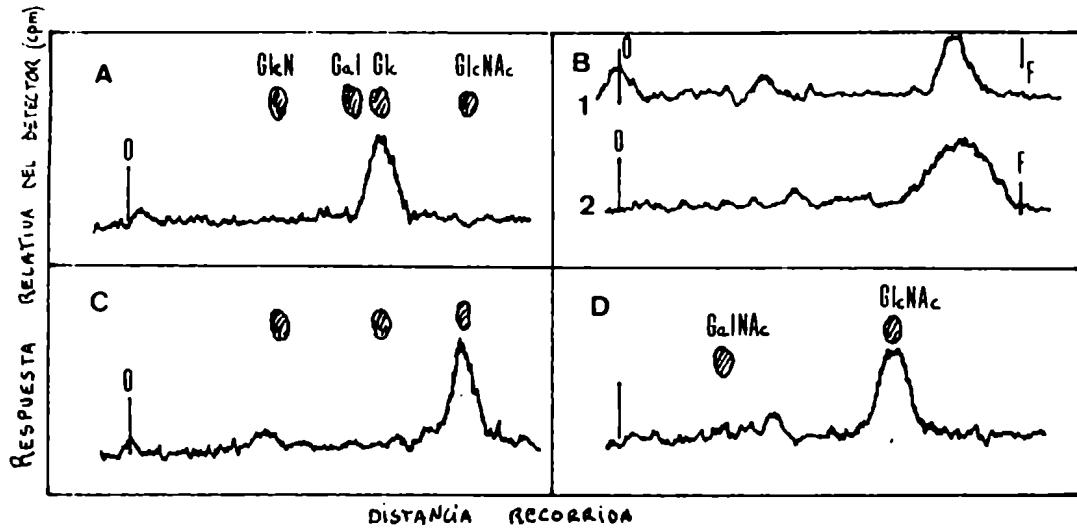
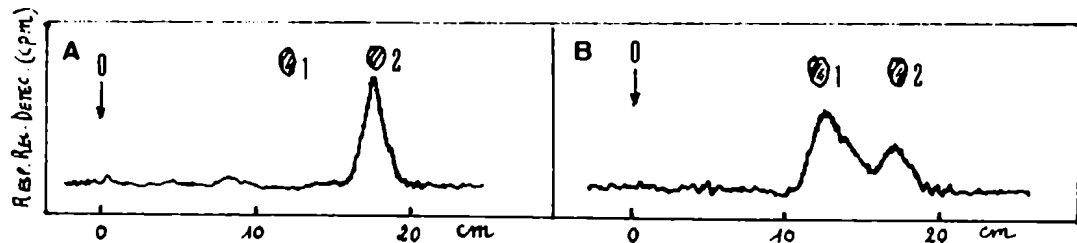


FIGURA 29 : Tratamiento alcalino del Lip- ^{14}C Glc



(A) Se sometió el glucolípido al tratamiento e (página 72) y se cromatógrafió el producto hidrosoluble en papel con el solvente E. (B) Se eluyó el pico radioactivo de (A) y se trató con H_2SO_4 0,05 N a 100°C por 2 hs y cromatógrafió en el mismo sistema. (1): Glc (2): 1,6-anhidroglucosano (0): origen

del Dol-P-Glc y sugiere, además, que la posición del fosfato en la glucosa es β con respecto al C_6 . Cuando se aplicó el mismo tratamiento al lípido GlcNAc y se hizo una electroforesis a pH neutro, se detectaron dos picos cargados negativamente, Uno de ellos se comportó como Glc-NAc-fosfato (Pico 1 de la Figura 30). Se eluyó este pico del

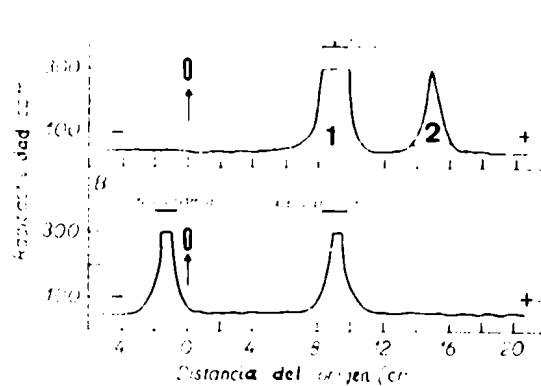


FIGURA 30 : Tratamiento alcalino del lípido- ^{14}C]GlcNAc

(A) Se lo calentó en NH_4OH al 10 % por 2 hs a 100°C . Se particionó y lavó según Folch y col. (Métodos) y se sometieron las sustancias acuosas a electroforesis en tampón (1) (página 77) con un campo eléctrico de 30 V/cm. (B) El pico I de (A) tratado con fosfatasa alcalina y analizado en la misma forma. 0 : origen. Figura publicado en Quesada y col. (60).

papel, se lo trató con fosfatasa alcalina de E. coli y se lo sometió nuevamente a electroforesis. En la Figura 30 se aprecia que el tratamiento convirtió parte del compuesto original radioactivo en una sustancia neutra que co-migró con la N-acetilglucosamina. Siguiendo una marcha similar con el pico II de la Figura 30, A, éste no cambió sus características electroforéticas, por lo que no se prosiguió su identificación.

Sometiendo el dolicol-pirofosfato-GlcNAc de hígado a idénticos tratamientos, por hidrólisis alcalina se obtuvo un pico como el I y por tratamiento con fosfatasa éste se convirtió en GlcNAc. De lo expuesto se deduce que los derivados de lípido de insecto se comportaron en lo fundamental como los correspondientes derivados de dolicol de hígado. Se estudió el comportamiento de ambos grupos de sustancias en cromatografía de capa fina, con diferentes solventes. De los datos de la Tabla 37 se deduce que los derivados del lípido de insecto, tanto en solventes neutros como ácidos o básicos se comportaron como poliprenil-derivados y

TABLA 37 : Comportamiento cromatográfico del lípido de insecto glicosilado, en capa fina de Sílica Gel G .

	Solventes			
	1	2	3	4
	Rf			
hDol-P-Glc	0.78	0.61	0.68	0.71
iDol-P-Glc	0.78	0.61	0.65	0.70
Fic-P-Glc	0.76	0.50	0.60	0.65
Fic -P-Gal	0.75	0.49	0.59	0.62
Glucosa	0.38	0.35	0.25	0.21
Glucosamina	0.24	0.19	0.17	0.27
UDP-Glc	0.07	0.02	0.00	0.03
Glucosa-1-P	0.02	0.00	0.00	-

Solventes : 1 = cloroformo/metanol/ etanol abs./agua (1:2:2:1) 2 = Solvente X
 3 = idem X en proporción (5:6:6:3) 4 = cloroformo/2-propanol/etanol abs./NH₄OH conc. (2:4:5:3). Se rasparon de las cromatoplasmas bandas de 0,5 cm y se contó en centelleo líquido. hDol-P se refiere a doliquil-P de hígado. iDol-P al de insecto (Triatoma).
 Tabla publicada en (60) .

- en particular - comigraron con el Doliquil-P-Glc en el Solvente X, especialmente diseñado para obtener la separación de los ficaprenil derivados (Figura 31) .

Se sometió el lípido-Glc de insecto a tratamiento con fenol (68° C durante 3 horas). Se observa en la Tabla 38 que no se rompió la unión lípido-azúcar, a semejanza de lo que ocurre con el dolicol-P-glucosa. En cambio el ficaprenol-P-glucosa se hidrolizó ya que casi toda la radioactividad se volvió hidrosoluble. La estabilidad a este tratamiento parece propia de los poliprenil fosfato derivados α - saturados (359) .

Por otra parte se ha podido hacer una estimación de tamaño aparente del poliprenol metabólicamente activo de insecto mediante experimentos de filtración molecular (ver página 144 y Figuras 64-64¹) . Parece tener un largo de cadena ligeramente inferior (18 isoprenos) al de dolicol de mamíferos pero claramente mayor que el ficaprenol de Ficus elastica .

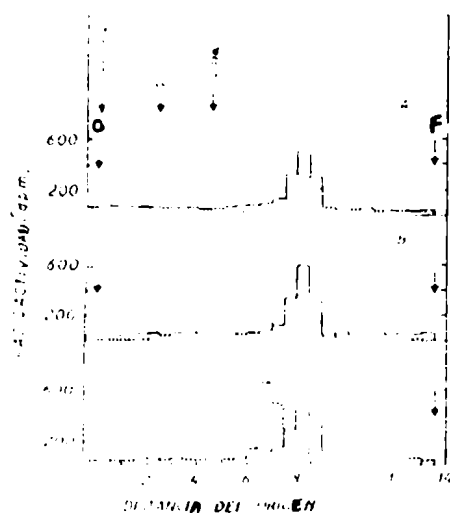


FIGURA 31 : Cromatografía en capa fina (Sílica gel G) de mezclas de los glucosil-poliprenoles

Se desarrollaron con el solvente X y se procesaron para contar en centelleo líquido (ver Tabla 37 y Métodos).

A y B : Mezclas del lípido de insecto- $[^{14}\text{C}]$ Glucosilado con Dol-P- $[^3\text{H}]$ Glc y Fic-P- $[^3\text{H}]$ Glc, respectivamente. C : Mezcla de Dol-P- $[^{14}\text{C}]$ Glc y Fic-P- $[^3\text{H}]$ Glc. Líneas llenas : ^{14}C . Punteado : ^3H . O : origen. F : Frente. Figura publicada en (60).

TABLA 38 : Tratamiento fenólico de los glucosil-poliprenoles

Glucolípido	ANTES	DESPUES DEL TRATAMIENTO	
	cpm	Capa acuosa	Capa fenólica
iDol-P-glucosa	1976	242	1785
hDol-P-glucosa	2108	210	1756
Fic-P-glucosa	2149	1676	370

Las muestras se calientan en fenol 3 horas, y se procesan (García y col. (359) y página 70). Se cuentan las capas fenólica y acuosa. Tabla publicada en Quesada y col. (60).

De los datos expuestos se concluyó, hasta que sea posible obtener pruebas químicas directas, que la sustancia aislada es dolicol de insecto fosforilado. Es muy difícil estimar la cantidad de Dol-P presente en los extractos de insecto. De los dosajes enzimáticos, comparados con cantidades conocidas de Dol-P de hígado se puede obtener un valor máximo, en términos de fósforo total. De las incorporaciones de manosa o glucosa radiomarcada al respectivo derivado de doliquil-fosfato se puede obtener un valor mínimo, en términos de nanomoles, descontando el Dol-P-azúcar formado endógenamente. Los respectivos valores obtenidos para el Dol-P de Ceratitis fueron $0.05 \mu\text{g/g}$ de insecto (promedio mínimo) y $0.3 \mu\text{g/g}$ (promedio máximo).

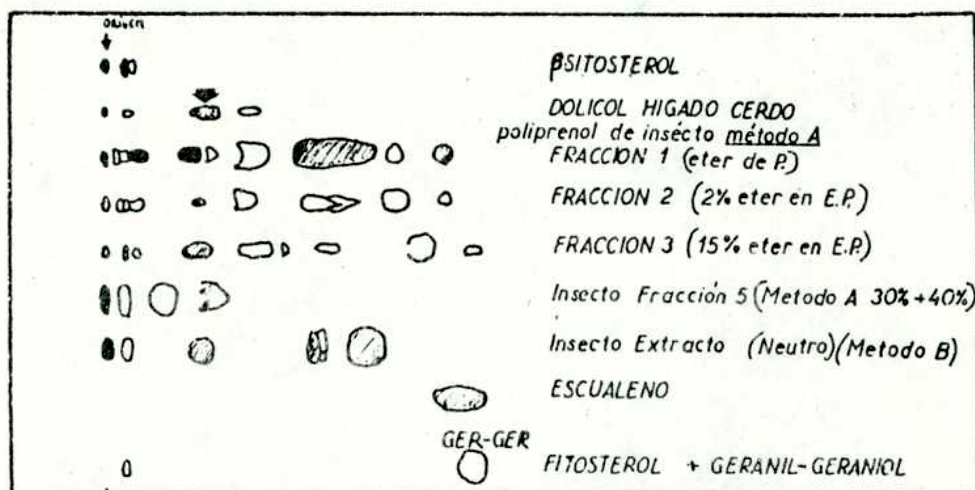
3.1.3. Dolicol libre de insectos

Ante las primeras evidencias de la existencia de un poliprenil-P metabólicamente activo en insectos, se trató de hallar el alcohol libre en los tejidos de diferentes insectos. Para ello se aislaron los lípidos no polares mediante varios métodos (ver Material y Métodos). Mediante el método clásico de purificación de dolicol de mamíferos, ligeramente modificado, (Método A) se aisló de los tejidos de Triatoma y de Ceratitis una sustancia con propiedades químicas y cromatográficas de poliprenol de cadena larga.

Típicamente las fracciones 2 y 3 obtenidas según el Método A, diagrama de la Figura 24, página 58, así como el extracto neutro del Método B, contenían una sustancia que, cromatografiada en capa fina se comportó como el dolicol estándar de hígado de cerdo. La coloración con anisaldehido/ SO_4H_2 reveló el putativo dolicol con una coloración verde hoja que se considera (377,378) típica para los isoprenoides (Figura 32).

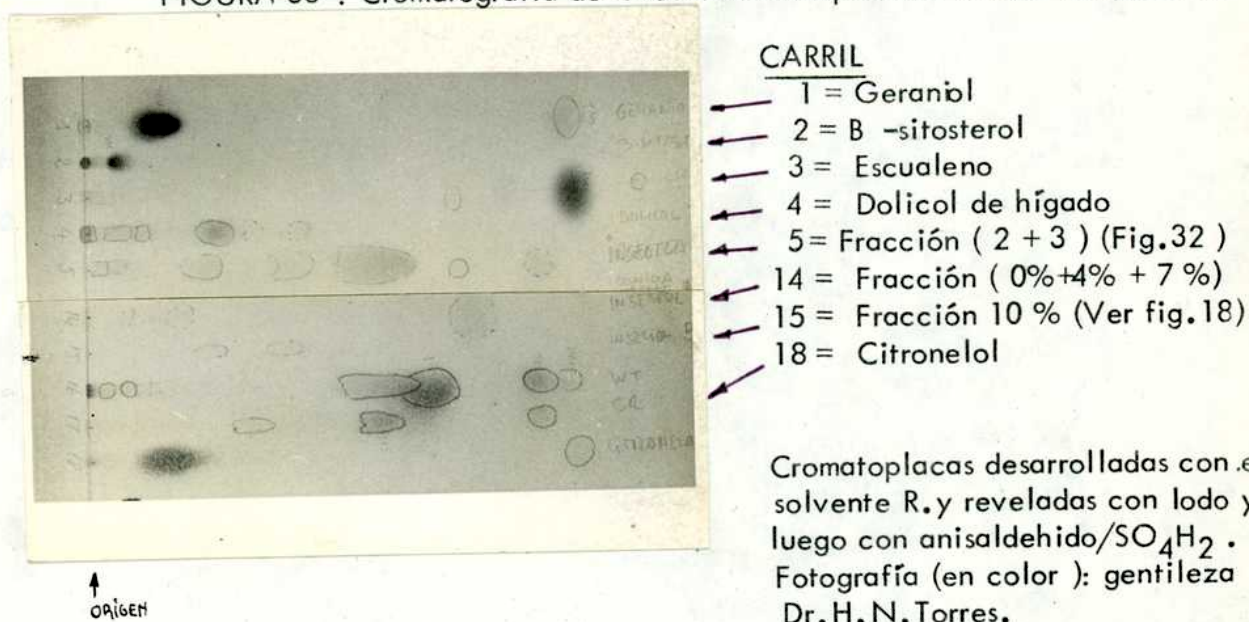
FIGURA 32 : Cromatografía de fracciones enriquecidas en dolicol de insecto (1)

Se desarrolló la cromatoplaaca de Sílica gel "G" lavada (Métodos) con el solvente R (a 18° C). Se reveló con anisaldehído (página 88).



Los extractos conteniendo el presunto dolicol de insecto (FR 2 + FR 3) se cromatografiaron en columna de alumina según el esquema de la Figura 18 . La sustancia eluyó de la misma a la concentración de 10% de éter etílico en éter de petróleo (Figura 33) .

FIGURA 33 : Cromatografía de fracciones enriquecidas en Dol de insecto.



Cromatoplaacas desarrolladas con el solvente R, y reveladas con iodo y luego con anisaldehído/ SO_4H_2 . Fotografía (en color): gentileza Dr. H. N. Torres.

En cromatografía de fase invertida realizada con dolicol de hígado como estándar, se ve (Figura 34) que el aparente dolicol de insecto se comportó también como tal. El poliprenol

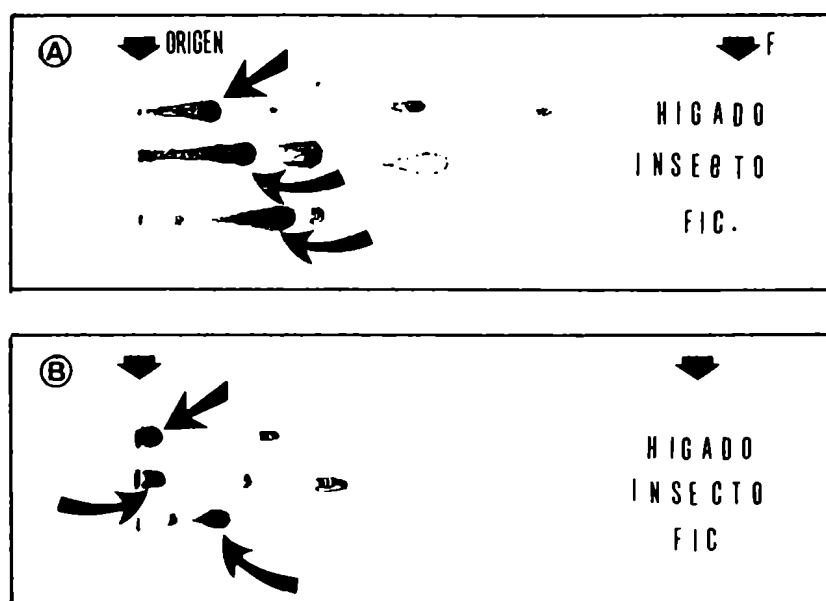


FIGURA 34 : Cromatografía en capa fina (fase reversa) del dolicol de insecto

El dolicol obtenido de la columna de alúmina (10 % éter et. en éter de p.) purificó en cromatografías similares a las de la Figura 33 (página 105), en escala preparativa. Se obtuvo así un enriquecimiento apreciable en Dol ; se lo cromatografió en fase reversa (página 70 y (187, 197, 396)) con el solvente N. (A) 5 % de agua en acetona. (B) 7 % agua en acetona .

de insecto cromatografió en capa fina como dolicol en diferentes solventes ácidos, neutros y básicos (Tabla 39). La identificación del mismo en base solamente a la movilidad cromatográfica fue frecuentemente dudosa debido a que ésta cambió con la cantidad de lípidos totales sembrados en la cromatoplatea (Figura 35) . Similarmente a lo propuesto por Rouser para otros fosfolípidos (397) las identificaciones en base a movilidad deben hacerse, al menos, con pares de solventes. Cuando la sustancia a analizar está suficientemente purificada es conveniente desarrollar cromatografías bidimensionales con los solventes elegidos.

TABLA 39 : Cromatografía de Dol de insecto en diferentes solventes

	1	2	3	4	5	6	7	8
	R _f -Sitos	R _f	R _f	R _{escual}	R _{escual}	R _f	R _f	R _f
Ficoprenol	2,3	0,30	0,18	0,54	0,18	0,73	0,80	-
Dol (hígado de cerdo)	2,9	0,26	0,12	0,55	0,28	0,71	0,86	0,85
Dol de insectos								
• <u>Ceratitis capitata</u>	3,0	0,28	0,15	0,54	0,26	0,70	0,83	0,87
• <u>Mallophora ruficanda</u>	2,9	-	-	-	0,25	-	-	-
• <u>Tritoma infestans</u>	3,1	-	0,15	-	-	-	-	-
- Colesterol	1,13	0,07	-	0,29	-	0,80	-	0,90
- β -Sitosterol	1,00	-		0,27	0,07	0,71	0,77	-
- Escualeno			-	1,00	1,00	0,88	0,83	-

Solventes : (1) Cloroformo (2) Solvente P (3) Solvente T (4) Solvente U

(5) Solvente R (6) Solvente O (7) Solvente X

(8) Cloroformo/metanol/amoníaco conc. (70:21:1)

En los solventes 1, 4 y 5 el R_f es muy sensible a la saturación de la cuba, por lo que se utiliza la relación a un estándar.

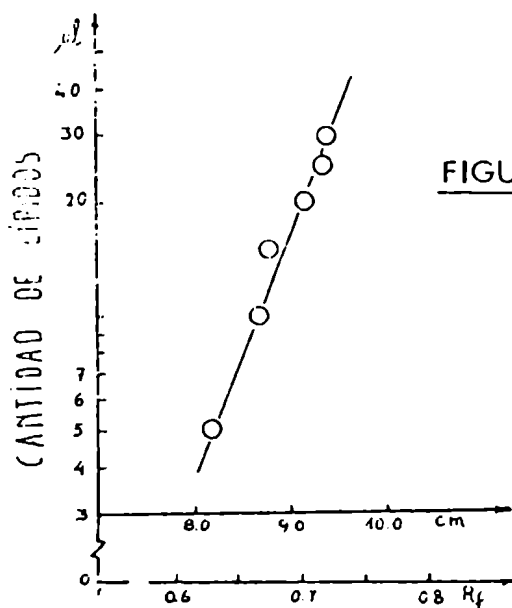


FIGURA 35 : Efecto de la cantidad de lípidos totales en la movilidad cromatográfica

En la Figura 36 se identificó el dolicol purificado de Ceratitis mediante esta técnica. Además fueron datos importantes en la identificación:

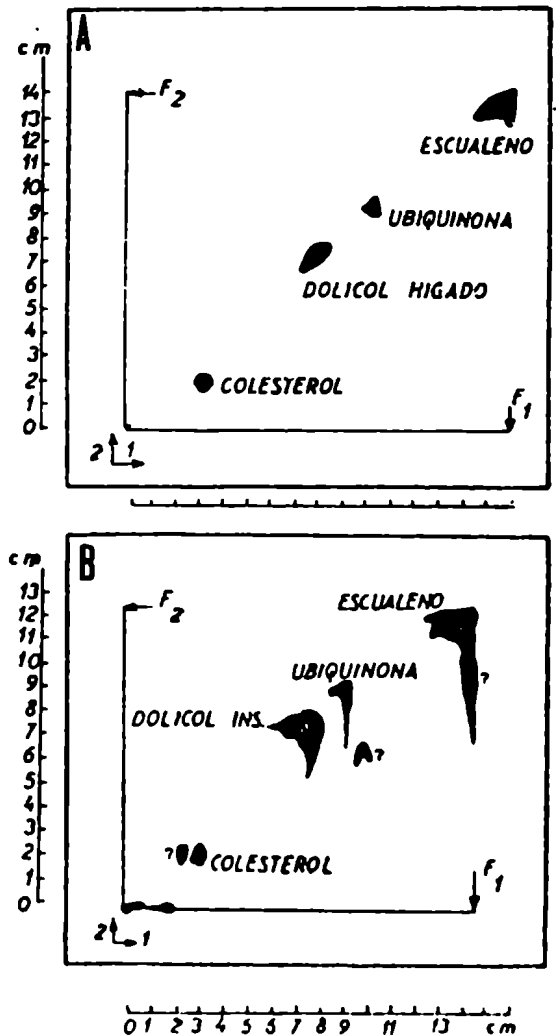
- el color bajo revelado de anisaldehído, inmediatamente de calentado a 100-110° C y a las 12-16 hs.
- la velocidad de revelado a temperaturas de 85-120° C (por ejemplo: los esteroides revelan antes).
- la forma de la mancha en la cromatoplaça (en general es ligeramente dispersa debido a que el dolicol es mezcla de 2 o más especies isoprénicas). (El dolicol de insecto pareció de menor tamaño que el de hígado).
- la fluorescencia bajo luz ultravioleta, débil y que se intensificó revelando con fluoresceína (Métodos).

El dolicol que se aisló del díptero Mallophora ruficauda resultó idéntico al de Ceratitis

(Tabla 39). (Página anterior).

FIGURA 36 : Identificación del Dol de insecto

Las mezclas de estándares (A) o de Dol de insecto más Escualeno y colesterol (B) se sembraron en un ángulo de la placa respectiva (prelavado y pre-cromatografiado con cloroformo). Se cromatografió en cloroformo (dirección 1) y en solvente U (página 79) (dirección 2). Se reveló primero con iodo y luego con anisaldehído/SO₄H₂.
 O : origen ESC : Escualeno UQ : Ubiquinona COL : colesterol
 F₁ y F₂ : Frente de 1.º y 2.º solvente

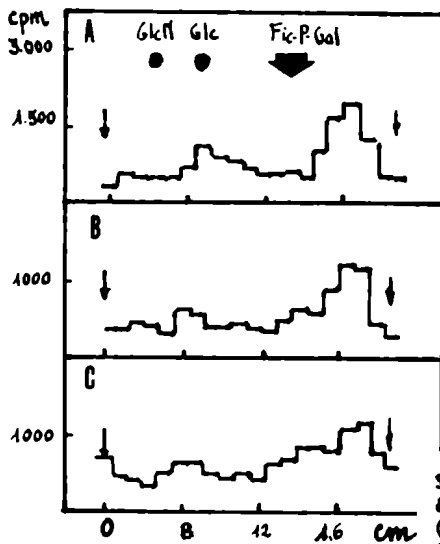


Preparación y dosaje de dolicol-fosfato sintético a partir de dolicol de insecto

El dolicol purificado en una cromatografía en capa fina preparativa de sílica gel H con el solvente R fue sometido a fosforilación mediante el método de Popjack (35).

El producto se calentó a 37°C en propanol / HCl 0.1 N durante 2 hs para eliminar el posible PP-derivado y se lo cromatografió en capa fina (ganó un 60 % de la capacidad estimuladora): los lípidos eluidos del gel de sílice se dosaron para su capacidad de estimular la formación de Dolicol-P-Glc. La Figura 37 muestra que la sustancia

FIGURA 37 : TLC de lípido fosforilado de insecto



Se cromatografiaron en carriles vecinos: dolicol fosfato natural de hígado (A) y de insecto (B) y el presunto dolicol de insecto fosforilado químicamente (C). Las placas de Sílica gel G, prelavadas con Metanol/HCl (9:1) y pre-cromatografiadas con cloroformo, se desarrollaron con el solvente:

Cloroformo/Etanol abs./Ac. acético 1N (10:15:4); Tras lo cual se separaron bandas de 1 cm de sílica gel y se eluyeron los lípidos (ver pág. 78). Después de eliminación de los ácidos se dosó la capacidad de las fracciones para estimular la síntesis de Dol-P-Glc. (enzima de insecto).

Se preparó fosfato de di-trietilamina (187). Sobre el dolicol seco se añadió gota a gota: benceno anhidro 1 vol/éter etílico en éter de petróleo (30° - 65°) (4:94), 1 vol.; di-trietilamina-fosfato en acetonitrilo destilado (sol. saturada) 2 vol.; acetonitrilo 2,25 vol.; tricloro-acetonitrilo (sol. condensante) 2,25 vol. (ver 351 y 187). El producto fosforilado se llevó a seco y se lavó varias veces por el método de Folch (sin Mg²⁺). Tras la hidrólisis ácida (texto) se cromatografió en TLC

/fosforilada
químicamente contenía un componente cuya capacidad estimuladora coincidió con el presunto Dolicol-P aislado directamente de los tejidos de insecto y con el dolicol fosfato natural de hígado de cerdo. Si bien ésta resultó relativamente baja con respecto a la obtenida mediante Dol-P natural ello podría explicarse por la presencia de impurezas provenientes de la fosforilación, ya que al mezclar el putativo Dol-P sintético con Dol-P natural, éste perdió parte de su poder estimulador (Tabla 40).

TABLA 49 : Capacidad estimuladora del lípido de insecto fosforilado

	Formación de Dol-P-Glc cpm incorporadas
Endógeno	977
+ Dol-P de hígado natural	6.941
+ Lípido de insecto fosforilado	3.623
idem + Dol-P hígado	5.118
Control (+ Dol)	506

Se utilizó el Dol-P sintético como activador de la formación de Dol-P-Glc, usando enzima de hígado de rata. Incubación y procesamiento ver Métodos y Tabla 32 (página 92).

De lo expuesto se concluyó la presencia de dolicol libre en los insectos. Este resultado ha sido confirmado por Beedle y col. que aislaron dolicol- $[^{14}\text{C}]$ de larvas asépticas de Calliphora erythrocephala crecidas en presencia de 2- $[^{14}\text{C}]$ ácido mevalónico (28). Estos autores estiman en base a cromatografía en TLC (fase invertida) que el dolicol de insecto posee 19 a 18 unidades isoprénicas con trazas de 17 unidades. En la presente Tesis (ver más adelante pág. 144 y Ref. 143) se encontró que, en base al análisis por filtración molecular del derivado manosilado el dolicol de insecto tenía un PM de lo que corresponde aproximadamente a 18 unidades (ver Figura 65 , página 145). No se ha podido obtener suficiente dolicol de insecto purificado como para someterlo a un análisis por espectroscopía de masa. La cantidad máxima que se obtuvo (1.8 mg a partir de 1/2 kg de pupas de Ceratitis) se utilizó en el experimento de fosforilación. Además no era rigurosamente puro.

3.2. BIOSINTESIS " IN VIVO " DE POLIPRENIL-AZUCARES

Se utilizaron dos enfoques para los estudios de biosíntesis fisiológica de poliprenil-azúcares en insectos: a) inyección de precursores radioactivos en hemolinfa del insecto; b) cultivo de órganos y/o tejidos, fundamentalmente epidermis y cuerpo graso, en presencia de precursores radioactivos.

3.2.1. Inyección de precursor en hemolinfa

Se trabajó con vinchucas y cucarachas mantenidas en laboratorio.

Larvas de 5° estadio y adultos de Triatoma infestans fueron inoculados con 5 μ l de solución fisiológica de insecto conteniendo Trehalosa - (14 C). Se realizaron diferentes experimentos con ejemplares en momentos distintos del 5° estadio, entre la alimentación y la muda a imago. El período más interesante, debido a la aparente activación del metabolismo de poliprenil derivados, es el que va desde poco antes de la muda hasta el momento en que el imago emergente todavía posee cutícula translúcida, apareciendo por ello rosado (a causa de los pigmentos epiteliales, fundamentalmente insectorubinas). Se realizaron períodos de marcación desde 1 a 72 hs, al cabo de los cuales se extrajeron los lípidos totales. Como se aprecia en la Tabla 41 del total de radioactividad incorporada a lípidos entre 21 % (a las 8 hs) y 17 % (a las 72 hs) correspondió a lípidos polares.

TABLA 41 : Biosíntesis "in vivo" de lípidos en Triatoma infestans.

		Radioactividad incorporada (cpm)			
Tiempo después de inyección (hs.)		3.5	8.0	24	72
Extractos Totales (Cloroformo/metanol 2/1)		117.420	89.201	27.448	25.357
Columna DEAE/Celulosa					
- Fracción Neutra		101.526	68.400	21.734	21.664
- Fracción Polar		12.409	17.681	5.089	3.895
Hidrólisis Ácida de Lípidos Polares :					
- Fase Superior Acuosa		2.606	3.800	620	283
- Fase Inferior Orgánica		9.307	13.551	4.331	3.525

Los fosfolípidos marcados fueron sometidos a la hidrólisis ácida suave típica para detección de poliprenil azúcares (Métodos) al cabo de la cual una parte de la radioactividad se hizo hidrosoluble. La radioactividad liberada por el tratamiento se distribuyó en varias sustancias una de las cuales se comportó como una acetilhexosamina cuando fue cromatografiada con el solvente A (Figura 38). En algunos experimentos, la fracción glicolípídica lábil al ácido liberó, además de la acetilglucosamina una sustancia que, por criterio de movilidad, parecía diacetil-quitobiosa. No pudo analizarse en detalle por su escasez y por la aleatoriedad de su obtención.

Por otra parte, se descartó - por dosaje enzimático con trehalosa fosforilasa - que alguna de las sustancias unidas a lípido fuera trehalosa.

Los experimentos paralelos en que se inyectó $[^{14}\text{C}]$ - Glucosa , se interpretaron con

FIGURA 38 : Hidrólisis del glicolípido sintetizado "in vivo" por Triatoma: identificación de las sustancias hidrosolubles

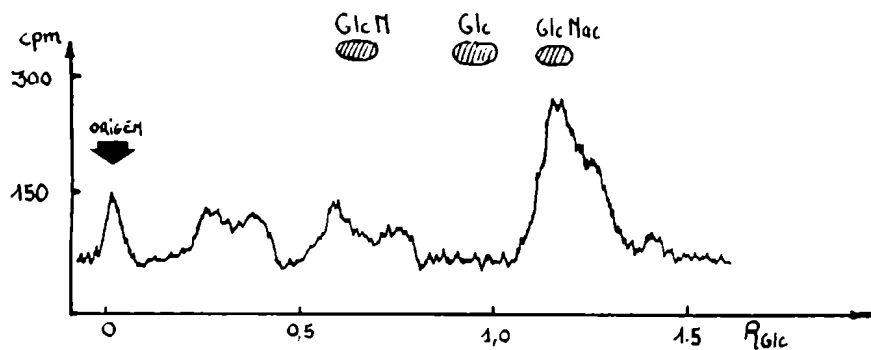


TABLA 42 : Hidrólisis del material radiomarcado "in vivo" por Periplaneta americana

Fracción	Radioactividad		
	cpm	%	
fracción soluble en cloroformo / metanol	62.102	100	
idem, particionada	fase acuosa	32.970	52
	fase orgánica	29.551	48
fase orgánica particionada después de hidrólisis	ácida		
	fase acuosa	925	1.5 ^a
	fase orgánica	28.002	46.0

Métodos como para Triatoma (Métodos y Figura 38). (a) en dos experimentos idénticos se obtuvieron porcentajes de 1.0 y 1.3. Tabla publicada en Quesada y col. (180).

dificultad debido a la rápida marcación de numerosas sustancias liposolubles, incluyendo los ácidos grasos. Se verificó - no obstante - la formación de glicolípidos lábiles al ácido.

En la Tabla 42 se aprecia que en experimentos similares realizados con cucara chas (Periplaneta americana) también una parte de los fosfolípidos resultó sensible a la hidrólisis ácida suave. En estos casos los productos de hidrólisis no se caracterizaron debido a la escasez del material radiomarcado en cada experimento.

3.2.2. Marcación en cultivo de tejido

Epidermis abdominal

Se utilizó material de 5° estadio larval y adultos recién mudados de Triatoma. A los efectos de obtener epidermis lo menos contaminada posible con otros tejidos, se disecaron los abdómenes eliminando cuerpos grasos, sistema digestivo, gónadas y tubos de malpighi, lavando con solución fisiológica. Se controló al microscopio que sólo quedara la pared abdominal adherida a la cutícula. (Se consideró el sistema traqueolar como cutícula).

En experimentos paralelos se incubaron alas en pedazos, asumiendo que éstas constan - básicamente - de epidermis recubierta por cutícula no tanificada.

Al medio de cultivo completo, diseñado para estos experimentos, se le adicionó, según los casos, Trehalosa (^{14}C), Manosa (^{14}C) o Glucosa (^{14}C) durante períodos de 3 - 5 hs.

En un experimento tipo de 3 hs de duración como el que se muestra en la Tabla 43 (ver página siguiente) se observó que en término de nanomoles las incorporaciones a material cloroformo/metanol soluble de epidermis fueron similares en el caso de trehalosa y glucosa. La incorporación de manosa fue la mitad. Sin embargo la incorporación a sustancias solubles en fase inferior de la partición de Folch (ver Métodos) - también en término de nanomoles - fue mayor cuando los trazadores fueron manosa y trehalosa.

Sin embargo, debido a las bajas actividades específicas, las incorporaciones de [^{14}C] Man y [^{14}C] Trehalosa en términos de cuentas por minuto fueron bajas, por lo que en la mayor parte de los experimentos solamente se pudieron estudiar con comodidad las sustancias

radiomarcadas a partir de $[^{14}\text{C}]$ Glucosa.

TABLA 43 : Incorporación de radioactividad a lípidos de epidermis

	Precursor Radioactivo					
	$[^{14}\text{C}]$ -Glc		$[^{14}\text{C}]$ -Man		$[^{14}\text{C}]$ -Trehalosa	
	cpm	nanomoles ^a	cpm	nanomoles ^a	cpm	nanomoles ^a
Extracto total	571.670	1.98	45.112	0.90	45.600	1.82
Partición:						
- Fase Superior	473.100	1.61	29.670	0.59	35.280	1.41
- Fase Inferior	26.700	0.09	13.350	0.26	10.320	0.41
Extracto C/M/H ₂ O 10:10:3	1.700	0.006	40	0.001	212	0.005

Se incubó la epidermis como se describe en Métodos con $1,5 \times 10^7$ cpm de $[^{14}\text{C}]$ -Glucosa 288 Ci/mol o $[^{14}\text{C}]$ Trehalosa 25 Ci/mol o $[^{14}\text{C}]$ Manosa 50 Ci/mol.

Para el cálculo de los nanomoles de monosacáridos incorporados no se tuvo en cuenta la dilución debida a los sustratos endógenos, por desconocerse el dato.

a) nanomoles de monosacáridos incorporados, calculados en base a la actividad específica del nucleótido-azúcar dador.

Análisis cromatográfico de las sustancias radiomarcadas de epidermis

Los extractos cloroformo/metanólicos de la epidermis incubada con los diferentes trazadores se partitionaron para separar las sustancias hidrofílicas (Fase Superior) de las lipofí-

licas (Fase Inferior) (ver Métodos).

En la Figura 39 (ver página siguiente) , carriles 1 a 3 se aprecia que la mayor parte de la radioactividad hidrofílica se comportó como trehalosa, independientemente del precursor radioactivo empleado. En los casos de glucosa y manosa (1 y 2) todavía se detectó algo de la radioactividad original.

La posición cromatográfica de las sustancias lipofílicas radiomarcadas se aprecia en la Figura 39, carriles 4-6. Como se indica en la Tabla 44 la sustancia que arbitrariamente se denomina (I) cromatografió en la zona en que lo hacen los cerebrosidos y esterol-glucó-

Tabla 44 : Datos de movilidad de las sustancias cromatografiadas en cromatogramas como el expuesto en la Figura 39

Estándares	R _f		R _f	
• Cerebrósidos	0.81		• Rafinosa (C ₃)	0.11
• FMP-Gal	0.47		• Glucosa-P	0.00
• iDol-P-Glc	0.52		• UDP-Glc	0.02
• iDol-F-Man	0.50		• GDP-Man	0.00
		<u>Azúcar precursor</u>	<u>Glicolípido</u>	<u>Sensibilidad</u>
• Glc	0.26	¹⁴ C Glc	I	0.83
• M ₂	0.17		II	0.31
• M ₃	0.12		III	0.44
• M ₄	0.07		IV	0.29
		¹⁴ C Man	I	0.83

cidos. Eluida de la placa esta sustancia resultó resistente a las condiciones de hidrólisis lábil para poliprenil-azúcares (pH 2.0; 100° C; 20 min).

La sustancia (II) co-cromatografió con el Dol-P-Glucosa y en las mismas condiciones de hidrólisis liberó glucosa como única sustancia radiomarcada (Figura 40, II y Tabla 44).

La sustancia III cromatografió en la posición en que lo hacen los poliprenil-oligosacári-

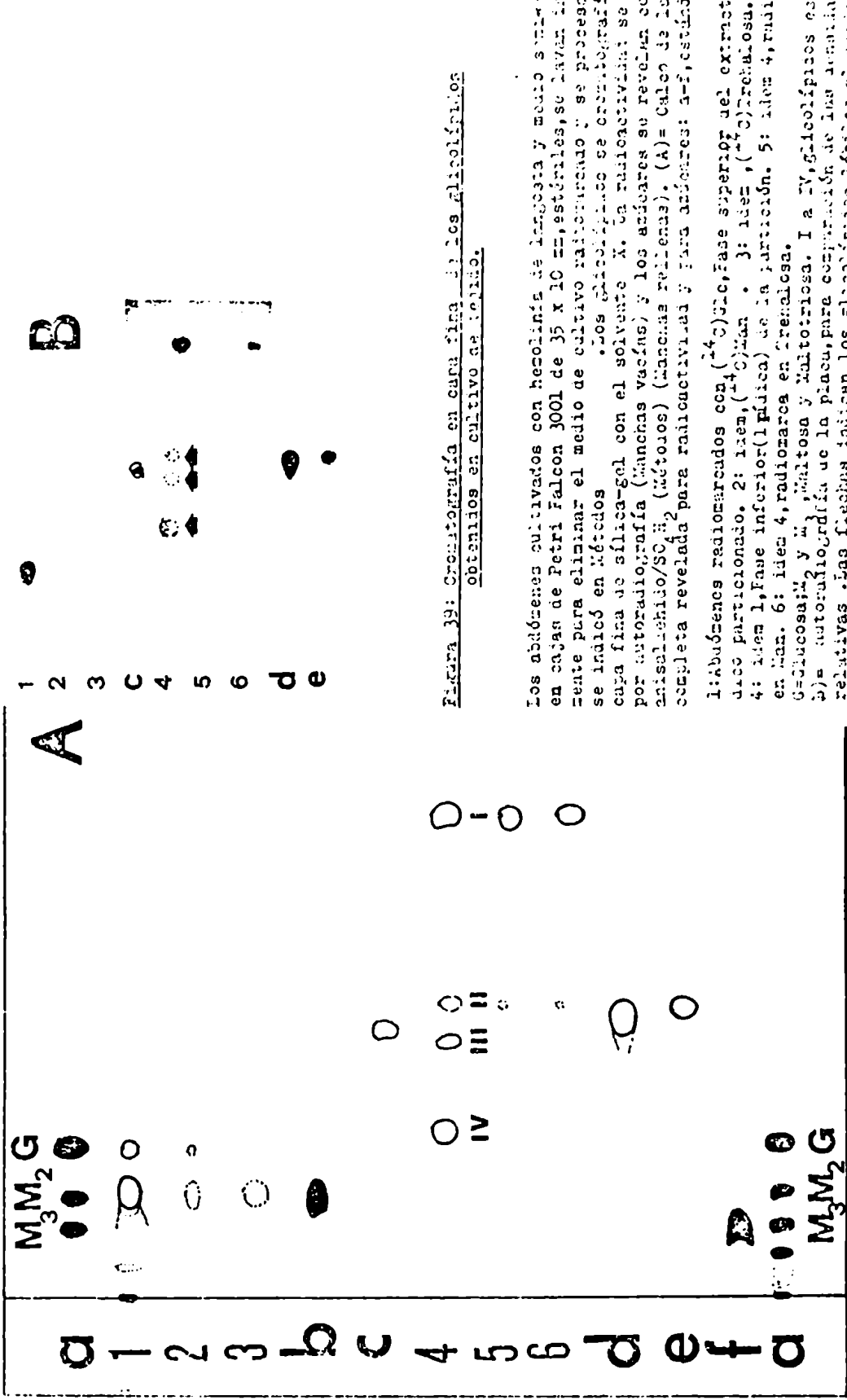


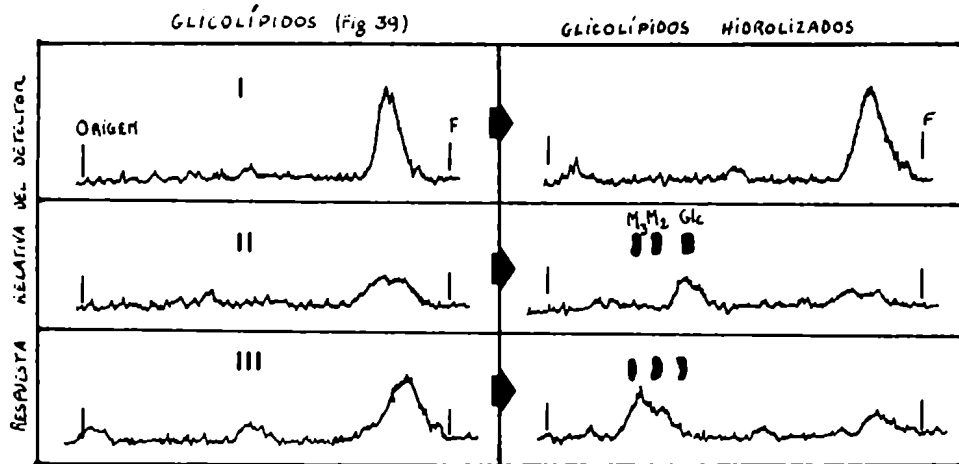
Figura 39: Cromatografía en capa fina de los glicolípidos obtenidos en cultivo de tejido.

Los abdómenes cultivados con hecolina de langosta y medio sintético en cajas de Petri Falcon 3001 de 35 x 10 cm. esteriles, se lavan intensamente para eliminar el medio de cultivo radioactivo y se procesan como se indicó en Métodos. Los glicolípidos se cromatografían en capa fina de sílica-gel con el solvente X. La radioactividad se localiza por autoradiografía (Manchas vacías) y los azúcares se revelan con anisalcohilo/SC H₂ (Métodos) (Manchas rellenas). (A) = Calco de la placa completa revelada para radioactividad y para azúcares: a-f, azúcares;

Li: Abómenes radiomarcados con ¹⁴C)Glc, Fase superior del extracto lipídico particionado. 2: Idem, ¹⁴C)Man. 3: Idem, ¹⁴C)Trehalosa. 4: Fase inferior (líquida) de la partición. 5: Idem 4, radiomarcada en Man. 6: Idem 4, radiomarcada en Trehalosa. G=Glucosamin² y M, maltosa y maltotriosa. I a IV, glicolípidos estudiados. b) = Autoradiografía de la placa, para comparación de las manchas relativas. Las flechas indican los glicolípidos lábiles al ácido. El puntado marca las manchas poco visibles en la reproducción.

a, Galto-oligosacáridos; b, trehalosa; c, Pic-F-Gal; d, Dol-P-Man; e, Dol-P-Glc; f, rafinosa.

FIGURA 40 : Labilidad a pH 2.0 de los glicolípidos separados en capa fina (Cromatografías en el solvente B)

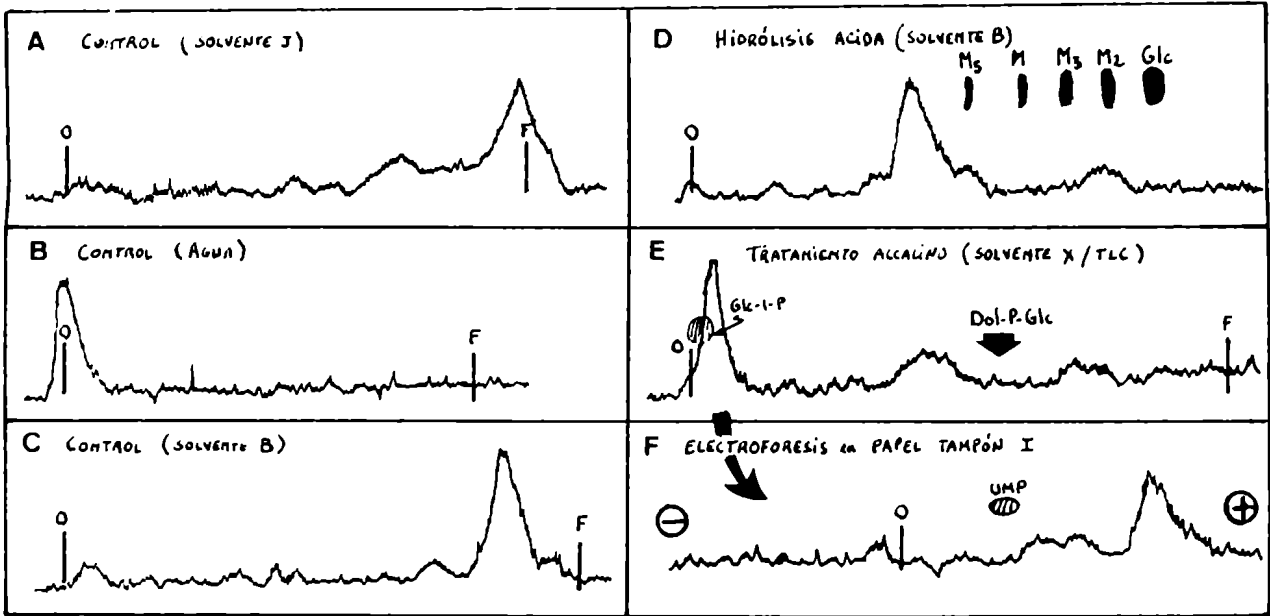


dos de 3-4 hexosas y resultó lábil a la hidrólisis a pH 2.0 (Tabla 44) liberando un aparente trisacárido radiomarcado (Figura 40, III).

La sustancia (IV) fue la principal sustancia radiomarcada, lábil a la hidrólisis en ácido lábil.

Se confirmó su naturaleza lipídica, cromatografiándola en papel con los solventes J y B y con agua (Figura 41, A - C) (ver página siguiente). La sustancia liberada en el tratamiento ácido exhibió una movilidad cromatográfica similar a la de un maltooligosacárido de 5-6 unidades (Figura 41, D). Este presunto oligosacárido cromatografiado en Biogel P 2 migró con un Peso Molecular aparente de 630-740 que corresponde aproximadamente a un tetrasacárido (Figura 42).

FIGURA 41 : Comportamiento del glicolípido IV



A) B) y C) Glicolípido eluido de TLC y cromatografiado en papel
 D) Glicolípido sometido a hidrólisis ácida suave (pH 2.0); cromatografía en papel de la sustancia hidrosoluble liberada (solvente B)
 E) y F) Sustancia hidrosoluble liberada por tratamiento alcalino: cromatografía en capa fina (solvente X) (E) y electroforesis en papel (Acetato Pirilina pH 6.5) (F)

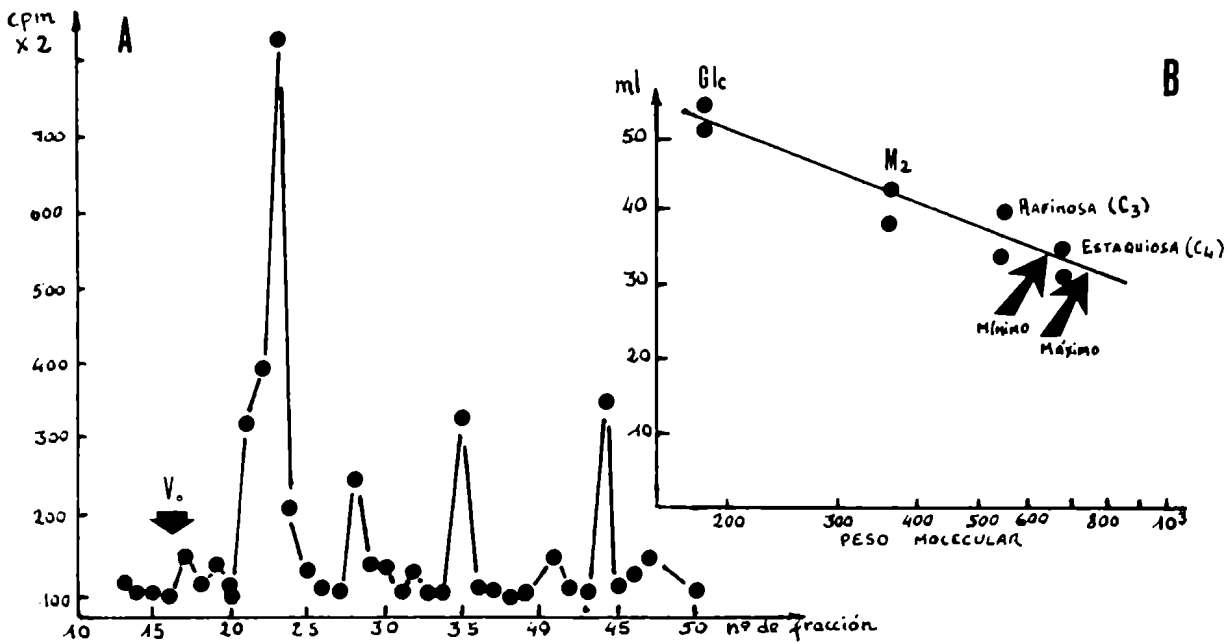


FIGURA 42 : Cromatografía de filtración en columna de Biogel P₂ (V₀: 23,0 cc) del oligosacárido liberado por hidrólisis ácida del glicolípido IV. Se lo eluyó del cromatograma de la Figura 41, D (arriba), se lo lavó y resuspendió en Tampón fosfato pH 7,0 10 mM. Como indicador de V₀ se utilizó dextrano azul. En corridos previos se calibró la columna, detectándose los azúcares por el método de Dubois y col. (367).
 A) Radioactividad en las fracciones B) Curva de calibración

Por otra parte se sometió el glicolípido a un tratamiento en NaOH 0.1 M a temperatura ambiente durante una noche. La radioactividad se hizo hidrosoluble y se comportó como una sustancia cargada, cromatografiando igual que azúcares-fosfato (Figura 41, E). El comportamiento en electroforesis a pH 6.5 fue el de un anión (Figura 41, F).

Debido a la escasez del material obtenido en cada ensayo todavía no se ha caracterizado debidamente el glicolípido de epidermis abdominal.

Epidermis de alas

En las incubaciones de alas, utilizando Glucosa - $[^{14}C]$, se formó un glicolípido que se comportó, bajo diferentes criterios como Doliquil-P-Glc (Figura 43, A)

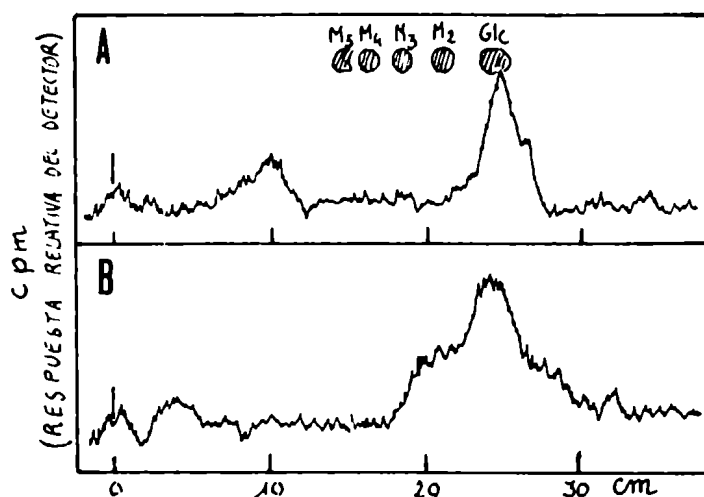


FIGURA 43 :

Cromatografía de sustancias hidrosolubles liberados de la fracción glicolípida por hidrólisis ácida suave

Los lípidos polares extraídos de Alas (A) y cuerpo graso (B) fueron sometidos a hidrólisis ácida suave y cromatografiados en papel con el solvente B .

Cuerpos grasos

En los cuerpos grasos se radiomarcaron numerosos lípidos pero sólo una pequeña fracción de glicolípidos resultó lábil a pH 2.0/100° C (Figura 43, B).

Los glicolípidos extraídos de los diferentes órganos se sometieron a hidrólisis ácida suave y se cromatografiaron en papel con el solvente B .

3.3. BIOSINTESIS DE DOLICOL MONOSACARIDOS

Se utilizaron como fuente de enzimas homogenatos parcialmente purificados de varias especies de insectos. Se dosó la capacidad de los extractos para transferir GlcNAc y Glc desde los respectivos nucleótido azúcares a glicolípidos hidrolizables por tratamiento ácido suave (HCl 0.01 N/ 20 min / 100° C). Esta sensibilidad al ácido es típica de los poliprenoles-fosfato(s)-azúcar. En la Tabla 45 se aprecia que los resultados más promisorios se alcan-

TABLA 45 : Formación de glicolípidos lábiles al ácido catalizada por extractos de insectos

INSECTO	cpm incorporadas / 3 mg de proteína enzimática	
	marcador radioactivo	
	[¹⁴ C] Glc	[¹⁴ C] GlcNAc
• <u>Aeschna bonaerensis</u> (adulto) (Epidermis abdominal + alas)	85	12
• <u>Apis mellifera</u> (adulto) (epidermis abdominal)	127	0
• <u>Camponotus mus</u> (pupas) (Homogenato total)	275	163
• <u>Periplaneta americana</u> (larvas) (Epidermis Abdominal)	-	442 ¹
• <u>Palaenatus deumetoides</u> (pupas) (Homogenato total)	1.173	321
• <u>Triatoma infestans</u> (adulto) ² (Epidermis abdominal)	1.869	675
• <u>Ceratitis capitata</u> (pupas) (Homogenato total)	3.478	1.208

Se utilizaron mezclas de incubación estándar (página 65) conteniendo 50.000 cpm de UDP-[¹⁴C]GlcNAc y 60.000 cpm de UDP ¹⁴C Glc y fracciones ricas en microsomas (página 62).

1) sólo hubo incorporación cuando se añadió NaF 10 mM a la mezcla

2) adultos con cutícula sin tanificar

zaron con Triatoma, Ceratitis y Periplaneta. La Tabla 46 indica que, al parecer, las enzimas capaces de transferir GlcNAc y Glc en la vinchuca se localizaron fundamentalmen-

TABLA 46 : Purificación parcial de la GlcNAc-transferasa de abdomen de Triatoma infestans

<u>Fracción</u>	<u>cpm incorporados / 10 mg de proteína</u>
- Homogenato total	17
- Sedimentado a 12.000 x g	850
- Sobrenadante de 12.000 x g	1002
- Sedimentado a 95.000 x g	3114
- Sobrenadante de 95.000 x g	316

Ensayo :	
Tris M ⁸ pH 7.4	200 mM
2 mercapto-etanol	30 mM
Acetato-Mg	12 mM
Deoxicolato-Na	0.5 %
F No	3 mM

te, en fracciones ricas en microsomas. Utilizando similares fracciones de mosca de la fruta se ve que (Tabla 47) : 1°) Existió transferencia de Glc, Man, GlcNAc y Gal; 2°) Dicha

TABLA 47 : Transferencia de glicosidos de nucleótido-azúcares a la fracción lipídica líbil al ácido en Ceratitis

ADICIONES	NUCLEÓTIDO-AZUCAR			
	UDP-Glc	GDP-Man	UDP-GlcNAc	UDP-Gal
	cpm incorporadas			
Ninguna	576	798	297	49
+ Dol-P de insecto ^a	4849	4906	1900	167
+ Dol-P de hígado ^b	8270	9436	1794	192
+ Dol-P (híg) ^b - Mg ²⁺ + 20 mM EDTA	538	156	99	48

Inculaciones y procesamiento estándares (Métodos)

a) La cantidad de extracto conteniendo Dol-P añadido a cada tubo procedía de 40 mg de insecto vivo .

b) Dol-P conteniendo 24 nanomoles de fosfato, Tabla publicada en Quenzla y col. (13').

transferencia se estimuló por el agregado de Dolicol-P de hígado de mamífero o del extracto de insecto que aparentemente contiene Dolicol-P de insecto (ver capítulo 3.1.). Por otra parte los cationes divalentes fueron necesarios para todas las transferencias dosadas ya que

cuando se complejaron los cationes endógenos por agregado de EDTA, la incorporación decayó por debajo de los niveles basales (Tabla 47).

3.3.1. Dolicol-pirofosfato-acetilglucosamina

Cronológicamente el primer lípido azúcar de insecto con características de poliprenol derivado se detectó en experimento diseñados para la síntesis "in vitro" de quitina, en los cuales simultáneamente se dosaba la incorporación de radioactividad a la fracción lipídica del incubado (Tabla 48). El lípido-azúcar sólo era detectable en ciertas preparaciones

TABLA 48 : Detección de la formación de lípido-GlcNAc

Expt.	Organismo	Procedimiento	Adiciones	¹⁴ C-GlcNAc incorporada			
				Fracción liposoluble		Fracción rica en quitina	
				c.p.m./ 10 mg proteína	% in- corpora- ción	c.p.m./ 10 mg proteína	% in- corpora- ción
6	<i>Triatoma</i>	Cahib Bowers ^a	No	---	---	447	0.54
			5 mM GlcNAc	---	---	2 060	2.50
17	<i>Triatoma</i>	Butanol- agua ^b	No	1 760	2.12	386	0.46
			5 mM GlcNAc	---	---	650	0.78
30	<i>Triatoma</i>	Folch <i>et al.</i> ^c	No	1 108	1.11	1 728	1.72
			5 mM GlcNAc	1 150	1.15	1 874	1.87
			-Mg ²⁺ + 20mM EDTA	226	0.22	504	0.50
3	<i>Periplaneta</i>	Butanol- agua ^b	No	708	1.41	1 182	2.33
			10 mM NaF	1 208	2.40	1 916	3.82
109	<i>Ceratitis</i>	Folch <i>et al.</i> ^c	No	880	0.71	3 284	2.62

Se utilizaron incubaciones estándar (Métodos). Las fracciones ricas en microsomas (Métodos) se obtuvieron de pared abdominal. Se utilizaron 50,000 cpm de UDP ¹⁴C GlcNAc (conc. final 20 μ Molar) y 6 mg de proteína enzimática.

a) se refiere al método de dosaje de quitina (306)

b) se refiere al método de García y col. (359) de obtención de la fracción lipídica. La quitina se dosó como se indicó en Métodos (página 73)

c) se refiere a la extracción de la fracción lipídica (355). Datos tomados de la Tabla similar publicada en Quesado y col. (180).

(generalmente dependiendo del momento del ciclo de vida del insecto) y se precisaba, además, el agregado de Dolicol-P y detergente para la obtención de cantidades significativas de radioactividad incorporada a lípidos. La transferencia resultó más eficiente en presencia de deoxicolato de Na que utilizando otros detergentes no-iónicos como Triton X-100 o Nonidet P-40 (Tabla 49).

TABLA 49 : Efecto del Dolicol-fosfato y detergentes en la biosíntesis de lípido-GlcNAc

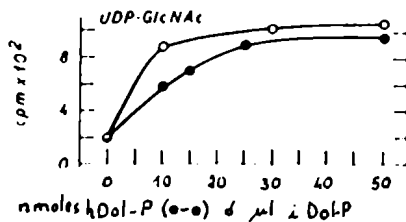
Adiciones	cuentas incorporadas / 6 mg de proteína	
	Mg ⁺⁺ 10 mM	- Mg ⁺⁺ 10 mM + EDTA 20 mM
-	216 (327)	(130)
+ 0,5 % Deoxicolato	87 (123)	-
+ Dol-P	369 (439)	-
+ Dol-P + 0,5 % Deoxicolato	1200 (1305)	(272)
+ Dol-P + 0,5 % Tritón X-100	721 (727)	(165)
+ Dol-P + 0,5 % Nonidet P-40	760 (804)	

Dol-P = 24 nanomolus
UDPAG = 75.000 cpm

ENZIMAS DE *Leishia*

La Figura 44 muestra que en esas condiciones experimentales, el Dolicol-P de insecto

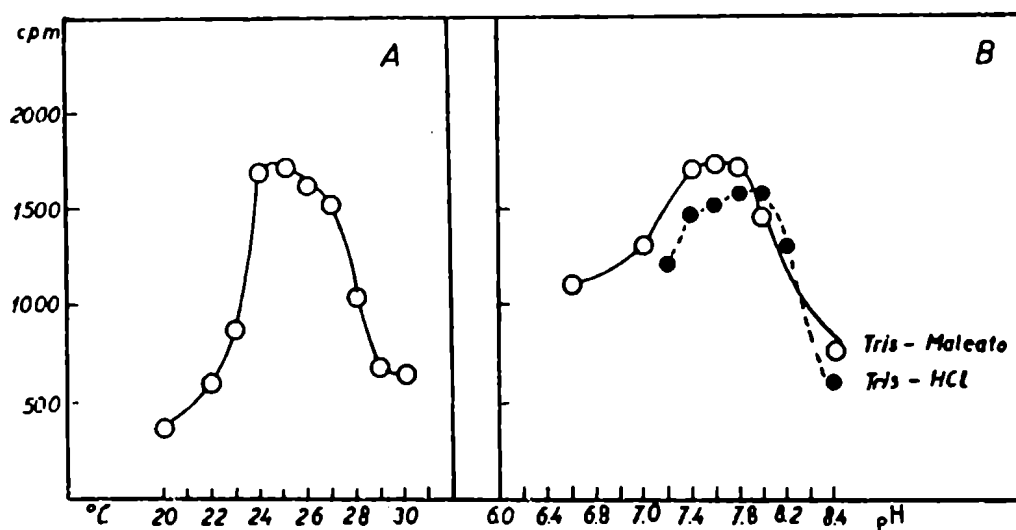
FIGURA 44 : Efecto de la concentración del aceptor lipídico en la formación de Dol-P-P-GlcNAc



Condiciones estándar (Métodos) cada μ l de iDol-P procedió de 100 mg de insecto vivo. Las cpm corresponden a la [¹⁴C] GlcNAc liberada del lípido e identificada por cromatografía en papel.

resultó ligeramente más eficiente que el dolicol monofosfato extraído de hígado de cerdo. La temperatura óptima de transferencia resultó de 24-25° C para la enzima de Ceratitis (Figura 45, A). El pH óptimo se situó entre 7.7 y 7.9 utilizando una solución tampón

FIGURA 45 : Condiciones para la formación de lípido - GlcNAc



de Tris-Maleato o de Tris-HCl (Figura 45, B). Otros tampones como fosfato o hepes resultaron ser de menor eficacia.

Efectos de policationes

La Tabla 50 y la Figura 46 muestran la acción estimuladora de las poliaminas sobre la GlcNAc transferasa. El efecto se manifestó tanto en ausencia como en presencia de magnesio y fue más notorio cuando la enzima fue preparada en ausencia de Mg^{2+} (Tabla 50). El manganeso pareció interferir con el efecto. Dado que diferentes poliaminas actuaron en forma similar (Figura 46) y que los microsomas de hígado de rata también fueron sensibles a la putrescina (Tabla 50) parece tratarse de un efecto inespecífico probablemente estabi-

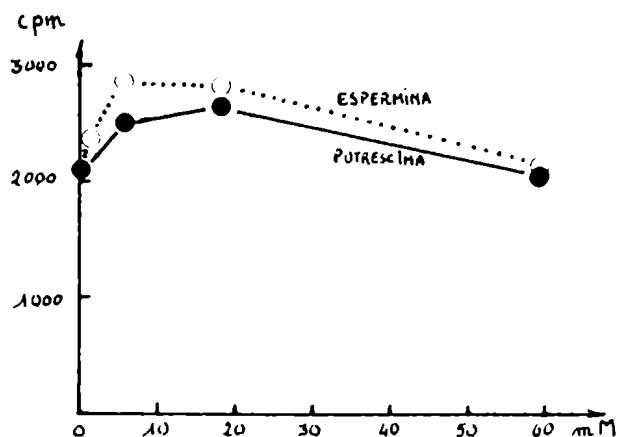
lizante de las membranas microsomales.

TABLA 50: Efecto de poliaminaciones

Adiciones	cpm / 3 mg proteína		
	Enzima preparada con Mg ²⁺	Enzima preparada sin Mg ²⁺	Enzima de hígado
-	2.178	2.643	2.236
- Mg ²⁺ + Putrescina 60 mM	3.051	4.002	4.433
+ Putrescina 60 mM	3.665	4.967	-
- Mg ²⁺ + Putrescina 60 mM + Mn 8 mM	2.442	3.798	-

Condiciones Mg²⁺ 8 mM RESTANTES CONDICIONES VER MÉTODOS.
T.M. pH 7.7 100 mM 90 min 30 ° C
Doc. 0.5 %

FIGURA 46 : Efecto de poliaminas en la formación de lípido-GlcNAc



Se utilizaron las condiciones estándar (pág. 65) y se incubó por 60 min a 27°C. 0 mM indica el óptimo valor obtenido en una curva de concentración de MgCl₂ (9mM). A los restantes tubos se les añade la poliamina. Las diferencias con la Tabla 50 son atribuibles a las condiciones de ensayo y que se trata de diferentes preparaciones enzimáticas.

Características del glicolípido formado

El lípido -GlcNAc obtenido en varias incubaciones se llevó a seco bajo N₂ y se resuspendió en poco volumen de cloroformo/metanol 2:1. Una alícuota del mismo (aproximadamente 4.000 cpm en 0.2 cc) se pasó por una columna de intercambio aniónico de DEAE-

celulosa forma acetato de 1,2 x 40,0 cm equilibrada con metanol 99% en la forma descrita por García y col. (359). Como se aprecia en la Figura 47 la mayor parte de la radioacti-

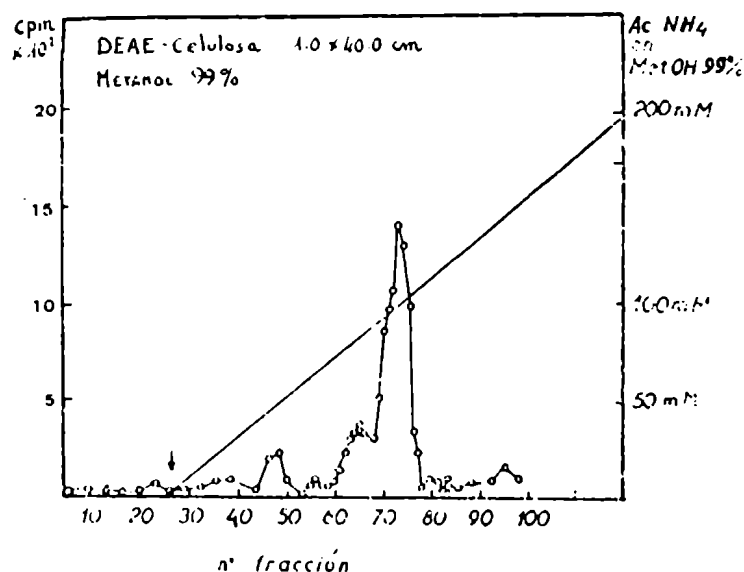


FIGURA 47: Cromatografía de intercambio iónico del lípido-GlcNAc.

vidad permaneció unida a la resina y fue eluida de la misma con un gradiente lineal de acetato de amonio en metanol 99% . Se requirió alcanzar la concentración de 100 mM para la recuperación (80 %) de la radioactividad. Por otra parte una alícuota similar del lip-GlcNAc se pasó por una columna de ácido silícico equilibrada con cloroformo, quedando la radioactividad adsorbida a la misma, debiendo ser eluida con metanol (Tabla 51) .

TABLA 51 : Cromatografía de adsorción en Unisil (ácido silícico) del lípido-GlcNAc

	<u>cpm</u>	<u>% de recuperación</u>
Cloroformo	187	4.0
Cloroformo/acetona anhidra 1:1	42	0.9
Acetona anhidra	889	19.0
Metanol anhidro	2877	62.0
Total recuperado	3495	85.9

Como el comportamiento fue típico de lípido fosforilado, se pasó la sustancia por pequeñas columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa equilibradas con cloroformo/metanol) que habitualmente se usan para discriminar poliprenil derivados. La Figura 48 A, muestra que el

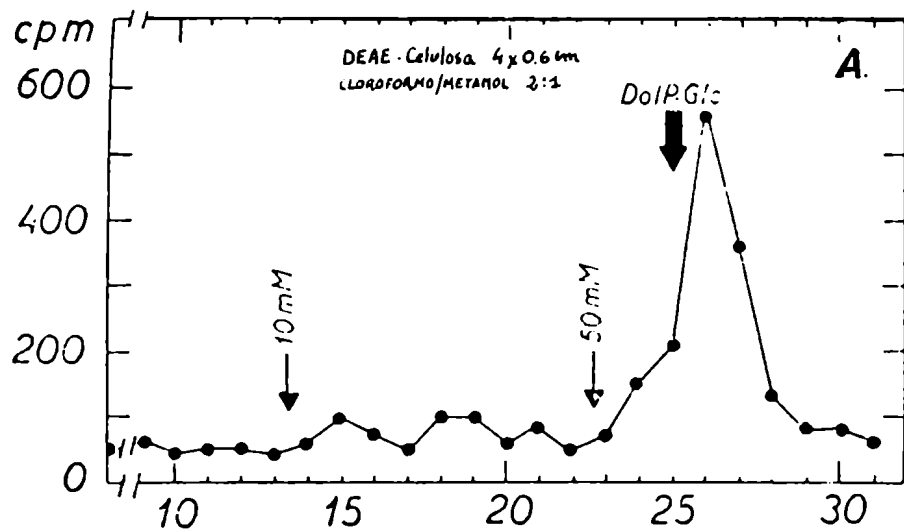
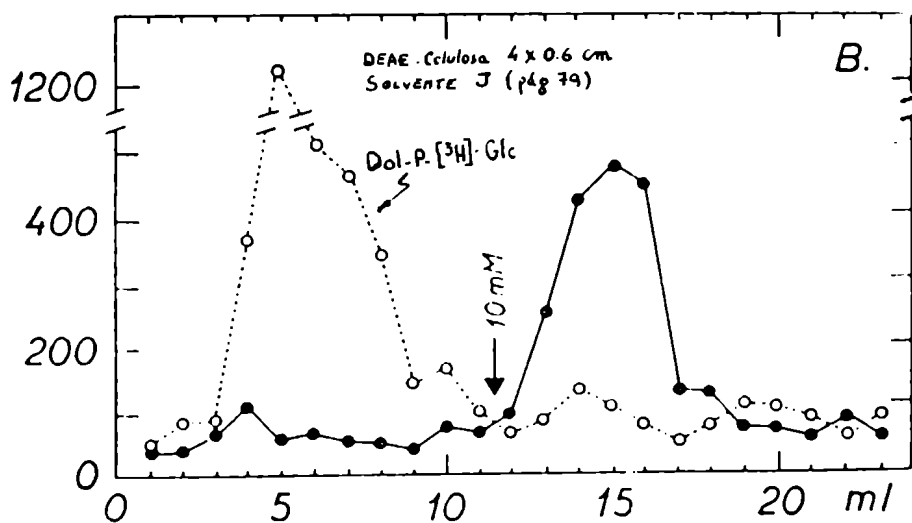


FIGURA 48 : Cromatografía de Intercambio iónico en DEAE-Celulosa del lípido - $[^{14}\text{C}]$ GlnAc

Se procedió como se indica en Métodos (Tabla 30, página 84) 10 mM, 50 mM indica la concentración de acetato de amonio en el solvente. Para propiedades separativas ver Métodos y texto. En B, las fracciones se concentran y se siembran en pequeñas piezas de papel SS 2041a (3 x 0,5) que se secan y se dosan para ^{14}C y ^3H en centileador (Ver Métodos). Figura similar publicada en (180)



glicolípido quedó retenido en la columna y eluyó con una concentración salina de 50 mM.

Se cromatografiaron muestras similares en otras pequeñas columnas de intercambio iónico (DEAE-celulosa equilibrada con cloroformo/metanol/agua 10:10:3). En esas condiciones el dolicol monofosfato glucosa no fue retenido por la resina (Figura 48, B) mientras que los pirofosfato derivados lo son (143). El lípido GlnAc fue retenido y eluyó con 10 mM formiato de NH_4 en 10:10:3 . En las antedichas cromatografías de columna descrip-

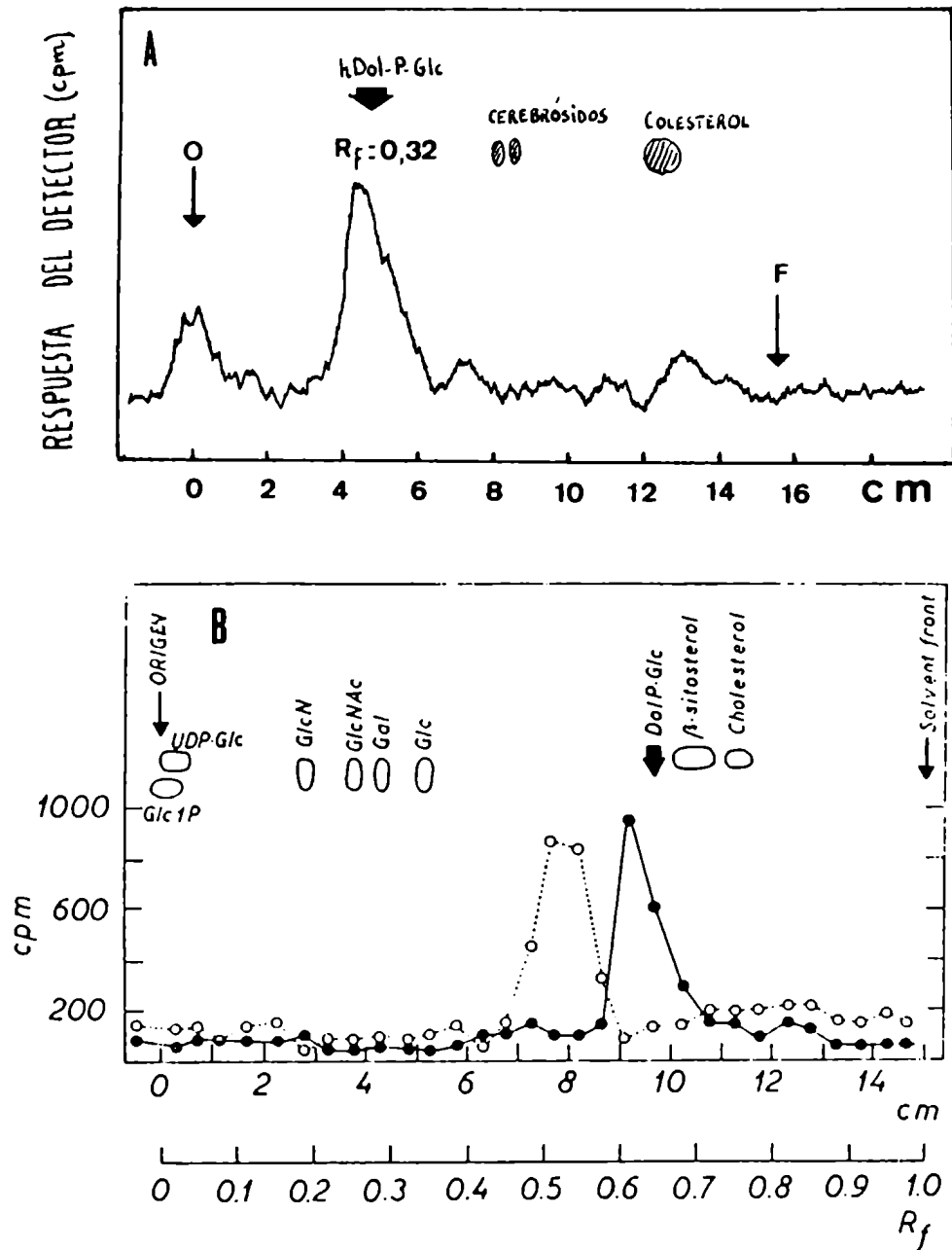


FIGURA 49 : Cromatografía y electroforesis del lípido - GlcNAc

A) Cromatografía en placas flexibles Eastman 6061 (o en papel impregnado con ácido silícico) con el solvente P. Los estándares se tizan con I₂. El Dol-P-Glc se cromatografió en un carril contiguo.

B) Se mezcló el lípido-[¹⁴C]-GlcNAc (●-●) con Fic-P-[³H]-Glc (○-○) (preparado con enzima de hígado) y se lo sembró en placa con soporte de vidrio. La cromatografía se desarrolló a 19-21 °C en cuba perfectamente saturada con el Solvente X. Los estándares lipídicos se revelaron con Rhodamina 6B. Los azúcares y azúcares fosfato con los métodos de Trevelyan y col. (379) y Burton y col. (380) respectivamente. Los nucleótidos se localizan con lámpara U.V. Para localizar la radioactividad se rasparon bandas de 0,5 cm en la cromatoplaque y se extrajeron los glicolípidos que se midieron en centelleador.

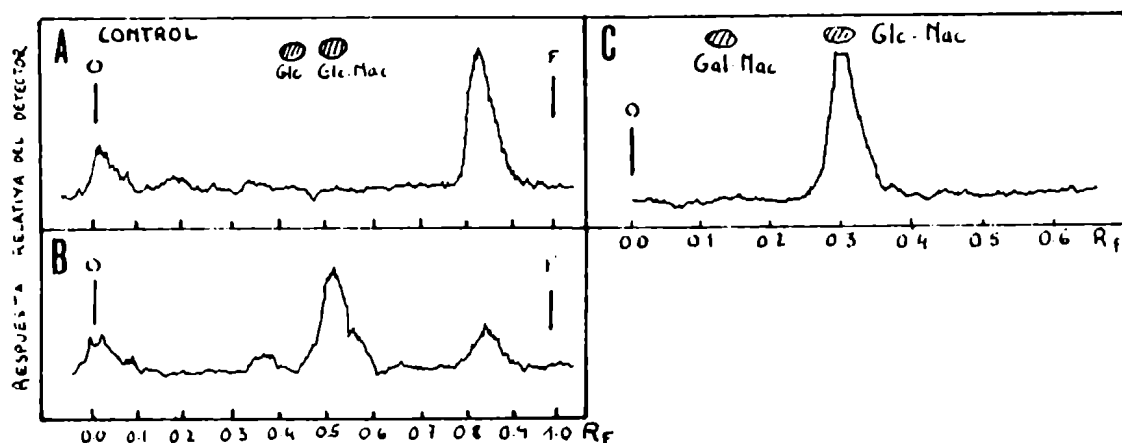
tas, el lípido-GlcNAc se comportó como un poliprenol pirofosfato derivado (135,143).

El lípido-GlcNAc cromatografió en capa fina con el solvente P en la posición esperada para un fosfoglicolípido de cadena isoprenoide (Figura 49, A). La Figura 49, B muestra que el comportamiento cromatográfico fue cercano al de Dolicol - Glucosa de hígado y diferente del FMP-Glc. Ensayando en un sistema experimental de electroforesis en papel en acetato de piridina-Triton X-100-SDS en medio acuoso, el complejo lip-GlcNAc-detergentes migró, separándose del complejo ficaprenol-P-Gal-detergentes. Esto constituyó una indicación indirecta de posibles diferencias en la cadena lipídica y/o en la carga neta de la molécula.

Tratamiento ácido

Por tratamiento ácido suave del lípido-GlcNAc de insecto parte de la radioactividad se hizo hidrosoluble y co-cromatografió con la GlcNAc en el solvente B (Figura 50, A y B).

FIGURA 50 : Tratamiento ácido del lípido-GlcNAc



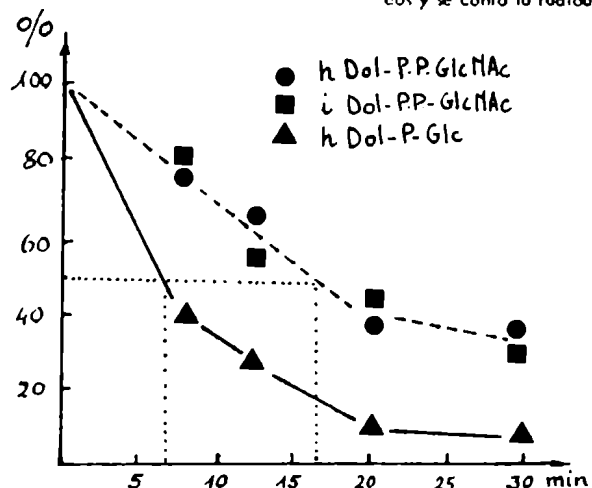
Cromatografía del lípido-azúcar antes (A) y después de la hidrólisis (B) en solvente B. (C) Identificación del GlcNAc por cromatografía en papel impregnado con borato, con el solvente (A).

Para decidir si el azúcar liberado era totalmente o sólo en parte GlcNAc (dado que pueden existir epimerasas) se cromatografió un hidrolizado del lípido en papel impregnado en $0.2\text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ con el solvente A . Como se aprecia en la Figura 50, C toda la radioactividad coincidió con GlcNAc y se distinguió de la GalNAc. Como quiera que en las condiciones estándar de hidrólisis sólo se hidrolizó el 75% del fosfolípido se estudió la labilidad del mismo comparada con la del Dolicol-P-P-GlcNAc sintetizado con hígado de rata y el Dolicol-P-Glc sintetizado de igual modo.

En la Figura 51 se ve que, por razones difíciles de explicar los GlcNAc-lípidos son más

FIGURA 51 : Hidrólisis ácida del lípido-GlcNAc

Se hizo una hidrólisis ácida lábil con HCl 0.015 N a 100°C por los tiempos indicados y se contó la radioactividad remanente en el lípido .



resistentes que el Dol-P-Glc. La velocidad estimada de hidrólisis para el lípido-GlcNAc de insecto es aproximadamente la mitad de la del lip-Glc. Si bien se conoce que el grupo amino parece estabilizar la unión éster en glucosamínidos (104,415) (probablemente debido a la formación del grupo amonio en la molécula), (Ver Behrens y col. (104)) , en los acetil-amino derivados la mayor resistencia es de difícil interpretación. Parte podría ser

atribuible a la sustitución en el C₂ y parte a impedimento estérico que, por ejemplo, dificulta la formación del ión carbonio, intermediario en la hidrólisis ácida de glucósidos.

Tratamiento alcalino

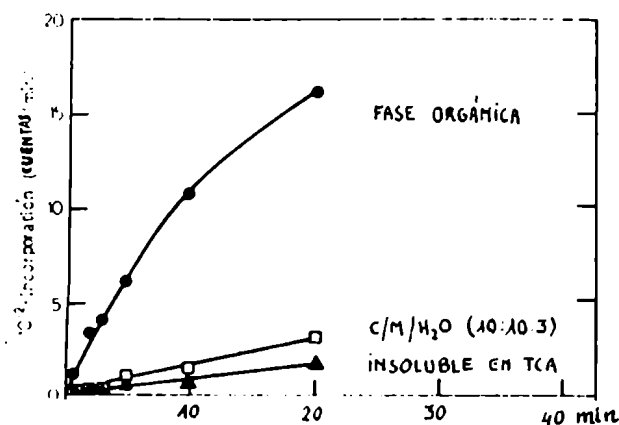
Se sometió el glicolípido a un tratamiento alcalino suave (0.1 N NaOH en cloroformo/metanol/agua 6:4:1 , por 10 min a 37° C). En esas condiciones el glicolípido permaneció estable. Se lo trató con 0.1 N NaOH en n-propanol/ agua 1:1 durante 90 min a 68° C y el líp-GlcNAc se rompió obteniéndose dos sustancias que aparecieron como negativamente cargadas una vez sometidas a electroforesis. Este resultado es idéntico al que se obtuvo tratando en la misma forma el Dolicol-P-P-GlcNAc de hígado y el glicolípido obtenido incubando aceptor de insecto con enzima de hígado (ver capítulo 3.1.2. y Figura 30). Por tratamiento con fosfatasa alcalina se obtuvo N-acetilglucosamina.

De los experimentos precedentes se deujo que el lípido-GlcNAc de insecto es indistinguible de un poliprenol-pirofosfato-GlcNAc similar al que se obtiene con microsomas de hígado.

3.3.2. Propiedades de la enzima transferente de manosa

Las fracciones ricas en microsomas de insecto catalizaron la transferencia de manosa a sustancias solubles en medio orgánico y a glicoproteínas (Figura 52).

FIGURA 52 Incorporación de radioactividad de $\text{GDP}-(^{14}\text{C})\text{Man}$ a diferentes fracciones



Se utilizó la mezcla estándar de incubación, se aislaron los lípidos y se aisló la fracción insoluble en TCA caliente (página 68, Método B). Los precipitados fueron disueltos en Protosol caliente, neutralizados y contados.
Figura publicada en Quesada y Belocipitov (203).

En la Tabla 52 se muestran los efectos de diferentes agregados:

TABLE 52: Condiciones para la incorporación de radioactividad del $\text{GDP}-(^{14}\text{C})\text{Man}$ a la fracción lipídica.

MODIFICACIONES	RADIOACTIVIDAD EN FRACCIÓN LIPÍDICA (CPM)		
	ENDOGENO	+InDol-P	+iDol-P
<u>Experimento A</u>			
Sin Mg^{2+} , mas EDTA 20mM	- - -	147	177
Sin Tritón X-100	798	904	845
Sistema completo	550	9.436	4.906
+ GDP 1mM	- - -	6.667	2.731
+ GMP 1mM	- - -	8.875	4.100
+ Manosa 6 mM	- - -	10.607	5.609
<u>Experimento B</u>			
Ninguna modificación		12.527	
+ GMP 1 mM		11.012	
+ GDP 1 mM		7.509	
+ GTP 1 mM		8.100	
<u>Experimento C</u>			
Ninguna modificación		36.603	
+ Manosa 4 mM		34.059	
+ Manosa 8 mM		32.135	
+ Manosa-1-P, 8 mM		33.177	
Sin $\text{GDP}-(^{14}\text{C})\text{Man}$, mas $(^{14}\text{C})\text{Manosa}$		103	

(A) La mezcla de incubación contenía: Tampón Tris-HCl, pH 7,8, 100mM; 2-mercapto-etanol, 100 mM; $\text{GDP}-(^{14}\text{C})\text{Man}$ 9 μM (60.000 cpm); Triton X-100 0,6%. Los lípidos se llevaron a seco con EDTA-Na, 0,5 micromoles y MgCl_2 , 1,5 micromoles y se añadieron los restantes componentes de la mezcla. Con la proteína enzimática (0,6 mg) de Ceratitis se llevó a un volumen final de 50 μl . Datos publicados en (136). (B) Se utilizó Nonidet P-40 al 0,4% en lugar de Tritón. Se aumentó la cantidad de enzima (2,4 mg. de proteína). (C) Idem B, pero con $1,5 \times 10^5$ cpm de $\text{GDP}-(^{14}\text{C})\text{Man}$. En todos los casos se incubó por 20 min a 25°C. Cada dato es promedio de al menos dos experimentos. B y C se publicaron en (203)

- Lípidos exógenos : En (A) se aprecia que la reacción se estimuló por la adición al medio de incubación de dolicol fosfato de insecto o de hígado de cerdo. El ficaprenol monofosfato de Ficus elastica estimuló igualmente la incorporación, aunque en menor grado. Cantidades crecientes de lípidos exógenos aumentaron la incorporación (Figura 53).

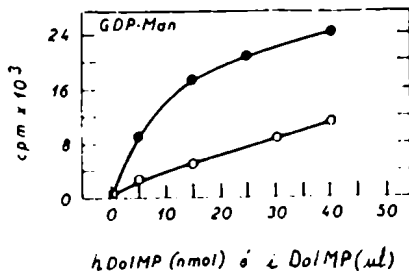


FIGURA 53 : Curva de concentración de sustrato

Condiciones como en Tabla 52 (A) (página anterior). Cada μ l de Dol-P de insecto (círculos abiertos) provino de 80 mg de insecto vivo. Figura publicada en Quesada y col. (135).

- Nucleótidos : En (A) y (B) se muestra que la adición de GDP disminuyó la incorporación de radioactividad a la fracción lipídica sugiriendo que el GDP es uno de los productos de la reacción de transferencia. El GMP no alteró la tasa de incorporación de Man mientras que el GTP fue inhibitorio, probablemente a causa de su conversión a GDP durante la incubación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Tetas y col. (109) en hígado, que describieron la inhibición no-competitiva de la formación del Dol-P-Man por el GDP. También coinciden con Richard y Hemming (111) que obtuvieron la formación de GDP-Man a partir de estos últimos.
- Manosa y Manosa-P : El experimento (C) (Tabla 52) excluyó que la transferencia se haya producido a través de productos de degradación del GDP [¹⁴C]Man : ni la manosa ni la manosa-1-P compitieron con la transferencia y, en las condiciones ensayadas, la

$[^{14}\text{C}]$ Manosa no se incorporó al glicolípido .

- Nucleótidos-azúcar : En experimentos de desplazamiento se vio que (Figura 54) el

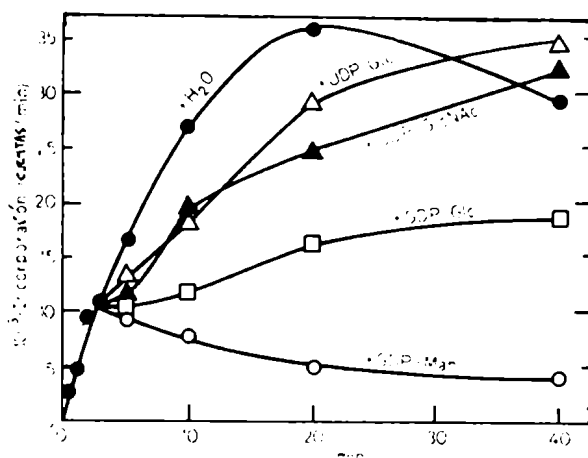


FIGURA 54 : Efecto de la dilución isotópica y de la adición de diferentes nucleótido-azúcares

Condiciones como en Figura 52 (página 133), usando 60 nanomoles de Dol-P de hígado y 0.2 % de Tritón X-100 . A los 3 min de incubación se añadieron 3 μ l de agua o del nucleótido azúcar (1.2 mM final). Figura publicada en Quesada y Belocopitow (203) .

UDP-Glc y el UDP-GlcNAc apenas inhibieron la formación de lípido-manosa mientras que el GDP-Glc fue inhibitorio. Este efecto parece debido a la aparición de GDP como producto de degradación ya que éste y GMP se detectaron en la cromatografía del medio de incubación conteniendo GDP-Glc.

- Detergentes : Cuando se adicionaron lípidos al medio de incubación se necesitó agregar detergentes. Se ensayaron diferentes detergentes neutros y polares, resultando más eficientes los primeros. Las incorporaciones al aceptor endógeno se inhibieron por la presen-

cia de detergente, en forma similar a lo descrito por Tkacz y col. para la enzima de páncreas de bovino (121) .

Se estudió el efecto de la concentración de detergentes no iónicos con respecto a la presencia de 20-30 nanomoles de Dol-P en el medio de incubación . En general, el óptimo se situó en una concentración de alrededor de 0,3 % para una concentración de proteína de 10 mg/ml (Figura 55) .

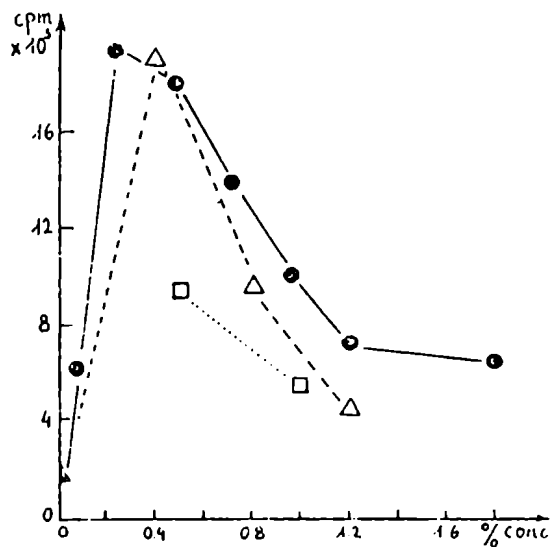


FIGURA 55: Efecto de la concentración de detergentes no polares en la formación del lípido-manosa. (●—●) Tritón X-100 . (Δ----Δ) Nonidet P-40 . (□.....□) Kyro.

Se estudió con más detalle el efecto de Triton X-100 entre 0.1 y 1.0 % de concentración y se observó una curva bimodal (Figura 56) que aparentemente es dependiente tanto del lípido exógeno agregado como de la cantidad de proteína.

Si bien no es posible interpretar este resultado, se conoce un efecto similar para la manosil transferasa de linfocitos humanos (59) . Entre los fosfolípidos ensayados como detergentes, la cardiolipina resultó el más eficiente.

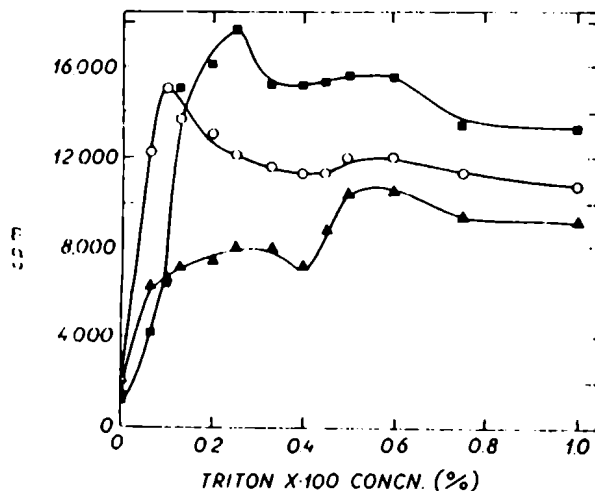


FIGURA 56 : Dependencia de la concentración de Tritón X-100 en la formación del manolípido de insecto. Condiciones estándar de incubación. Dol-P, 3 µl (15 ng en P) y 0.6 mg de proteína enzimática (○-○) . Dol-P 10 µl y 0.6 mg de proteína enzimática (■-■) . Dol-P 3 µl y 6 mg (▲-▲) de proteína. Figura publicada en (136).

- Cationes : La actividad transferásica depende de la presencia de cationes divalentes. Las poliaminas pueden substituirlos y el EDTA en exceso inhibió la transferencia de manosa (Tabla 53).

Tabla 53: Efecto de cationes

<u>ADICIONES</u>	<u>CPM</u>
. Ninguna	2.836
. 10 mM MgCl ₂	9.143
. 10 mM MnCl ₂	10.002
. 20 mM EDTA.Na	356
. 6 mM Putrescina	6.773

Condiciones estándar. Tabla publicada en Quesada y col (203)

A menores concentraciones de EDTA, sin embargo, se observó una estimulación parcial. Este efecto se ha descrito también en (89) y quizás se a debido a problemas de

conformación de membrana.

La concentración óptima para Mg fue de 10 mM como se aprecia en la Figura 57. El Mn^{2+} y el Co^{2+} , en esas condiciones fueron menos eficientes. Por resultados previos se

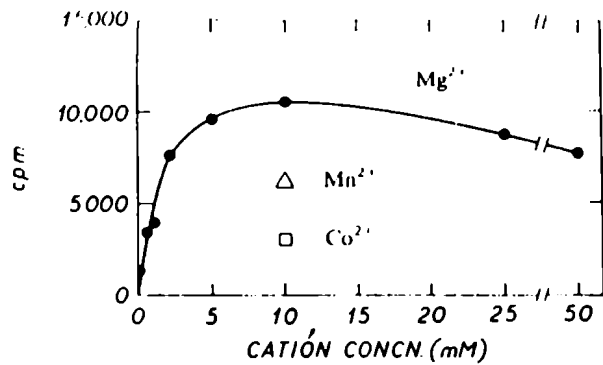


FIGURA 57 : Curva de concentración de Mg^{2+} . La mezcla de incubación estándar contenía 30 ng en P de Dol-P⁻ y 0.1 mg de proteína enzimática. Figura publicada en (136).

estimó la concentración endógena de cationes divalentes en la preparación de membranas en alrededor de 1 mM .

El efecto de la variación de pH en la manosil transferasa se aprecia en la Figura 58 (ver página siguiente) .

El pH óptimo es de alrededor de 8.0 . Este valor es más alto que el encontrado para enzimas de vacuno (121-5) e hígado de rata (416) , aunque en esta última Leloir y col. (datos no publicados) han obtenido un pH óptimo de 7.8 - 8.0 . También un pH de 8.0 se encontró para la manosil transferasa de linfocitos humanos (59, 122) . Los óptimos aparentes de pH quizás tengan que ver con el tampón empleado y con el grado de fluidez de las mezclas de incubación.

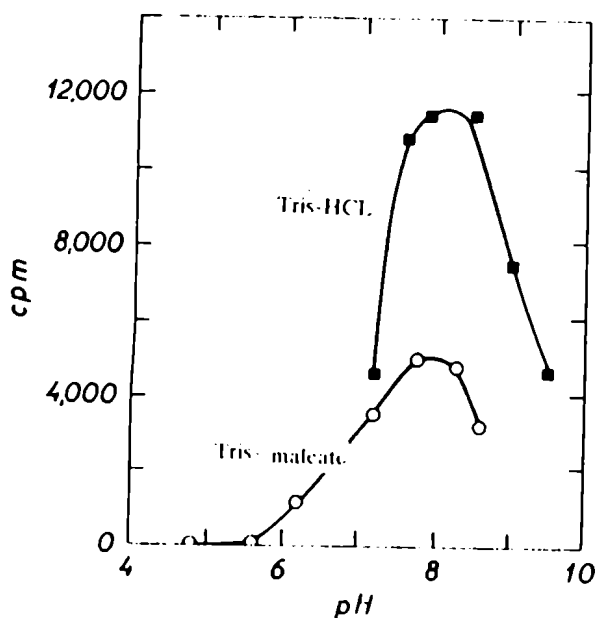


FIGURA 58 : Curva de pH para la formación de Dol-P-Man. La mezcla de incubación estándar contenía 0.1 mg de proteína enzimática. Figura publicada en (136) .

Concentración de proteína enzimática

Como se aprecia en la Figura 59 la incorporación de manosa al Dol-P es función lineal

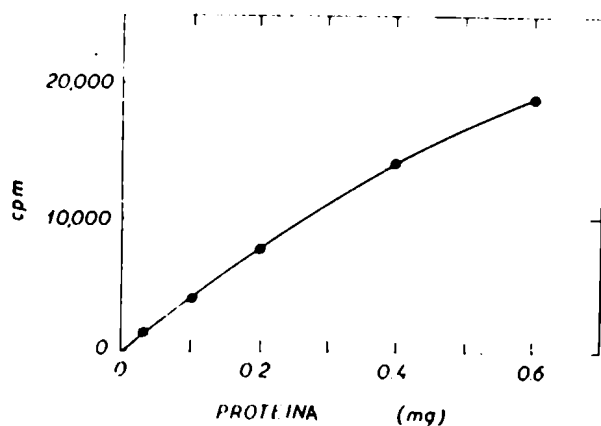


FIGURA 59 : Formación del manolípido en función de la concentración de enzima

Condiciones estándar excepto para el tiempo de incubación que fue de 5 min. Figura publicada en (136) .

de la concentración de enzima.

Cinética

La cinética de incorporación de marca radioactiva a glicolípidos endógenos y exógenos se grafica en la Figura 60 .

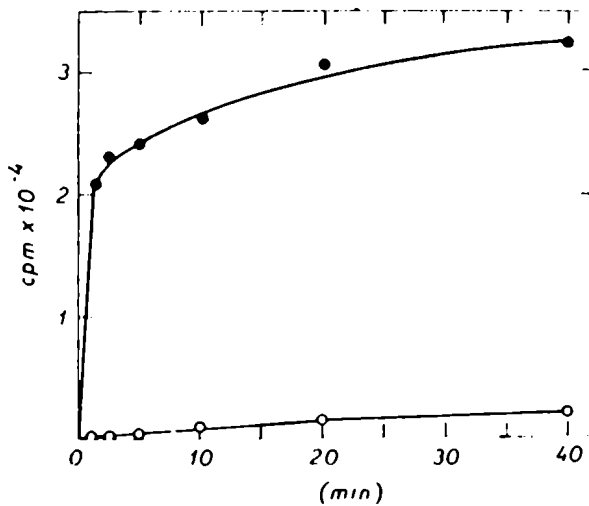


FIGURA 60 : Formación del manolípido en función del tiempo

(○-○) aceptor endógeno (●-●) más Dol-P de insecto (cantidad obtenida a partir de 38 mg de insecto vivo). Las incubaciones contenían 5,7 mg de proteína enzimática. Figura publicada en (136) .

La incorporación creció por lo menos hasta los 40 min cuando en el ensayo se utilizaron 5 mg de proteína enzimática. En otros sistemas (124,115,116) la incorporación decae rápidamente debido a la acción de las hidrolasas por una parte y de las transferasas por otra (118) .

Temperatura

En la Figura 61 se ve que la temperatura óptima para la transferencia fue de 25° C , como era de esperar en un organismo poiquilotermo y a semejanza de lo descrito para hongos (33) y plantas, ^(34,417) En los organismos homeotermos la temperatura óptima para la manosiltransferasa oscila alrededor de los 30° C .

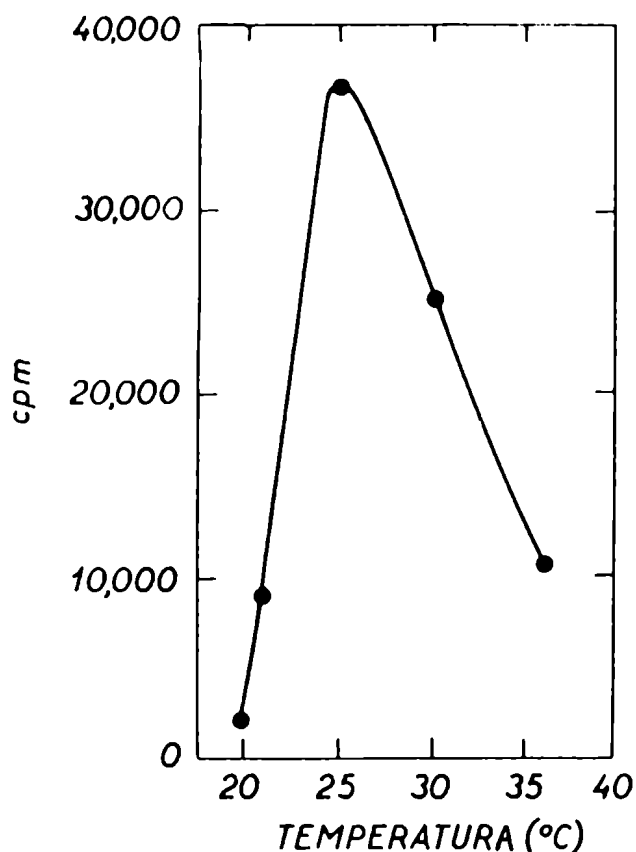


FIGURA 61 : Dependencia de la temperatura en la formación de Dol-P-Man

Condiciones estándar con 0,5 mg de proteína enzimática. Figura publicada en (136).

Propiedades del lípido manosilado

El extracto cloroformo/metanólico de las incubaciones con GDP- ^{14}C - Man , se cromatografió en columna de ácido silícico activado (cromatografía de adsorción). La acetona, que eluye los glicolípidos neutros en este tipo de columna (395,397) no eluyó las sustancias radiomarcadas. La radioactividad se recuperó en el eluato de C/M/H₂O, como se aprecia en la Figura 62, en forma similar a como se comporta el Dol-P de hígado de vaca (328) y otros glicero-fosfolípidos (397,418).

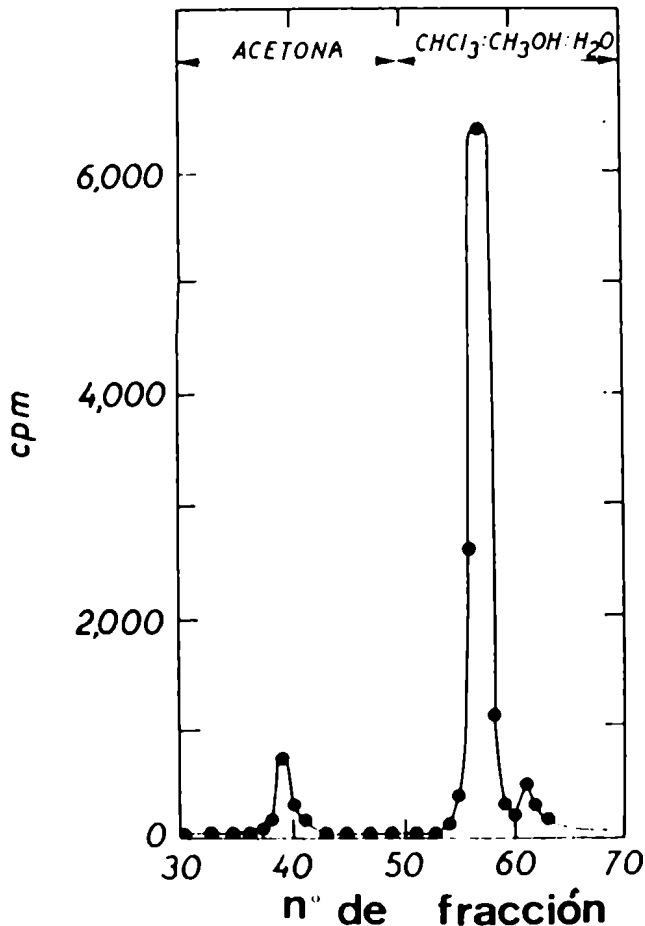


FIGURA 62 : Cromatografía en ácido silícico del Dol-P-Man de insecto

El lípido obtenido en diferentes experimentos se introdujo en una columna de Unisil de 1.0 x 12.0 cm, tras lo cual se eluyó ésta con 80 ml de cloroformo y se continuó como indica la figura. Cada fracción fue de 4 ml. Figura publicada en (136).

Se sometió el dolicol de insecto manosilado a cromatografía de intercambio aniónico, en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con MetOH 99% , en la forma descrita por García y col. (359). El manofosfolípido fue retenido por la resina y eluyó a una concentración salina de 50 mM cuando se aplicó un gradiente de AcONH₄ en Metanol 99% a la columna. Otros poliprenil manofosfato derivados se comportan en forma similar en este tipo de columnas (118).

En algunas cromatografías se observó que alrededor de un 7-8% de la radioactividad ligada a la columna de DEAE permaneció en ésta hasta que la concentración de sal alcanzó los 100-110 mM, Ese es el comportamiento esperado para los poliprenil pirofosfato azúcares.

Se cromatografiaron los manolípidos radiomarcados obtenidos en diferentes experimentos,

pasándolos por pequeñas columnas de DEAE-celulosa equilibradas con cloroformo/metanol 2:1 y eluidos con el mismo solvente y con cloroformo/metanol 1:1. Se continuó la elución con C/M/H₂O 10:10:3. En este tipo de columnas los dolicol-monofosfato-azúcares no son retenidos por el DEAE (quizás debido a la poca cantidad de sitios de intercambio y a las trazas de sales). Los dolicol pirofosfato derivados, sin embargo, quedan unidos a la columna (143).

En la Figura 63 se ve que el lípido-manosa no fue retenido por la columna (Pico I),

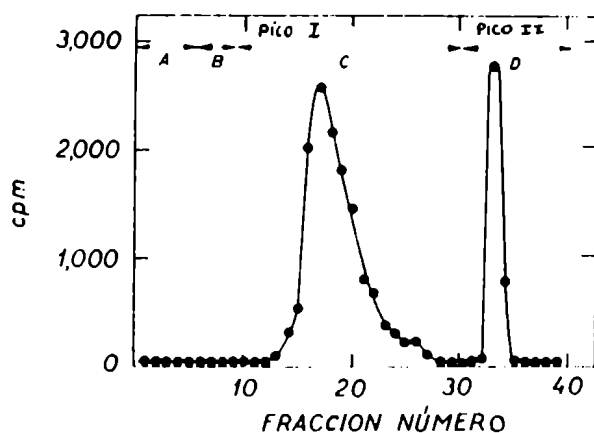


FIGURA 63 : Cromatografía en DEAE-Celulosa del manolípidio

Se procedió como se explica en página 84. Después de colocar la muestra la columna (de 0,6 x 3.0 cm) fue eluida con : 32 ml de cloroformo/metanol (2:1) (A); 12 ml de cloroformo/metanol (1:1) (B); 84 ml de solvente J (C) y luego (D) 40 ml de formiato de amonio en el mismo solvente (J). Cada fracción fue de 4 ml. Figura publicada en (136).

de acuerdo a lo esperado. Una pequeña cantidad de sustancias radiomarcadas eluyó solamente cuando se pasó una solución 30 mM de acetato de NH₄ en C/M/H₂O 10:10:3 por la columna (Pico II).

La sustancia radiomarcada, sometida a diferentes análisis, se comportó como poliprenil difosfato oligosacárido y su estudio se detalla en el capítulo 3.4.

Peso molecular del glicolípido

Se estudió el peso molecular aparente del lípido fosfato manosa en columnas de filtración de Sephadex G-150 equilibradas con deoxicolato Na, según el método de Behrens y col.

(143). El Dol forma compuestos de inclusión con los lípidos y se ha calculado (143,419) que el número de moléculas de DOC combinadas depende de la longitud del lípido.

En la Figura 64 se aprecia que el volumen de elución del ficaprenol monofosfato glucosa difirió del dolicol de insecto manosa en 8.5 ml mientras que este último sólo difirió en 1.4 ml

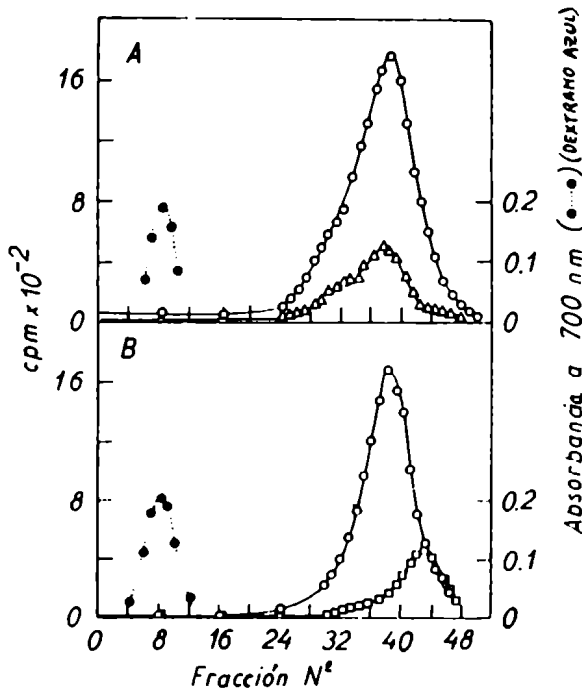


FIGURA 64 : Peso molecular del Dol-P-Manosa de Insecto

Se utilizó una columna de Sephadex G-150 de 1,2 x 90 cm equilibrada con Tampón Fosfato de Na 50 mM (pH 7.2) conteniendo deoxicolato Na al 0,5 %. Las primeras determinaciones fueron realizadas exclusivamente por el doctor Leloir, Director de esta Tesis, tras lo cual fueron repetidas por el autor. La figura se publicó en (136).

A) Mezcla de hDol-P- $[^3\text{H}]$ Glc (Δ - Δ) e IDol-P- $[^{14}\text{C}]$ -Glc (\circ - \circ)

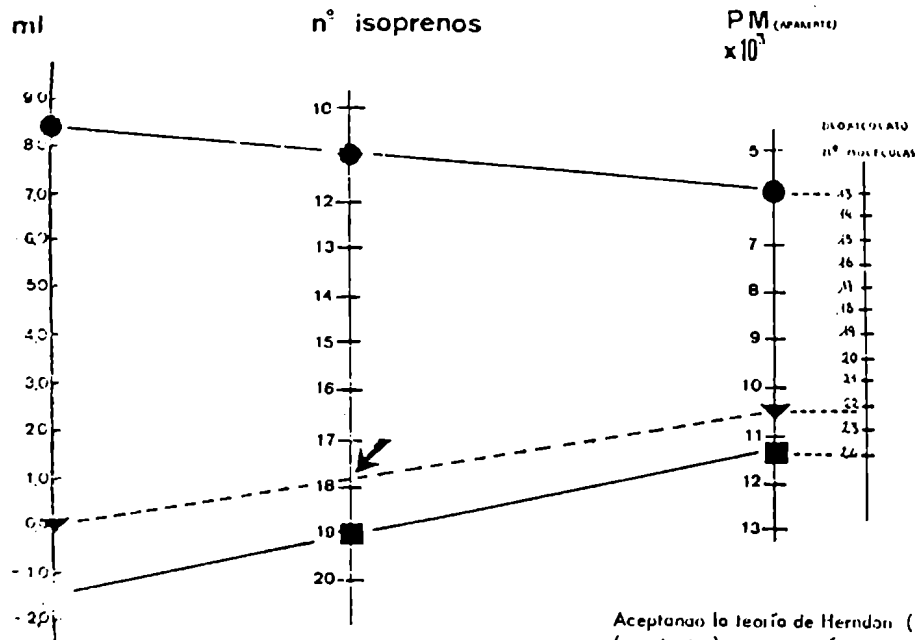
B) Mezcla de este último y Fic-P- $[^3\text{H}]$ Glc (\square - \square)

del dol-P-Glucosa de hígado.

Teniendo en cuenta que el Peso Molecular aparente para los complejos (DO1-P-Glc)-

deoxicolato es de 11.300 (143) y para (FicP-Glc) - deoxicolato de 6.143, el Peso Molecular aparente para el lípido-manosa de insecto es de 10.567. Ese Peso Molecular aparente correspondería aproximadamente a un poliprenol de 18 isoprenos, con 22,5 moléculas de DOC unidas (Figura 64').

FIGURA 64' : Nomograma para el cálculo del tamaño aparente del Dol-P-Man de insecto



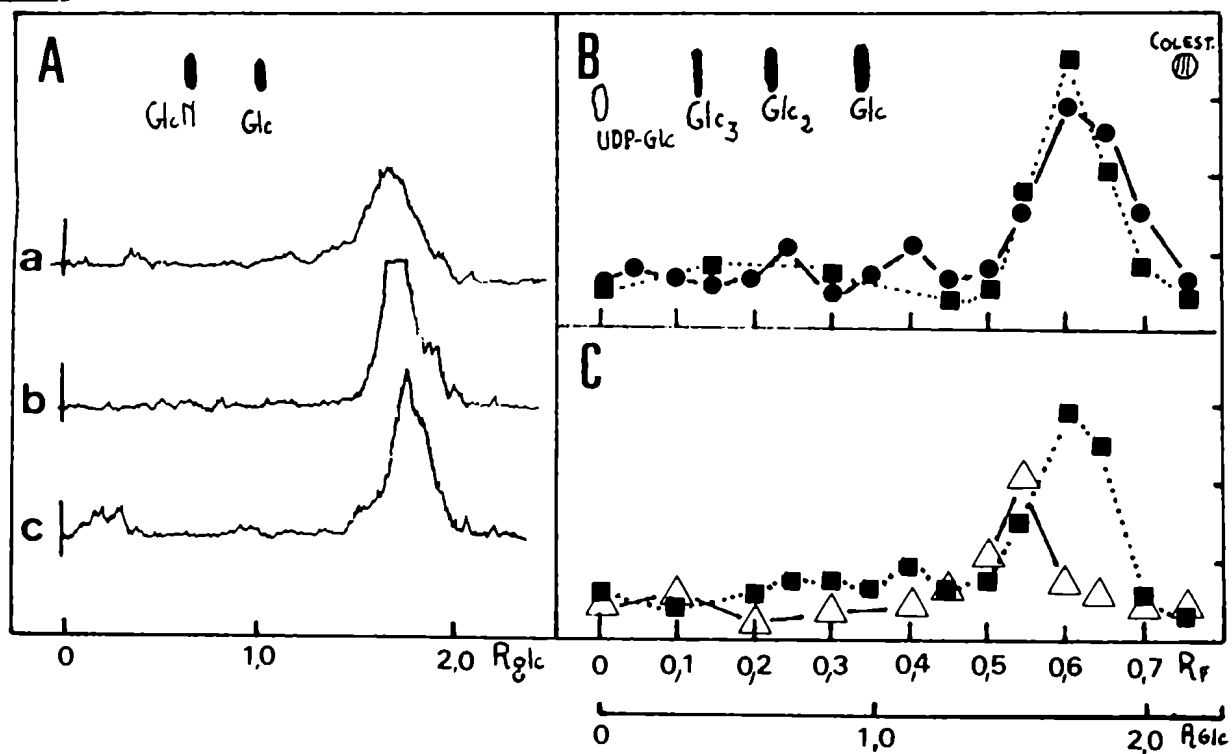
Aceptando la teoría de Herndon (419) y los cálculos de Belrens y col. (143) (ver texto) se construyó un nomograma para relacionar volumen de separación (ml) en la columna, con respecto a estándares, con el n° de isoprenos y con el peso molecular aparente. Los signos - y + indican el volumen de sustancias eluidas antes o después de la incógnita (◯) ; en este caso el (▼) ; Dol-P-Man. (● - ●) Fic-P-Glc ; (■ - ■) Dol-P-Glc

Esto coincide con los datos de cromatografía en capa fina, fase reversa, para el presunto dolicol de insecto (ver página 106) y (28).

Por otra parte cuando se preparó manolípido de insecto y se lo comparó en cromatografía de capa fina con Dolicol-P-manosa preparado tanto con enzimas de hígado de rata como con extractos de insectos, resultaron indistinguibles ($R_{Glc} = 1.82 - 1.98$) (Figura 65 A).

El manolípido co-cromatografió también con Dol - P- $[^3H]$ Glc ($R_{Glc} = 1.85$) (Figura 65 B) y se separó netamente del FicP- $[^3H]$ -Glc ($R_{Glc} = 1.60$) (Figura 65 C).

FIGURA 65: Comportamiento cromatográfico del Dol-P-Manosa de insecto



En todos los casos se utilizó el Solvente X en cubas muy bien saturadas; cromatografiando en placas de vidrio de Sílica Gel G a una temperatura de 18-21°C. (A) Movilidad del Dol-P-Man (lípidos de insecto) glicosilado con enzima de insecto (a) comparada con la del hDol-P-Man (lípidos de hígado/enzima de hígado) (b) y con la del hDol-P-Man preparado con enzima de insecto (c). (B) y (C) (●-●) hDol-P-(3H)-Glc (■-■-■) Dol-P-(¹⁴C)Man; (Δ-Δ) Fic-P-(3H)Glc. Colest=colesterol. Glc₂=maltosa, Glc₃=maltotriosa.

Tratamientos ácido y alcalino

Los derivados de manosa del dolicol fosfato de insecto y del Dol-P de hígado, sintetizados por enzimas de Ceratitis se trataron con ácido (0.01 HCl a 100° C por 20 min).

El 95 % de la radioactividad se hizo hidrosoluble (Tabla 54).

TABLA 54: Sensibilidad al ácido y al álcali del iDol-P-Man.

TRATAMIENTO	hDol-P-(¹⁴ C)Man		iDol-P-(¹⁴ C)Man	
	FASE SUP.	FASE INF.	FASE SUP.	FASE INF.
	CPM			
NINGUNO	164	2.002	176	2.056
ACIDO SUAVE ¹	2.032	176	2.064	189
ALCALINO SUAVE ²	246	2.106	171	2.214
ALCALINO FUERTE ³	2.057	314	2.015	319

Después del tratamiento el material hidrolizado se separó según el método de Folch y col (355) y se lavó cada fase (pág.66). 1) Método 2.13.1.a (pág.69) ; 2) Método 2.13.2. c (pág.72); 3) idem ,e,pág 72.Tabla publicada en (136) .

Se identificó el azúcar liberado como manosa en diferentes sistemas cromatográficos, como se aprecia en la Tabla 55 .

TABLA 55: Identidad del resto liberado del aparente lípido-Manosa de insecto.

SUSTANCIA	SOLVENTES						
	A	B	C	D	H	(1)	(2)
	R_{Glc}						
.Galactosa	0.87	0.93	0.82	--	--	0.92	0.93
.Manosa	1.20	1.06	1.26	1.04	1.03	1.18	1.45
:(¹⁴ C) liberado	1.19	1.06	1.25	1.05	1.04	1.19	1.45
.Maltosa	0.69	0.85	0.48	0.60	0.87	0.61	--
.GlcNAc	1.42	1.13	1.39	1.26	1.12	--	--
.Fructosa	1.17	--	--	--	--	1.15	--

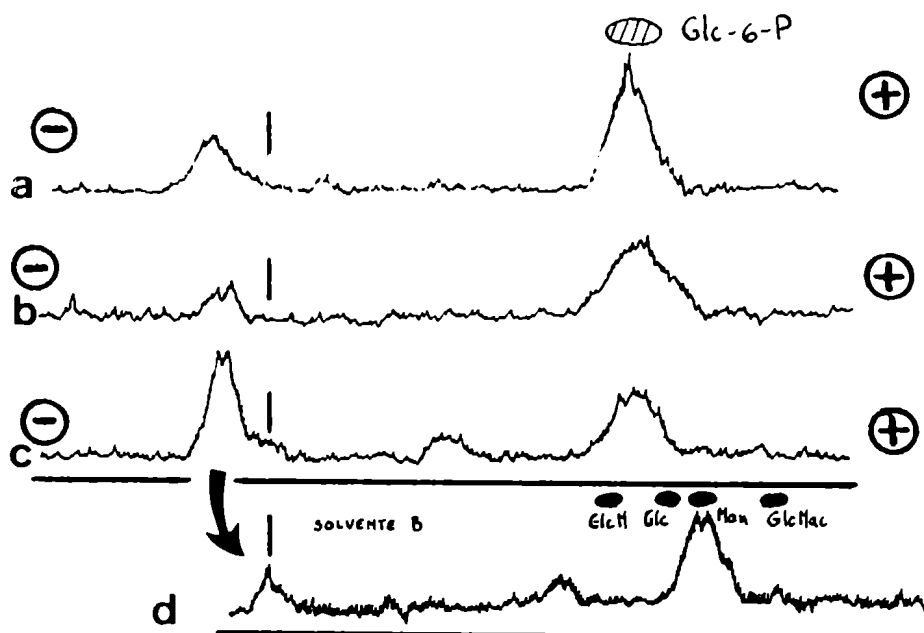
A a H indican los solventes detallados en métodos (pág.76). (1) Butanol/ piridina/Agua (9:5:7); (2) Acetona 94%/Agua 6% . En todos los casos, salvo en el solvente C, se cromatografió en forma descendente.

Se sometió el iDol-P [¹⁴C] Man a tratamiento alcalino usándose el hDol-P P [¹⁴C] Man como control. Ambos resistieron el tratamiento suave (Tabla 54) mientras

que el tratamiento energético tornó toda la radioactividad hidrosoluble (Tabla 54).

Este material se comportó como un azúcar monofosfato en electroforesis (Figura 66, a).

FIGURA 66 : Identificación del producto originado por hidrólisis alcalina



Las electroforesis se realizaron con el Tampón I (página 77) a pH 6.5. a) producto del tratamiento alcalino b) tratamiento ácido del anterior (ver texto) c) pico de b tratado con fosfatasa d) cromatografía en papel del pico "neutro" de c con el solvente B

Tratado con 0.1 N HCl por 7 min a 100° C y sometido nuevamente a electroforesis volvió a comportarse como azúcar-fosfato (b). Se eluyó la sustancia resistente a hidrólisis ácida del papel y se trató con fosfatasa alcalina de *E. coli*. El tratamiento transformó lo esencial del compuesto radiomarcado en manosa ^{14}C (c) según se comprobó por cromatografía en papel con diferentes solventes (d).

Los resultados obtenidos excluyen la posibilidad de que el fosfato unido a manosa se encuentre en la posición 1. En cambio, la resistencia al ácido indicaría que el produc

to del tratamiento alcalino es manosa-2-fosfato que se había originado vía manosa 1,2 fosfato cíclico. La formación de éste, sólo puede explicarse si el fosfato en el manolípido se encuentra unido a la manosa en posición β (69).

Tratamiento fenólico

Este tratamiento rompe la unión entre fosfato y lípido en los derivados de alcoholes alílicos (359). Como muestra la Tabla 56, la $[^{14}\text{C}]$ Manosa se liberó del ficapre-

TABLA 56 : Tratamiento fenólico del lípido de Ceratitis manosilado

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	
	cpm	capa acuosa cpm	capa fenólica cpm
Lípido endógeno de <u>Ceratitis</u> ^a manosilado	1.298	69	1.204
lDol-P manosilado ^a	2.402	192	1.920
hDol-P-Man ^b	2.401	202	2.227
Fic-P-Man ^b	1.809	1.469	201

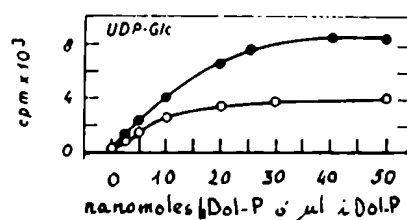
Se realizaron incubaciones estándar y se aislaron los poliprenil-derivados. a) preparados con enzima de insecto b) preparados con enzima de hígado. Se utilizó el procedimiento de García y col. (359) (ver página 70) calentando en fenol durante 3 hs. y separando luego las fases para contar en centelleador. Tabla publicada en (136).

no monofosfato $[^{14}\text{C}]$ Manosa tratado con fenol caliente mientras que tanto el manolípido de insecto como el hDol - P $[^{14}\text{C}]$ Manosa resistieron el tratamiento. Este resultado es indicativo de que el lípido de insecto es un poliprenol α -saturado, luego sería el dolicol fosfato de insecto.

3.3.3. Dolicol fosfato glucosa de insecto

La transferencia de glucosa desde UDP-Glc para formar Dol-P-Glc se estimuló tanto por adición de Dol-P de hígado como del análogo de insecto (Figura 67). En la Tabla 47,

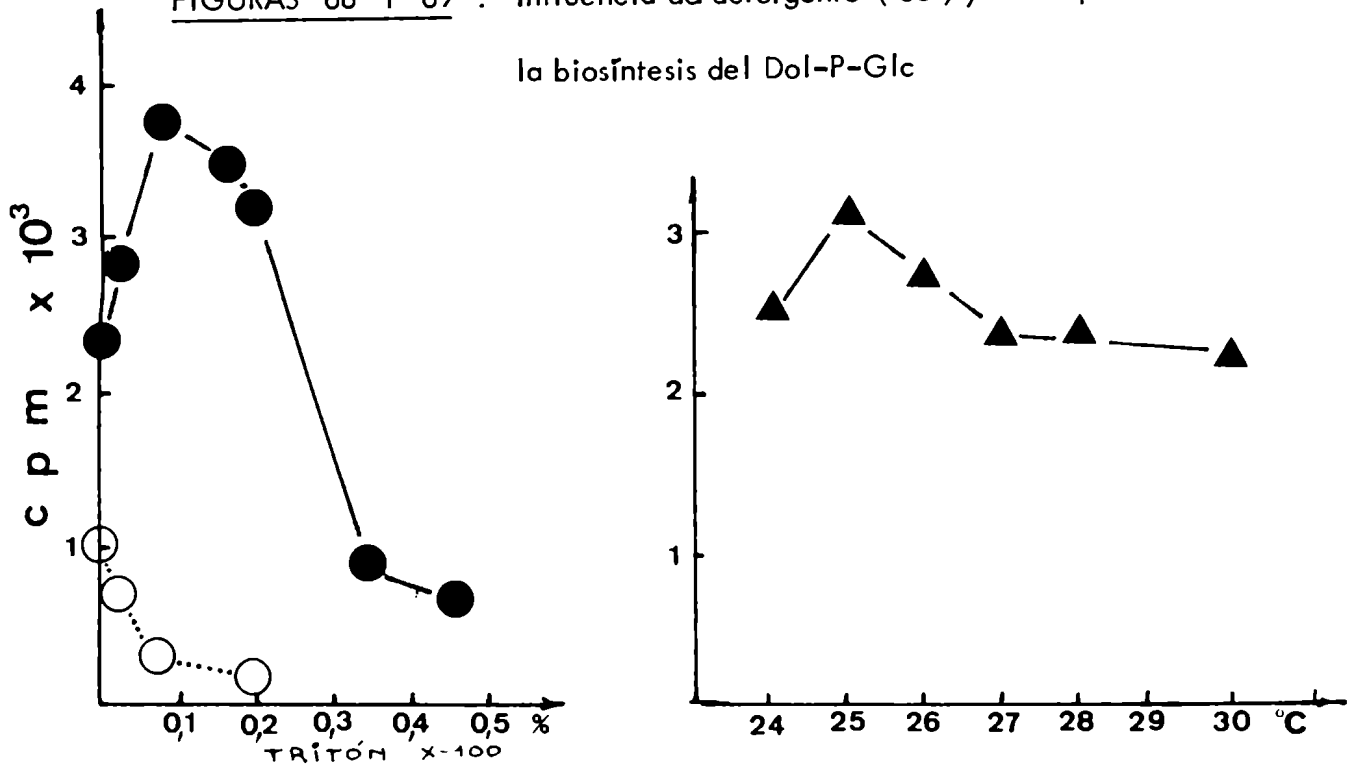
FIGURA 67 : Transferencia de glucosa de UDP-Glc a aceptores lipídicos



Se utilizaron condiciones estándar (Métodos) (•—•) hDol-P; (°—°) iDol-P (cada microlitro corresponde a 2 g de insecto vivo) . Figura publicada en Quesada y col. (135) .

página 122 , se mostraron los requerimientos para la incorporación. La omisión de Mg o Mn²⁺ y el añadido de EDTA no eliminó totalmente la incorporación de Glc a material liposoluble. Esa incorporación se ha interpretado provisoriamente como una síntesis de esteroides-glucósidos dado que la sustancia radioactiva cuya síntesis fue insensible a EDTA apareció como neutra en columnas de intercambio iónico y no resultó degradada por el tratamiento ácido típico para romper poliprenil-azúcares. El añadido de detergentes se hizo necesario cuando se agregaron lípidos exógenos y se ve en la Figura 68 (ver página siguiente) que el óptimo para Tritón X-100 se situó en 0,1 % . La temperatura óptima para la transferencia fue de 25° C y la actividad máxima se obtuvo con Tris-HCl a un pH de 7.4 (Figura 69) .

FIGURAS 68 Y 69 : Influencia del detergente (68) y la temperatura (69) en la biosíntesis del Dol-P-Glc



(● - ●) y (▲ - ▲) , incubación en presencia de Dol-P . (○ -- ○) endógeno

En la Figura 70 se observa (ver página siguiente) la curva de concentración de proteína enzimática. Es de hacer notar, sin embargo, que las incorporaciones a lípidos exógenos fueron muy sensibles a las concentraciones relativas de detergente en la mezcla de incubación por lo que las curvas de este tipo tienen un valor limitado. El gráfico de incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Glc a Dol-P-Glc, en función del tiempo llegó a una meseta en 10 min, lo que podría sugerir una posible transferencia de Dol-P-Glc a otras fracciones (Figura 71) .

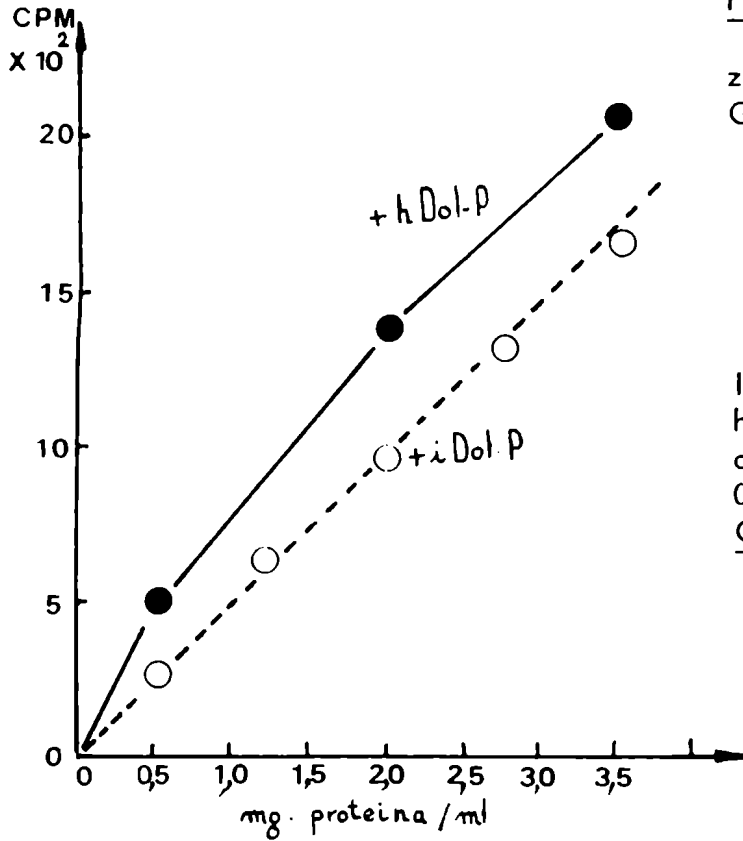
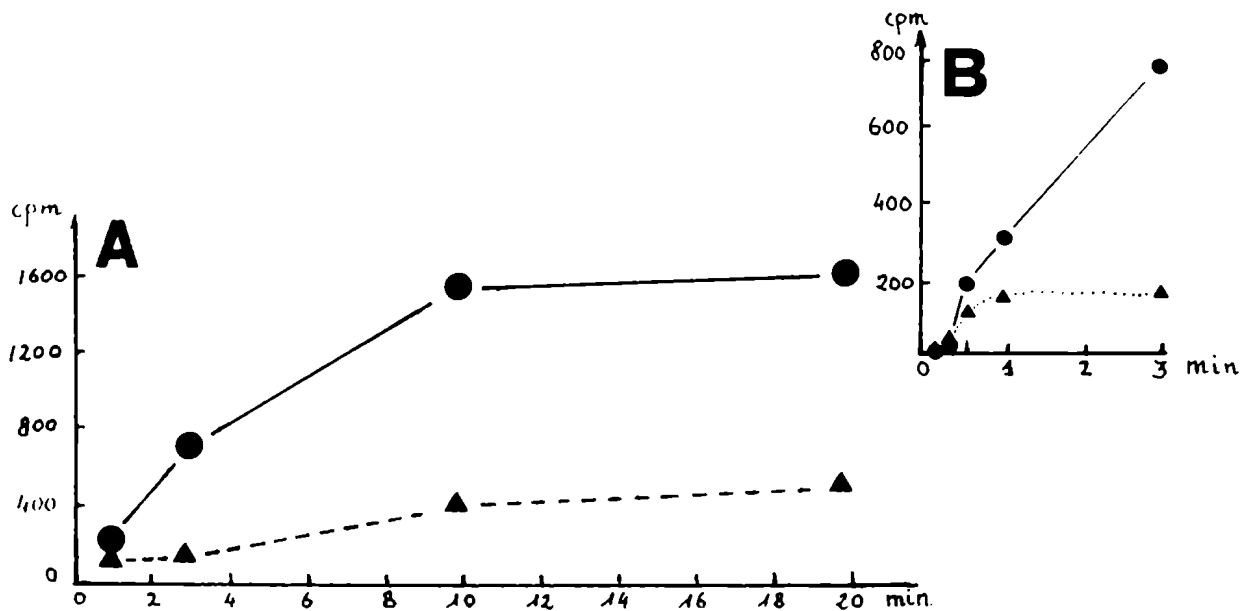


FIGURA 70 : Efecto de la concentración de proteína en zimática en la biosíntesis de Dol-P-Glc

Incubaciones estándar conteniendo hDol-P (15 nanomoles de fosfato) o iDol-P (cantidad obtenida de 0,3 g de insecto vivo). Enzima de Ceratitis .

FIGURA 71 : Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Glc en función del tiempo

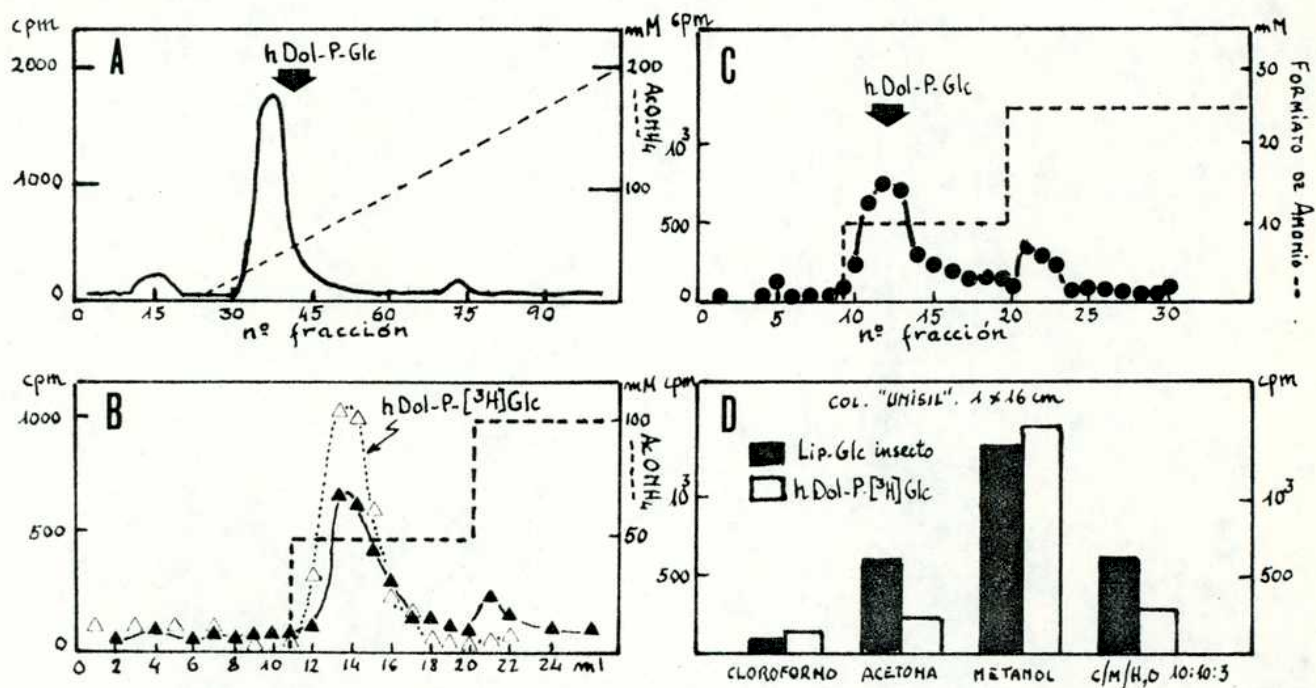


Círculos : incorporación a lípido-Glc sensible a hidrólisis ácida suave . Triángulos : incorporación a material insoluble en TCA caliente . B) : expansión de A) en la zona de 0-3 minutos .

Propiedades

En la Figura 72 se aprecia el comportamiento del líp- $[^{14}C]$ Glc en columnas en columnas

FIGURA 72 : Comportamiento cromatográfico del Lip-Glc de insecto



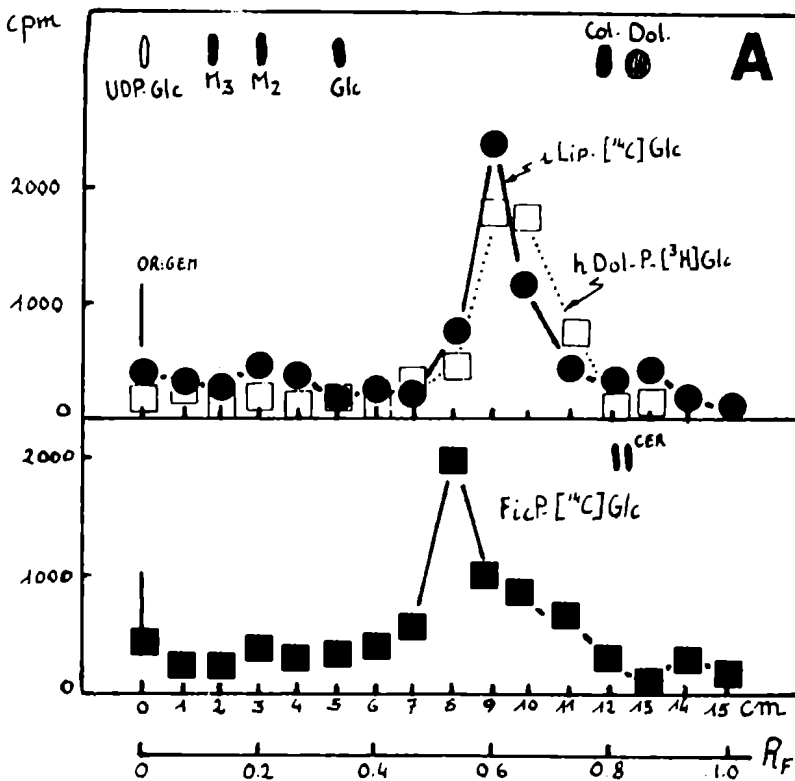
A) B) C) Cromatografías en DEAE-Celulosa forma acetato. Ver texto y Métodos . B y C fueron microcolumnas (0,6 x 4,0 cm). La concentración salina en ordenadas se refiere a los gradientes continuo (A) o discontinuos (B y C) de elución . D) Cromatografía de adsorción en ácido silícico (Métodos) . Las eluciones se efectuaron pasando 10 vol de columna de cada solvente .

cromatográficas de intercambio iónico/Met 99%(A) ; 2:1 (B) y 10:10:3 (C) y en cromatografía de adsorción (D) . En todos los casos el lípido Glc se comportó como el hDol-P $[^3H]$ Glc obtenido con hígado de mamífero.

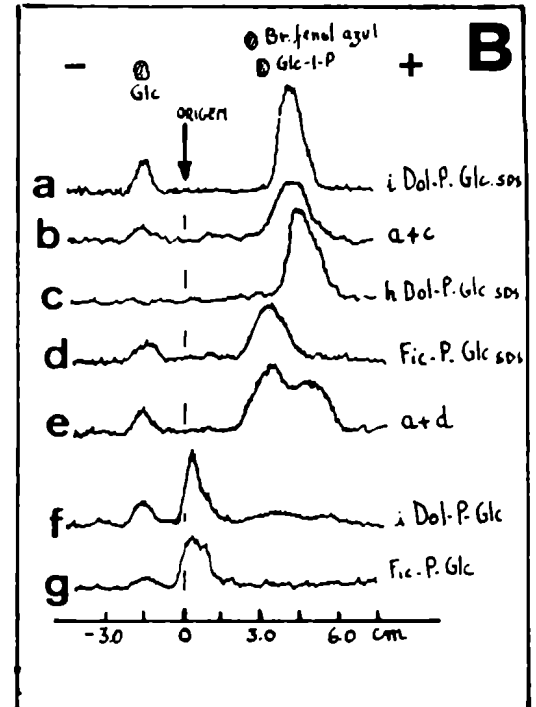
El análisis cromatográfico en capa fina con diferentes solventes mostró también (Figura 73, A) que el iDol-P-Glc obtenido con microsomas de insecto cromatografió como el Dol-P-Glc y se distinguió claramente del Ficaprenol-P-Glc. En electroforesis experimental en

presencia de detergentes se comprobó la misma semejanza al Dol-P-Glc y separación de Fica-P-Glc (Figura 73, B).

FIGURA 73 : Comportamiento del Lip-Glc



A) Cromatografía en Sílica gel "G" con el solvente X de la mezcla de derivados de dolicol (arriba) en paralelo con Fica-P-Glc (abajo).

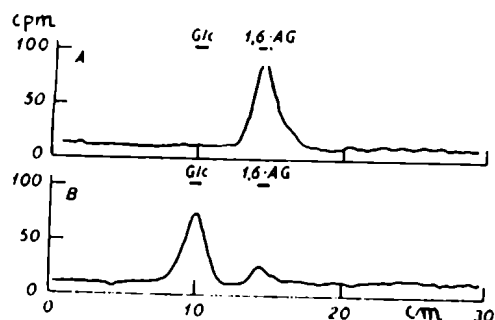


B) Cromato-electroforesis en Timpón I con SDS 0,4%. El papel (húmedo) estuvo ligeramente inclinado (10°) hacia el ánodo; se sembró sobre él los lípidos-azúcares (f y g) o éstos incubados previamente con SDS 0,4% en el Tampón (a, c y d) o las mezclas de éstos últimos (b y e). Se realizó la electroforesis entre vidrios silicados. Se mantuvo un campo de 42 Volt/cm.

La hidrólisis ácida suave del glicolípidio liberó únicamente glucosa, que se identificó en diferentes solventes. El tratamiento alcalino suave (ver capítulo 3.3.2.) no degradó el glicolípidio, que se hidrolizó parcialmente cuando se elevó la temperatura. En este último caso se liberó una sustancia hidrosoluble que migró como 1,6-anhidroglucosano, como se ve en la Figura 74 , A . Esta última sustancia se obtuvo también en la hidrólisis del Dol-P-Glc de hígado donde la glucosa está unida como anómero - β . Como era de esperar, la hidrólisis del producto de tratamiento alcalino con 0.5 N H₂SO₄ produjo glucosa libre

(Figura 74, B) .

FIGURA 74 : Tratamiento alcalino del glucolípido



A) Cromatografía en papel con el Solvente E
 B) Se eluyó el pico radioactivo de (A) y se trató el material con $0.05 \text{ H}_2\text{SO}_4$ por 2 hs a 100°C , se neutralizó y se cromatógrafió en el mismo sistema. Figura publicada en Quesada y col. (135) .

El lípido-Glc resultó estable al tratamiento con fenol, a semejanza de lo que sucede con otros poliprenil-derivados α -saturados (60,359) . En la Tabla 57 se aprecia que todos

TABLA 57 : Tratamiento con fenol del lípido-glucosa de insecto

SUSTANCIA	ANTES DEL TRATAM. °	DESPUES DEL TRATAMIENTO		
		Fase acuosa		Fase fenólica
		C	P	M
Lípido manosilado de insecto(endógeno)	1.298	69	1.204	
iDol-P-Glc	1.877	186	1.754	
iDol-P-Man	2.402	192	1.920	
hDol-P-Glc	3.190	210	3.059	
hDol-P-Glc(enz.de hígado)	3.000	154	2.877	
Fic-P-Gal (enz.de <u>Acetobacter xilinum</u>)	2.473	2.221	370	

Se utilizó el método de García y col.(359) (Ver Tabla 56,pág.149).Excepto en los casos indicados se emplearon enzimas de Ceratitidis.

los derivados de dolicol resistieron el tratamiento mientras que el Ficaprenol -P-Gal (alílico) se hidrolizó en un 90 % .

3.3.4. Evidencias sobre formación de otros dolicol monosacáridos

Cuando se incubaron microsomas de Triatoma o de Ceratitis con UDP- $[^{14}\text{C}]$ - Galactosa se formó una sustancia que se comportó como poliprenil-fosfato-azúcar (Tabla 47, página 122) . Sometida a la hidrólisis ácida débil, se comprobó que la mayor parte de la radioactividad acuosoluble liberada del glicolípido se comportó como glucosa y sólo una pequeña proporción (8-15 %) co-cromatografió con la galactosa. Debido a lo escaso de estas incorporaciones no se continuó el estudio de este glicolípido, desconociéndose si su formación es debida a una enzima específica o a una inespecificidad de la enzima sintetizante de Dol-P-Glc .

Lípido P-P-GalNAc

Dada la presencia en glicoproteínas de insecto (ver pp.46-47) de galactosamina (acetilada o no) y la presencia de UDP-GalNAc en hemolinfa de mariposa gigante (411) se estudió la posible formación de lípido-GalNAc .

Como se aprecia en la Figura 75 , cuando se incubaron extractos de larvas y/o de pupas de Palendus dermestoides con UDP $[^{14}\text{C}]$ GalNAc se formó un glicolípido lábil con las propiedades de los poliprenoles azúcar que liberó GalNAc y GlcNAc por hidrólisis ácido débil. Por cromatografía en capa delgada de Sílica Gel se verificó la identidad de los dos aminoazúcares (Figura 76) . También se comprobó la existencia de las dos acetilhexo-

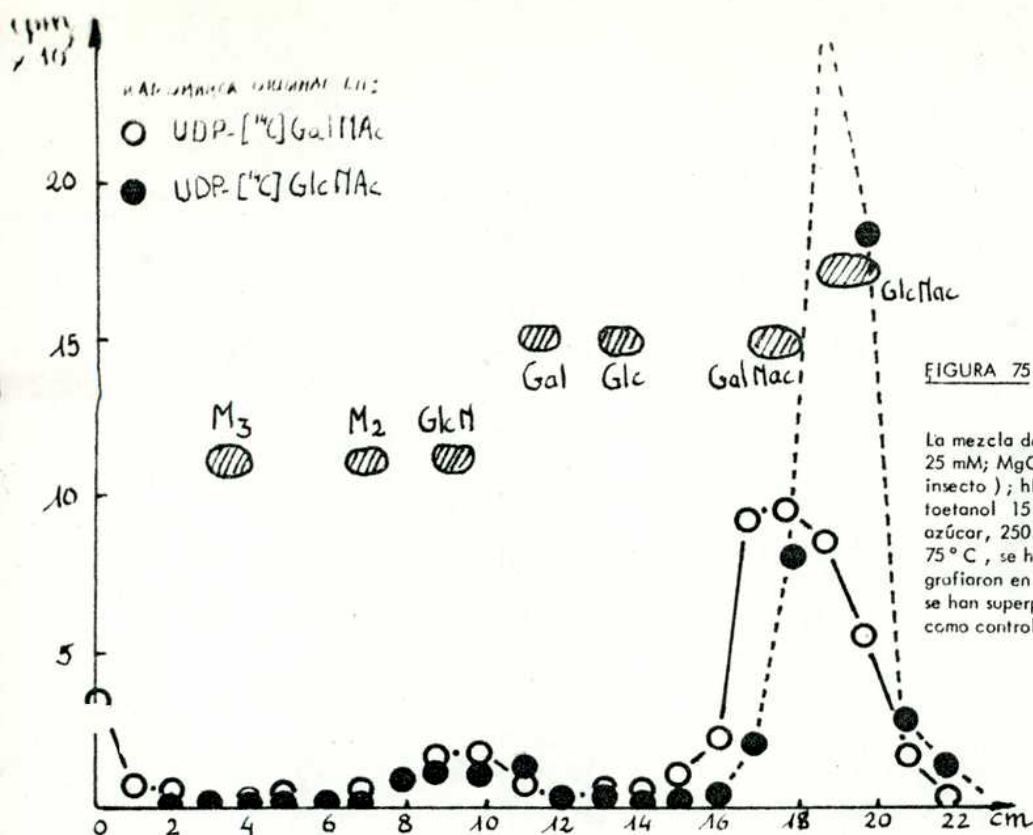


FIGURA 75 : Formación de un lípido-GalNAc

La mezcla de incubación contenía : Tampón Tris-Maleato pH 8,0, 25 mM; MgCl₂ 6mM; EDTA-Na 1,5 mM; iDol-P (d 100 mg de insecto) ; hDol-P (50 nanomoles); Tritón X-100 1 % ; 2-mercaptoetanol 15 mM; Enzima de *Palendus* 6 mg proteína. Nucleótidos-azúcar, 250.000 cpm volumen final 200 ul. Se incubó 30 mm a 75 ° C , se hidrolizaron los respectivos lípidos polares y se cromatografiaron en papel con el solvente C (ascendente). En la figura se han superpuesto los perfiles. Se utilizaron estándares endógenos como control de la movilidad.

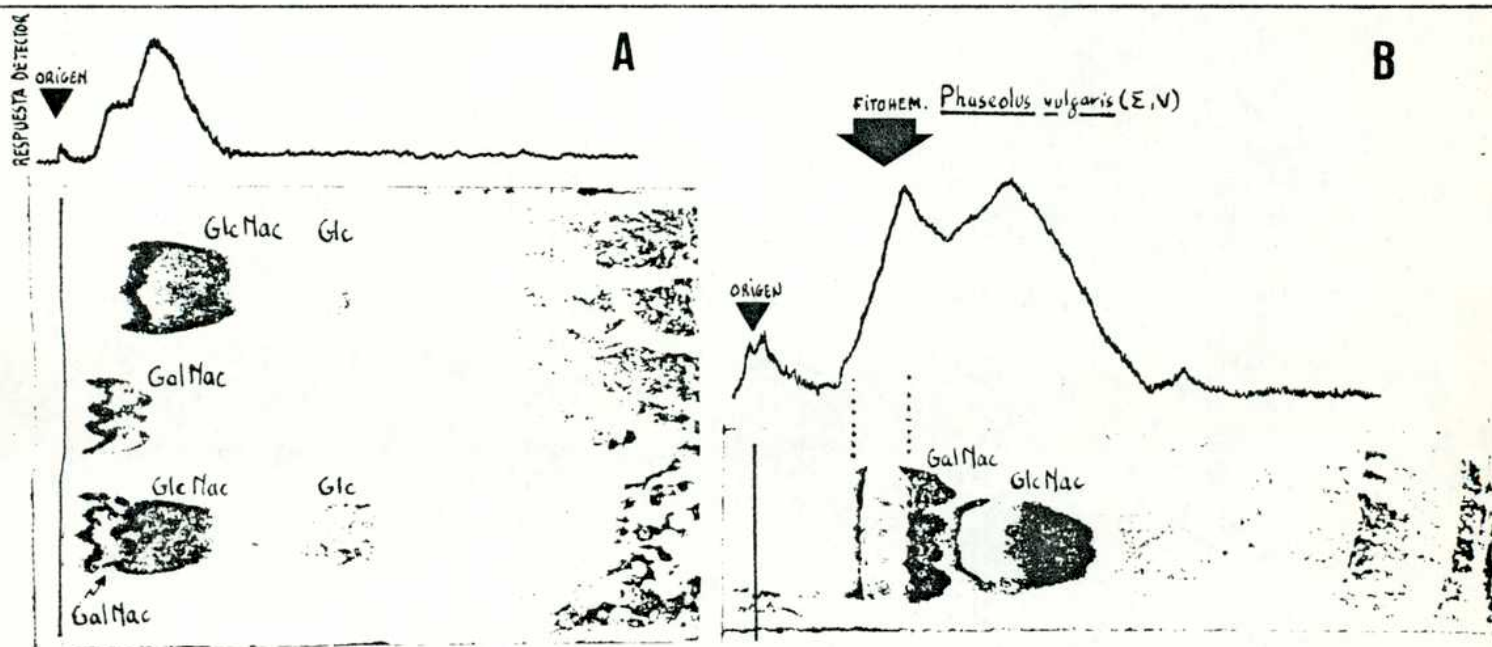


FIGURA 76 : Cromatografía en capa fina del resto hidrosoluble del aparente lípido-GalNAc

Ensayo y procesamiento como en Figura 75 (arriba). Después de la hidrólisis ácida suave se cromatografió la sustancia radioactiva hidrosoluble liberada del glicolípido obtenido a partir de UDP- [¹⁴C] GalNAc en Sílica Gel G con acetato de butilo/2-propanol/piridina/agua (40:31:14:15). Se hicieron corridas en ausencia (A) y presencia (B) de una "barrera" de fitohemaglutinina de *Phaseolus* (que interacciona con GalNAc). En ambos casos la radioactividad se repartió entre la GalNAc y GlcNAc .

saminas utilizando cromatografía en papel impregnado en borato, con el solvente A (ver Métodos y página 76). Probablemente exista en los homogenatos de insecto una epimerasa que pasaría el UDP-GalNAc a UDP-GlcNAc en forma similar a la que se conoce en otros organismos. (Salvo que la epimerasa sea a nivel de lípido-azúcar) . Resta saber, entonces, si las transferasas involucradas son una o dos.

Lípido-ácido glucurónico

Se ha detectado la transferencia de (^{14}C) desde UDP- (^{14}C) ácido glucurónico a una sustancia lipídica lábil al ácido. Sin embargo las incorporaciones son sumamente bajas por lo que no ha podido demostrarse la identidad de la sustancia radiomarcada que podría ser lípido-P- (^{14}C) GlcUA. Un lípido similar se forma en Acetobacter xylinum (Couso y col., comunicación personal) .

3.3.5. Dolicol monosacáridos en otros organismos

Al inicio del presente trabajo de Tesis sólo se conocían poliprenil derivados en mamíferos, plantas y hongos. Cuando se detectó en Triatoma infestans la formación del Dolicol-P-P-GlcNAc y, poco después, otros poliprenil-monosacáridos, se quiso conocer si éstos intermediarios se formaban en otros invertebrados. Se prepararon enzimas con diferentes grados de purificación de diversos artrópodos y otros organismos. Como se aprecia en la Tabla 58 en casi todos los organismos estudiados se detectó formación de poliprenil derivados.

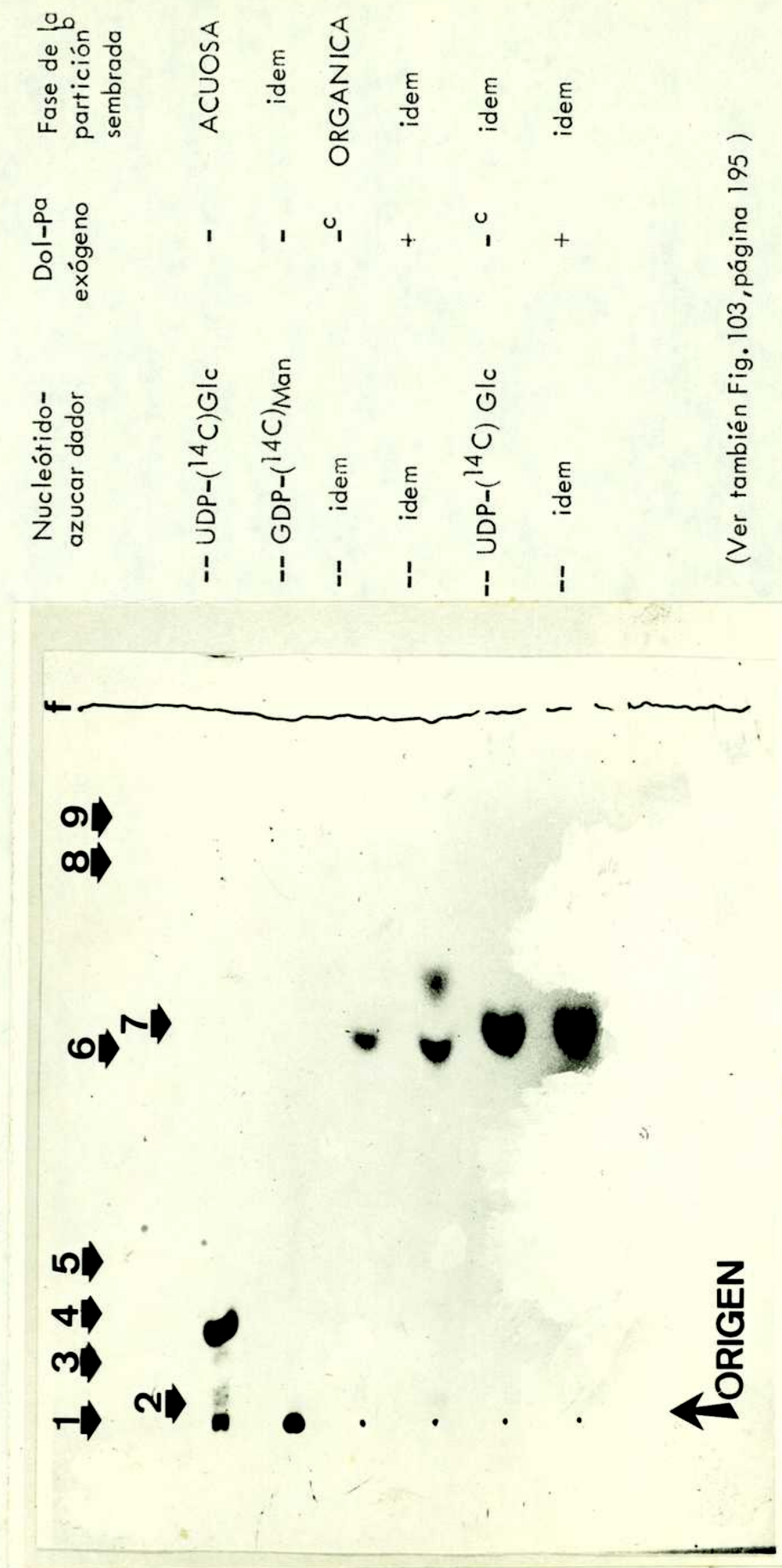
TABLA 58 : Detección "in vitro" de lípidos-monosacáridos de invertebrados sensibles a hidrólisis ácida y cuya biosíntesis se estimuló por Dol-P

	Lípido - Glc	Lip - GlcNAc	Lip-Man
CRUSTACEOS			
- <u>Porcellio sp</u> (bicho bolita)	SI	NO	SI
- <u>Cyrtograptus sp</u> (cangrejo de Sambarombón)	DUDOSO	-	-
- <u>Artemia salina</u>	SI	SI	SI
ZOOFLAGELADOS			
- <u>Euglena viridis</u>	SI	TRAZAS	-
HONGOS			
- <u>Neurospora crassa</u> WT	SI	SI	SI
- <u>Neurospora crassa</u> CR ⁻ (162)	SI	-	SI
- <u>Phycarpon blakesleeanus</u>	-	-	SI

Lípido-monosacáridos de Artemia salina

Se estudiaron en detalle los glicolípidos de Artemia, llegándose a la conclusión de que el lípido aceptor endógeno es similar al Dol-P de insecto. Este último estimuló la biosíntesis de los glicolípidos de Artemia, cuando fue agregado exógenamente a la incubación (Figura 77). En la misma Figura se aprecia que la casi totalidad del UDP- (¹⁴ C) Glc fue degradado mientras que el GDP- (¹⁴ C) Man permaneció - aparentemente - como tal.

FIGURA 77 : Autoradiografía de la cromatografía en capa fina de los poliprenil-monosacáridos de Artemia

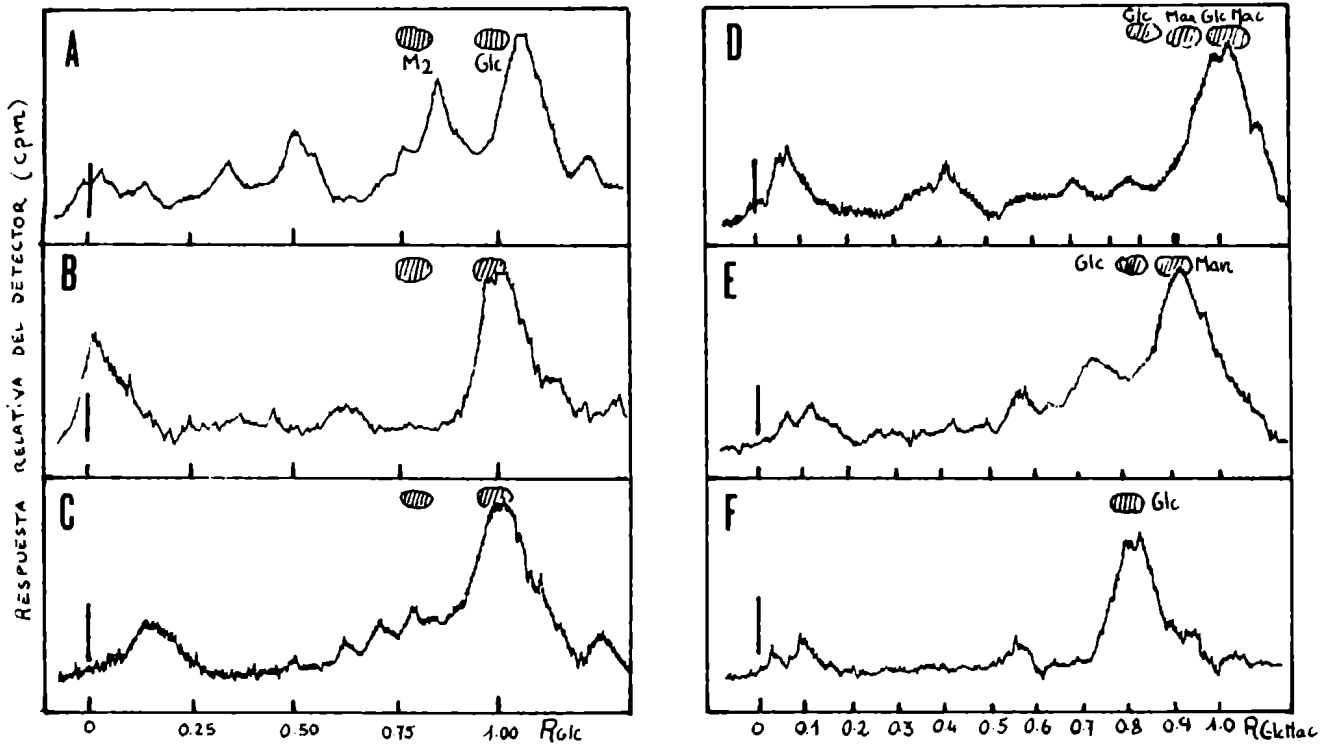


(Ver también Fig. 103, página 195)

Los quistes de Artemia salina se cultivaron en solución salina durante 5 hrs (ver 428, 404) tras lo cual se homogeneizaron en: Sacarosa 190 mM; glicerol 1%; 2-mercaptoetanol 1,5 mM; EDTA-Na 1,5 mM; NaCl 4 mM; KCl 15 mM; MgCl₂ 4 mM; Tampon Tris-HCl pH 7.5 0.1 M y B.H.T. (6-7 cristales) como antioxidante. Se preparó una fracción rica en microsomas resuspendida en el mismo tampon (Ver Métodos). Se incubaron 360.000 cpm de GDP-[¹⁴C]Man (6 200.000 de UDP [¹⁴C]Glc) en presencia y ausencia de Dol-P. La mezcla de incubación contenía: MnCl₂ 2 mM; MgCl₂ 6 mM; Tris-Maleato pH 7.1 75 mM; EDTA-Na 0.7 mM; 2-mercaptoetanol 150 mM; Tritón X-100 0.09%. Se incubó 30 mm a 25°C, se aislaron los lipídios pelares (Métodos) y se cromatografiaron en placas de Sílica Gel G con el solvente X, con los siguientes estándares: 1. UDP-Glc 2. Glc-1-P 3. Refinosa 4. Trehalosa 5. Glc 6. Dol-P-Man 7. Dol-P-Glc 8. β-Sitosterol 9. Dulcitol f = frente del solvente. Se autoradiografió la placa durante 15 días y luego se revelaron los estándares con Anisaldehído/50% H₂O.
 a) Dol-P de hígado, 40 nanomoles en fosfato; b) Método de Folch (página 66); c) aceptores endógenos

En la Figura 78, A y B se muestran las cromatografías en papel de los azúcares liberados

Figura 78: Cromatografía de productos de hidrólisis de de poliprenil-azúcares de *Artemia*, *Euglena* y *Neurospora*.



Preparación de enzimas de *Artemia* como las de insecto. Las células de *Euglena* fueron rotas por descompresión según el método de Trench y Milner (420). El micelio de *Neurospora* se molió con arena lavada. Se utilizaron incubaciones estándar similares a las empleadas para los experimentos con insectos. Los glicolípidos biosintetizados se procesaron, hidrolizaron y se cromatografió el resto hidrofílico en papel con el solvente B.

del glucolípidos y manolípidos por hidrólisis ácida suave. El glucolípidos liberó glucosa y una sustancia que permaneció en el origen (Figura 78, B). El manolípidos liberó manosa (pico principal de Figura 78, A) y además, aparentes oligosacáridos (Ver capítulo 3.7). El GlcNAc-lípido, por su escasez, no pudo analizarse debidamente.

Entre otros, se obtuvo la biosíntesis de Dolicol-P-Glc en un protista fotosintético unicelular flagelado, *Euglena viridis*, (Figura 78, C). Poco después Keenan y col. (55,133) obtuvo lo mismo en otro protozoario, *Tetrahymena pyriformis*.

Parodi (datos no publicados) encontró biosíntesis de dolicol glucosa y de poliprenol-

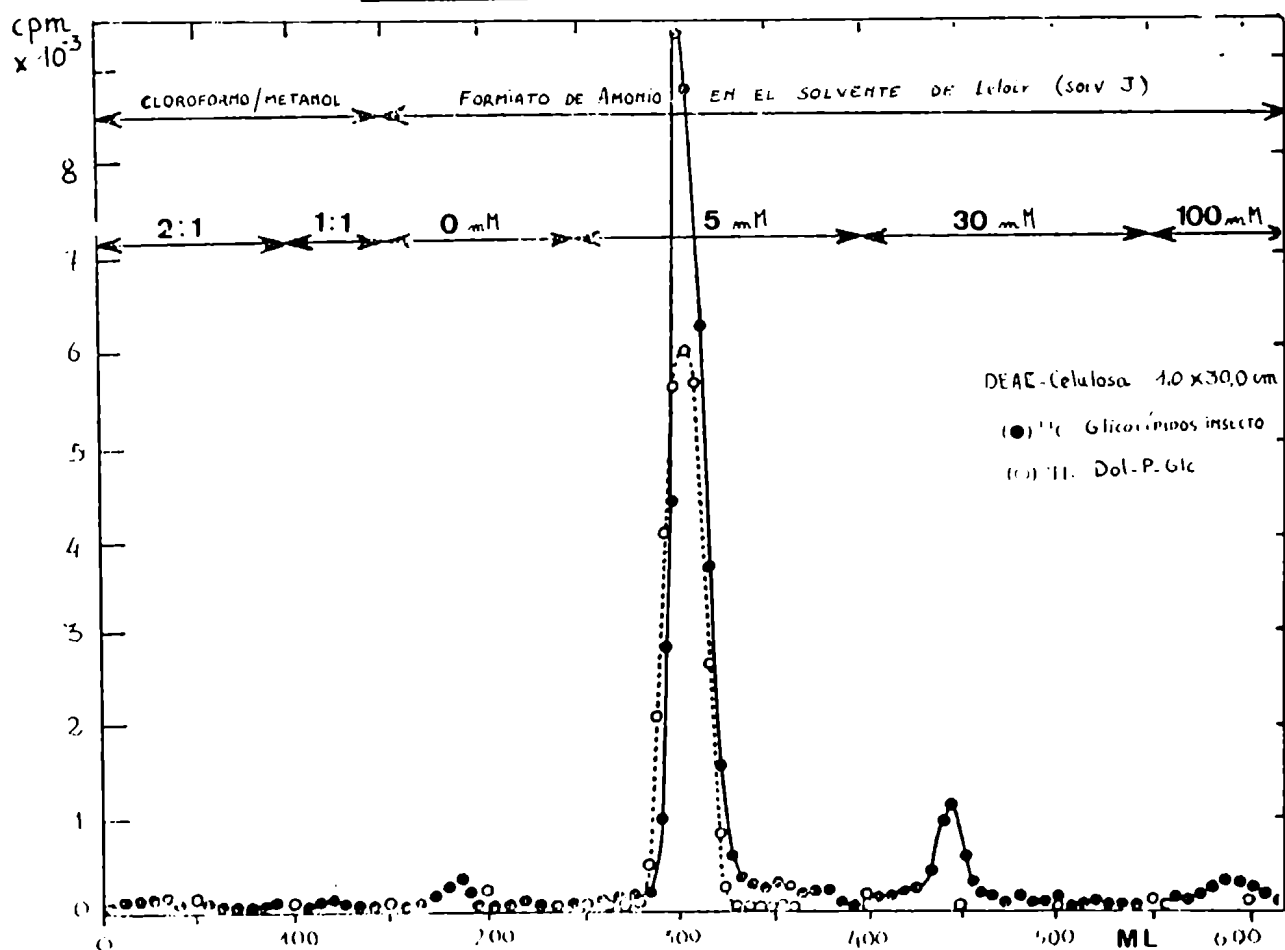
oligosacárido en lombriz de tierra.

En base a los datos propios y de otros autores se concluyó que la biosíntesis de dolicol-azúcares era un fenómeno general para todos los invertebrados. A los efectos de comparar propiedades de la parte lipídica se obtuvo también la formación de aparentes Dolicol-P-P-GlcNAc, DolPMan y DolPGlc en el ascomycete Neurospora crassa (Figura 78, D - F) y en el hongo primitivo phycomyces blakesleanus .

3.4. BIOSINTESIS DE DOLICOL-OLIGOSACARIDOS CONTENIENDO MANOSA

Se incubó GDP- (^{14}C) Man con una enzima rica en microsomas de Ceratitis en las condiciones habituales para la biosíntesis de Dol-P-Man. El material lipofílico radiomarcado con ^{14}C se cromatografió en una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa, equilibrada con cloroformo/metanol (2:1). En la Figura 79 se aprecia que no se eluyó radio-

Figura 79: (Publicada en Quesada y Belocopitow, (203))



actividad con el paso de cloroformo/metanol (2:1) (100 ml) y de los mismos solventes en proporción 1:1 (50 ml).

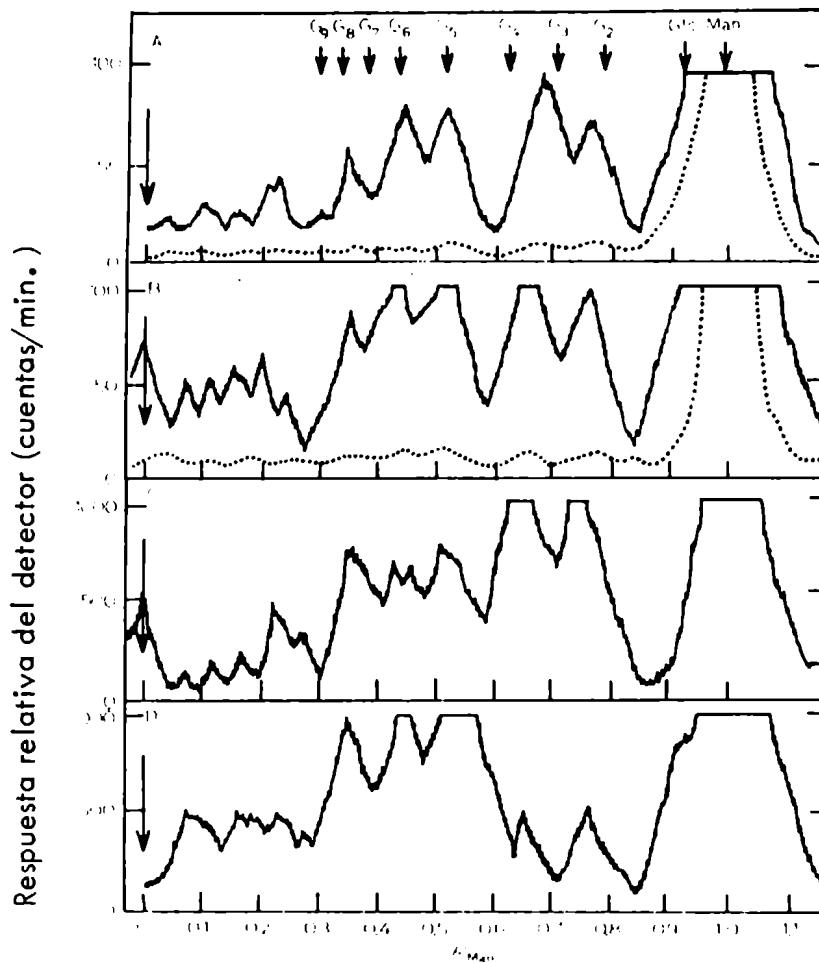
El solvente de Leloir (J), cloroformo/metanol/agua (10:10:3) (100 ml)

tampoco eluyó sustancias radiomarcadas. La mayor parte de éstas (93 %) eluyeron junto con un estándar interno de Dol-P - (^3H) Glc, cuando se pasó acetato de amonio 5 mM en cloroformo/metanol/agua (10:10:3). Sustancias más aniónicas (5% de la radioactividad) eluyeron a una concentración de 30 mM de la sal, en forma similar a como se comportan los poliprenol pirofosfato derivados (143,145). Se sometieron a hidrólisis ácida débil las fracciones de la columna que eluyeron con 5 y 30 mM de formiato de amonio y las sustancias hidrofílicas liberadas se cromatografiaron en papel con el solvente A . Como era de esperar el producto de hidrólisis de la sustancia menos aniónica comigró con la manosa ($R_f = 0.30$) indicando que se trataba del dolicol-fosfato-manosa descrito en el capítulo anterior (3.3.1.). La(s) sustancia(s) hidrofílicas originadas en los manolípidos más cargados se comportaron como oligosacárido(s) dado que permanecieron cerca del origen en el mismo sistema cromatográfico.

3.4.1. Estimulación de la síntesis por extractos de Ceratitis capitata

Se prepararon proteínas microsomales de larvas de 6 días y de pupas en la etapa de "ojos pigmentados" (ver Métodos). Se incubaron cantidades equivalentes de cada preparación con GDP- (^{14}C) Man para obtener la manosilación de los aceptores endógenos. Como se aprecia en la Figura 80 la hidrólisis ácida débil de material soluble en solventes orgánicos originó varias sustancias radioactivas que migraron como oligosacáridos en cromatografía en papel. Las enzimas larvales (Figura 80, B) incorporaron mayor cantidad de (^{14}C) que los adultos farados (Figura 80, A). Muchas de las preparaciones enzimáticas obtenidas de estos últimos fueron frecuentemente capaces de sintetizar cantidades detectables de

FIGURA 80: Formación de lipido-oligosacáridos manosilados de Ceratitis



Se utilizó la mezcla estándar de incubación conteniendo 504 GBq (^{14}C) Man (60,000 cpm) y 0.25 Tritón X-100. Se incubó con 6 mg de proteína enzimática por 20 min a 25°C (mezcla de pupa). (B) de larvas. Las líneas punteadas indican el perfil de radiocromatograma en la escala 0-1000, con objeto de comparar con los gráficos de incubación suplementada con acepto lipídico de insecto (ver 2.8, pág. 60) correspondiente a 2g de insecto vivo (preparación analítica). (D) incubaciones suplementadas con el extracto lipídico de hígado (145) que corresponde a 0.5 g de tejido fresco. Las cromatografías en papel se desarrollaron con el solvente B utilizando Maltooligosacáridos (Glc-6) y Manosa como estándares "internos". Figura publicada en Quesada y Belocapitow (23).

de lípido-oligosacáridos radiomarcados (ver también ciclo de vida , página 202).

Se suplementaron incubaciones conteniendo enzimas larvales con una fracción lipídica polar extraída de Ceratitis (ver Material y Métodos). La mezcla de incubación estándar contenía el material lipídico correspondiente a 2 g de insectos vivos. La incorporación de $[^{14}\text{C}]$ Manosa en los oligosacáridos unidos a lípido aumentó 10 veces (Figura 80,C). Para descartar la posibilidad de que el extracto lipídico estuviera ejerciendo un efecto de detergente se lo sustituyó - en experimentos paralelos - por diferentes concentraciones de cardiolipina

(como "detergente" natural) Tritón X-100, o Nonidet P-40, o deoxicolato de sodio. En ningún caso la estimulación fue mayor de una vez y media sobre los valores basales.

Para comprobar la especificidad del sistema transferente se preparó a partir de hígado de cerdo una fracción de lípidos aceptores de glicosilos (ver Métodos). El agregado de lípido heterólogo estimuló en forma similar la biosíntesis de lípidos-oligosacáridos. La radiolectura del cromatograma reveló diferencias cualitativas (Figura 80, D) en el perfil de distribución de la radioactividad: el aceptor de insecto favoreció la formación de los aparentes lípidos-"trisacárido" y "tetrasacárido" mientras que el aceptor de hígado estimuló en mayor medida los aparentes lípidos-"pentasacárido" a "heptasacárido".

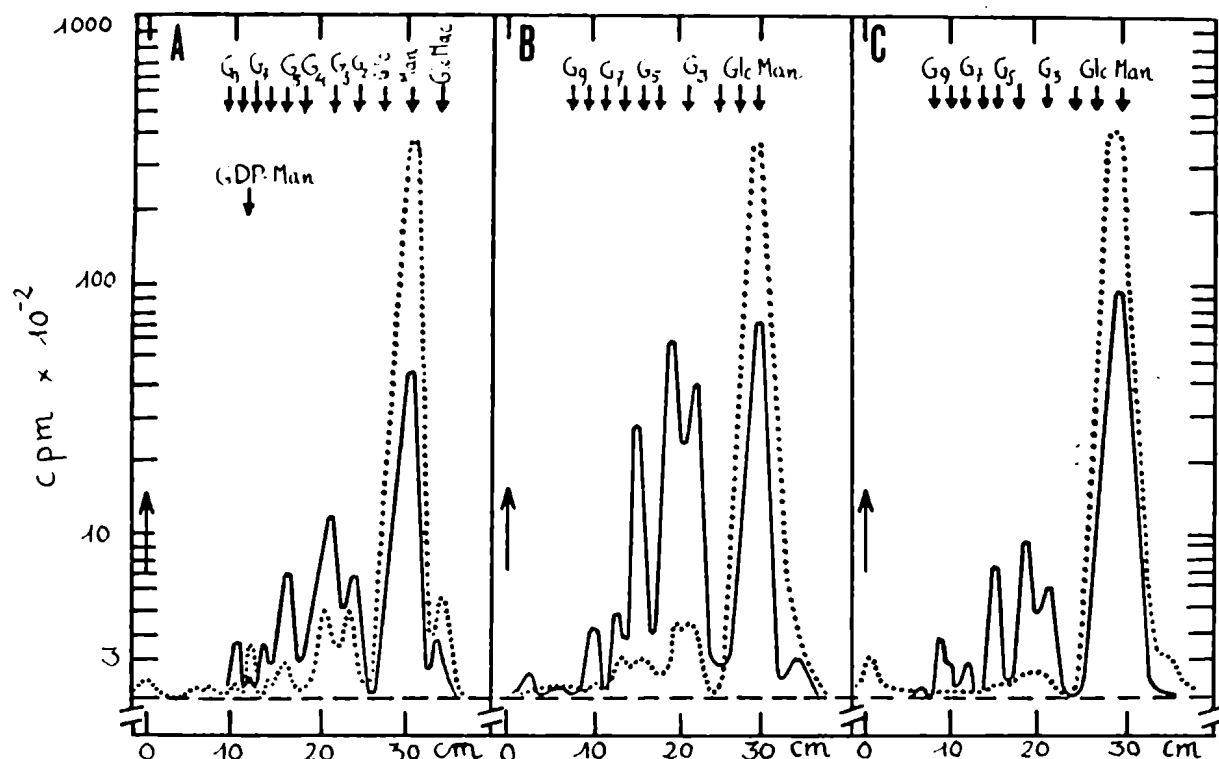
Propiedades del aceptor lipídico de insecto

Para excluir la posibilidad de que el estimulador de la síntesis de lípido-oligosacáridos sea el Dol-P descrito previamente (capítulo 3.1.2.) se llevaron a cabo experimentos de control en que este último lípido purificado se adicionó o no al estimulador.

Cuando a la incubación típica, en que sólo se hallaban presentes los aceptores endógenos, se le añadieron 3 ó 6 nanomoles (en fosfato) de doliquil fosfato la incorporación de ^{14}C al Dol-P-Man. Se estimuló 12 veces, mientras que a los lípido-oligosacáridos se inhibió levemente (Figura 81, A).

Probablemente este último efecto se debió a la competición entre enzimas por el GDP-Man. Cuando el Doliquil-P se adicionó a la mezcla de incubación suplementada con aceptor de insecto (Figura 81, B) se produjo una notoria inhibición de la biosíntesis de lípido-oligosacáridos. Aquí también se trataría de un fenómeno de competencia por el GDP-Man. En la Figura 81, C se aprecia que el tratamiento del aceptor lipídico con HCl 0,1 M por

FIGURA 81 : Efecto de la adición de lípidos exógenos



Mezcla y métodos estándar salvo en la concentración de Tritón X-100 que fue de 1,5 %, y las adiciones de lípidos. Cromatografías en papel, solvente B. Se cuenta la radioactividad en centelleador, cortando en el cromatograma bandas transversales de 0,5 cm. A) Las incubaciones se suplementan (. . .) o no (———) con 30 nanomoles de hDol-P. B) Igual que A pero cada tubo contiene el lípido aceptor obtenido de 2 g de insecto (página 60). C) igual a A y B pero el aceptor de insecto fue calentado a 99 °C durante 20 min en 0.1 M HCl, lavado por el método de Folch y las fases orgánicas añadidas a la mezcla de incubación. Figura publicada en (202).

20 min a 98° C, destruyó su capacidad estimuladora. Es de hacer notar que este tratamiento no destruyó al Doliquil-P.

El aceptor lipídico de insecto se comportó como un sustrato para la enzima transferente, como se aprecia en la Figura 82, donde cantidades crecientes de aceptor ocasionaron sucesivos incrementos en la cantidad de lípido-oligosacáridos biosintetizados. En la Figura 82 se ve que también se estimuló la formación del Dol-P-Man debido quizás a la liberación al medio del dolicol fosfato unido a azúcares. Ello puede ser debido a hidrolasas que hemos comprobado se hallan presentes en las preparaciones de extractos microsomales de mosca (datos no presentados).

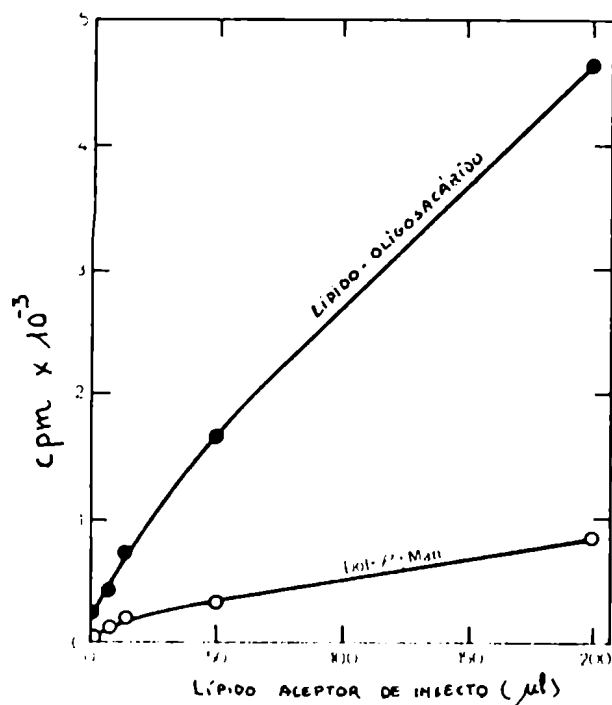


FIGURA 82: Efecto de la adición del aceptador lipídico de insecto.

Se obtuvo 1 ml de solución que contenía los aceptores de insecto, partiendo de 16 g. de *Ceratitis* (pupas), vivas. Las cantidades de aceptador indicadas se llevaron a seco bajo N_2 y se las resuspendió en : Tris-HCl 82mM, pH 7,4; $MgCl_2$ 8.2mM; Tritón X-100 3,3%; 2-mercaptoetanol 80mM y $GDP(^{14}C)$ -Man 6.6 μM (90.000 cpm). Volumen final 60 μl . Se incubó 20 min a 25°C. Después de la extracción de los lípidos, se separaron los manosil-derivados en columna de DEAE-celulosa. Figura publicada en (203).

Teniendo en cuenta el comportamiento del lípido estimulador de insecto en diferentes sistemas cromatográficos, sus propiedades en cromatografía de DEAE-celulosa, la analogía con los sistemas de mamíferos y los precedentes resultados, se puede asumir que se trata de un poliprenil-pirofosfato derivado, conteniendo oligosacáridos de diferentes tamaños.

3.4.2. Estudio del oligosacárido unido al lípido: Dolicol trisacárido

Las propiedades del lípido-oligosacárido intacto se han descrito en las secciones precedentes. Su sensibilidad a la hidrólisis ácida débil es ligeramente menor que la del Dol-P-Manosa y del Dol-P-Glc de insecto (Figura 83). Behrens y col. (104) han descrito también una velocidad de hidrólisis menor para el Dol-P-P-GlcNAc.

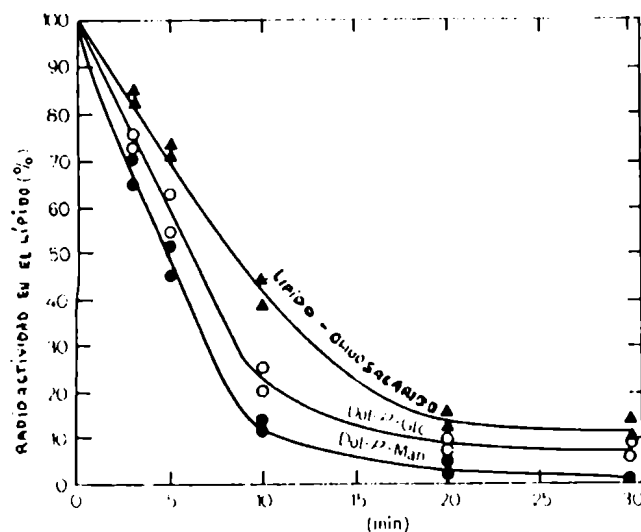


FIGURA 83 : Susceptibilidad al ácido de los lipo-oligosacáridos

El Dol-P-Man y los lipo-oligosacáridos se separaron en columnas de DEAE-celulosa. El Dol-P-Glc se preparó con enzima de hígado de rata. Las muestras en duplicado con aproximadamente 5000 cpm por tubo se secaron bajo N_2 y se hidrolizaron (2.13.1. a , página 69). El gráfico indica el porcentaje de radioactividad remanente en las fases orgánicas después de la hidrólisis. (Figura publicada en Quesada y Belocopitow , (203)).

Del comportamiento de los hidrolizados del lípido oligosacárido(s) en cromatografía en papel se infirió que la sustancia que migró entre maltosa y maltotriosa (Figura 80 y 81) podía ser un trisacárido.

En cromatografía de filtración molecular (Biogel P-2), el oligosacárido radiomarcado se comportó como un pico simétrico que migró entre la rafinosa y la estaquirosa (Figura 84 A). Estimando el Peso Molecular en base a los patrones usados, se obtuvo (Figura 84, B) un valor de 650, próximo al de un tetrasacárido. Sin embargo, es frecuente que la presencia de una acetil hexosamina haga decrecer el volumen de elución en este tipo de filtración molecular. Es lo que sucede para la GlcNAc (Figura 84, B) y con la di-N¹-N-acetilquitobiosa (157).

El putativo trisacárido se comportó como una sustancia neutra cuando fue electroforetizado en papel, tanto con tampones ácidos como alcalinos. Se lo redujo con borohidruro de sodio para evitar el ataque del álcali por el extremo reductor y se lo trató con KOH (ver Métodos).

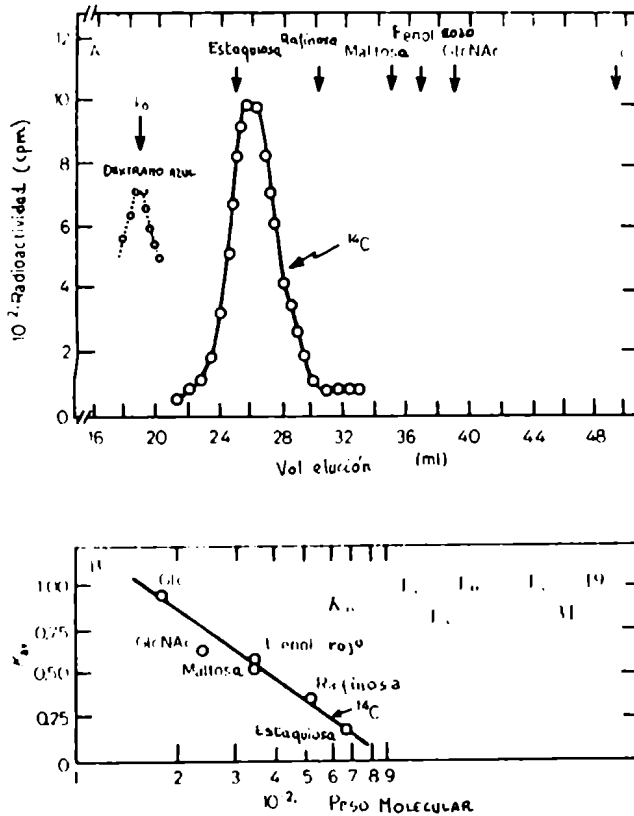


FIGURA 84 : Filtración molecular del trisacárido unido a lípido en Biogel P-2

El trisacárido radiomarcado fue eluido de cromatogramas como los de la Figura 8). Se concentraron los eluatos y se los pasó por una columna de Biogel P-2 equilibrada con agua. Los eluatos radioactivos volvieron a ser concentrados, mezclados con estándares y pasados por la misma columna equilibrada y eluida con Tampón fosfato 5 mM (pH 7.0). Las fracciones de 0,5 ml (0,1 ml/min) se evaporaron en planchetas de vidrio y contaron, después de lo cual se tomaron en agua para determinar la posición de los estándares (ver Métodos).

A) Perfil de elución del trisacárido radiomarcado
B) La flecha indica el peso molecular aparente del trisacárido. Figura publicada en (203).

Sometido a la electroforesis la radioactividad se repartió en dos sustancias cargadas positivamente (Figura 85, A).

En la Figura 85, B se ve que el pico de menor migración apareció primero y gradualmente fue desapareciendo a medida que aumentó la radioactividad en el pico más rápido. Este resultado puede atribuirse a la de-N-acetilación de dos grupos N-acetilhexosamina

(188).

Por otra parte al oligosacárido radiomarcado con ^{14}C se lo trató previamente con $\text{NaB}[\text{}^3\text{H}_4]$ para radiomarcarse el extremo reductor y se lo hidrolizó totalmente en ácido, cromatografiando el hidrolizado en papel. El azúcar marcado con ^{14}C que se obtuvo migró

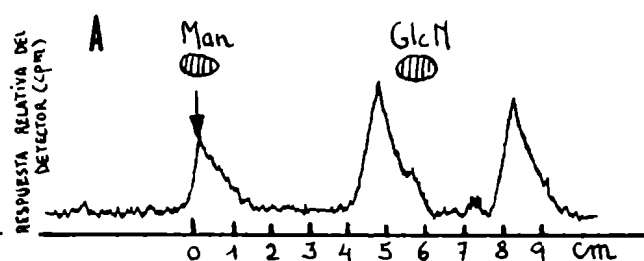
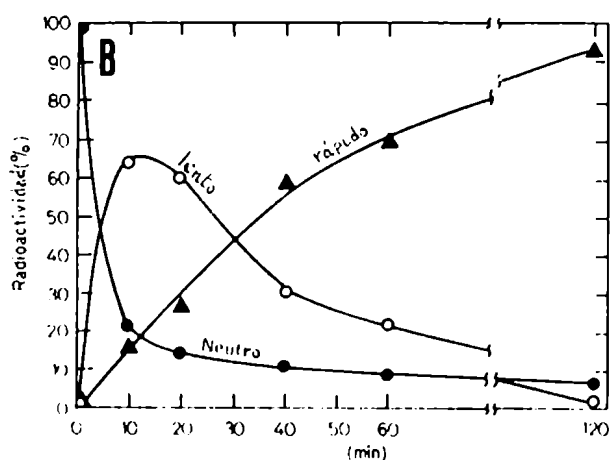


FIGURA 85 : Tratamiento alcalino del oligosacárido unido a lípido



Después de reducir con borohidruro (15 mg/ml - 1 hora/21° C) las muestras se pasaron por una microcolumna de Dornex-50. El ácido bórico se eliminó por repetidas adiciones de metanol y evaporación en vacío. El material reducido fue tratado con KOH 2 M a 100° C durante los tiempos indicados, neutralizado con ácido perclórico y se metió a electroforesis en papel con Tampón II (ácido). El campo eléctrico promedio fue de 20 v/cm .

A) Perfil de la distribución de radioactividad
B) Los electroforetogramas correspondientes a los tiempos de tratamiento indicados se corrieron en bandas de 1 cm y se contó la radioactividad "pico lento" se refiere al que migró atrás de la GlcN y "rápido", adelante.

Figura parcialmente publicada en Quesada y Beio-capitow (203) .

como manosa en los solventes A, B y D mientras que el azúcar tritizado co-cromatografió con glucosaminitol. Este resultado indica que la N-acetilglucosamina se halla situada en el extremo reductor del oligosacárido.

De los datos precedentes se desprende que la sustancia analizada debe ser el trisacárido $(Glc\ NAc)_2 - Man$, llamado X_3 en el sistema de hígado de mamífero (167) y biosintetizado también por otros tejidos de eucariotes (14, 40, 42, 43).

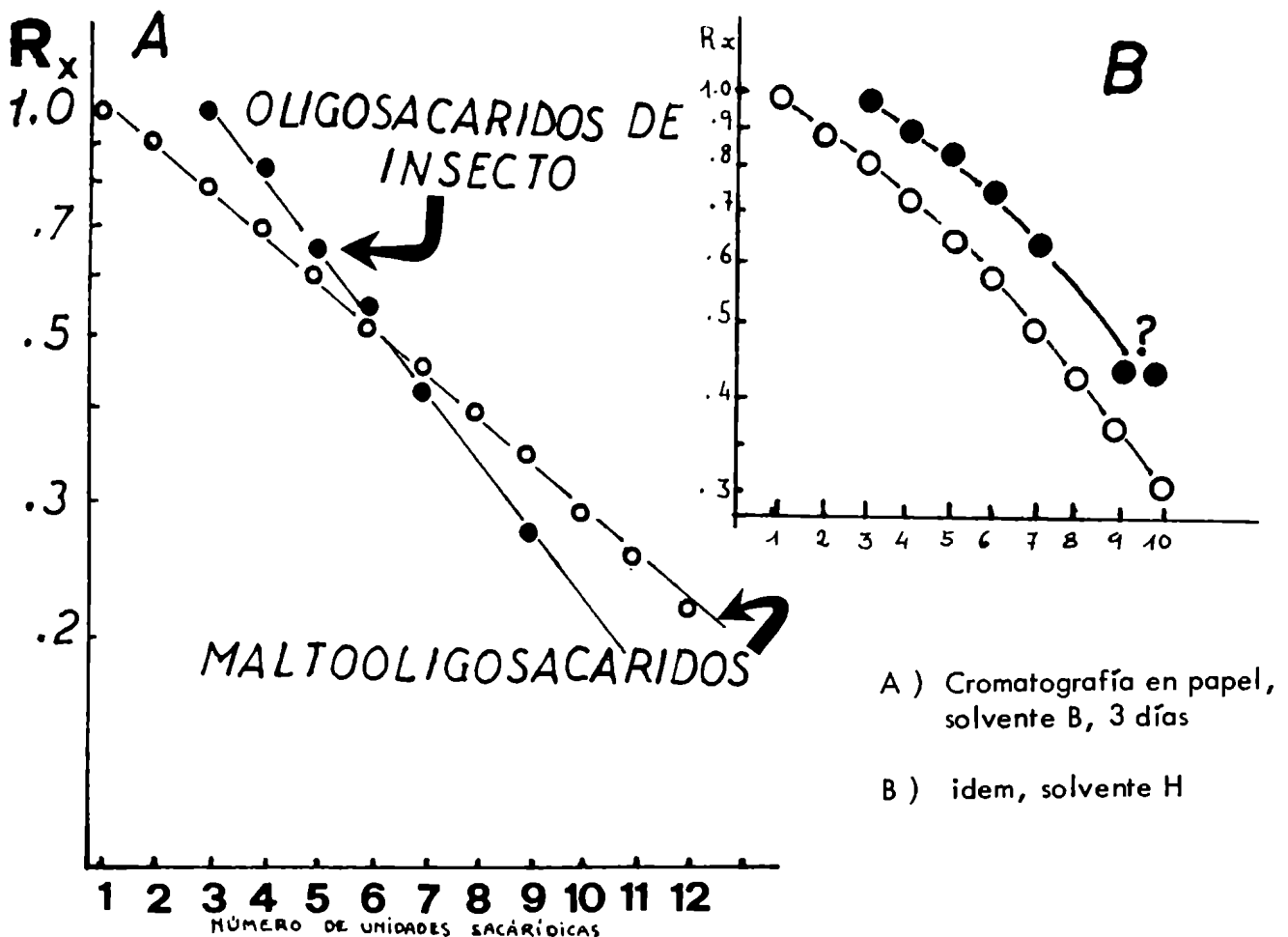
3.4.3. Los dolicol-oligosacáridos de mayor tamaño

Las incorporaciones de $[^{14}C]$ Manosa a los oligosacáridos unidos a lípido, aparentemente mayores que el trisacárido descrito, fueron bajas. Por ello fue dificultoso el análisis de los

azúcares componentes. En el caso del aparente lípido-tetrasacárido se obtuvieron evidencias, mediante el tratamiento alcalino del oligosacárido reducido y posterior electroforesis (idéntico al de la Figura 85) de que también contiene un par de acetilhexosaminas. Habría además dos manosas. Todo indicaría que para los oligosacáridos mayores sucede lo mismo, por lo que podría estarse en presencia de una familia de lípidos oligosacáridos que se fueran sintetizando a partir del miembro de menor tamaño por adición de sucesivas manosas.

Asumiendo esta hipótesis, si se toma el trisacárido como "cabeza" de la serie de oligosacáridos de insecto, estos tendrían entre 3 y 9 unidades monosacáridicas, por criterio de cromatografía en papel en diferentes solventes. Como se aprecia en la Figura 86, la presunta

FIGURA 86 : Movilidad relativa de los oligosacáridos de insecto unidos a dolicol

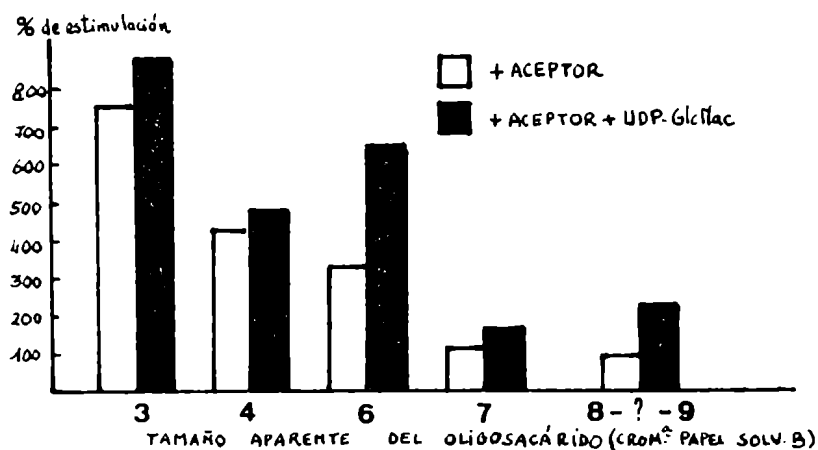


"familia" de oligosacáridos se comportó como los maltooligosacáridos alineándose ambos en una recta, en cromatografía con el solvente B, o en una línea de idéntica curvatura, con el solvente H.

La porción oligosacárida del presunto lípido-tetrasacárido co-cromatografió con el malto-tetrasacárido en papel y eluyó inmediatamente antes de la estaquiosa en Biogel-P₄ (no se muestran los datos). Por conveniencia se lo calificó de "tetrasacárido" pero ello no implica un conocimiento acabado de la molécula.

En los experimentos de estimulación con añadido de lípido de insecto los incrementos porcentuales decrecieron a medida que aumentó el tamaño aparente del oligosacárido (Figura 87) sugiriendo una relación precursor - producto entre los mismos. En el caso del presunto

FIGURA 87 : Estimulación, con respecto al material endógeno, de los lipo-oligosacáridos de insecto según el tamaño aparente del oligosacárido



Los restos oligosacarídicos del lipo-oligosacárido se co-cromatografiaron con malto-oligosacáridos y se les otorgó el tamaño aparente (salvo el trisacárido, que se demostró). No se detectó estimulación en ninguna sustancia que cromatografiara como pentasacárido .

lípido-hexasacárido podría tratarse de una mezcla de dos sustancias, ya que tanto el aceptor como el UDPGlcNAc estimularon la incorporación de marca. Como, además, no se detecta generalmente el aparente pentasacárido podría suponerse la existencia de una ramificación que hiciera variar la movilidad cromatográfica y, entonces, la sustancia que apareció como

"hexasacárido" sería una mezcla de dos diferentes (el "pentasacárido" y el "hexasacárido").

3.4.4. Características de la transferencia de manosas

En la Figura 88, A se ve la incorporación de radioactividad a los diferentes lípido-

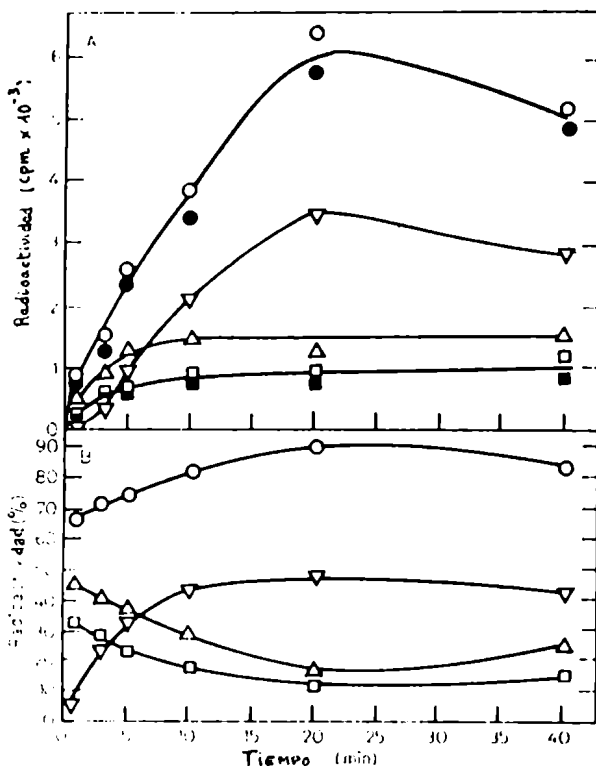


FIGURA 88 : Incorporación de radioactividad a doliquil-oligosacáridos

Incubación estándar con 1 % de Tritón X-100 y el lípido aceptor que correspondía a 4 g de insecto vivo. Se tomaron 2 alícuotas iguales de la incubación. Una de ellas se hidrolizó y se separaron los oligosacáridos en cromatografía en papel (Método destructivo). La otra alícuota se cromatografió en DEAE-celulosa con el solvente J y se separaron los lípido-oligosacáridos del Dol-P-Man (Método conservativo). A) radioactividad incorporada B) distribución porcentual de cada compuesto marcado en función del tiempo
Figura publicada en Quesada y Belocopitow (203)

Dol-P-Man (□, destructivo; ■, no destructivo);

Lípido-oligosacárido : (○, destructivo ●, no destructivo)

(▽) Lípido "TETRASACÁRIDO"; (△) Lípido-"TRISACÁRIDO".

oligosacáridos en función del tiempo. El Dolicol-P-Manosa y el lípido trisacárido llegaron a una meseta a los 5 min de incubación mientras que aumentó el ^{14}C en el aparente lípido-tetrasacárido hasta los 20 min.

El lípido-tetrasacárido acumuló la mitad del ^{14}C incorporado a glicofosfolípidos, en las condiciones del ensayo. En cambio, el Dol-P-Man y el lípido trisacárido decrecieron

simultáneamente en función del tiempo (Figura 88, B). Estos datos sugieren que la segunda manosa, en el presunto tetrasacárido, posiblemente entre vía Dol-P-Man.

Características generales

- Preincubando la preparación microsomal por 1-5 min antes del agregado de GDP-(^{14}C) Man la incorporación a Dol-P-Man y a lípido-oligosacárido decreció en forma similar (Tabla 59). Esto reflejaría una similitud en las manosiltransferasas en cuanto a los

TABLA 59 : Sensibilidad a factores presentes en la incubación

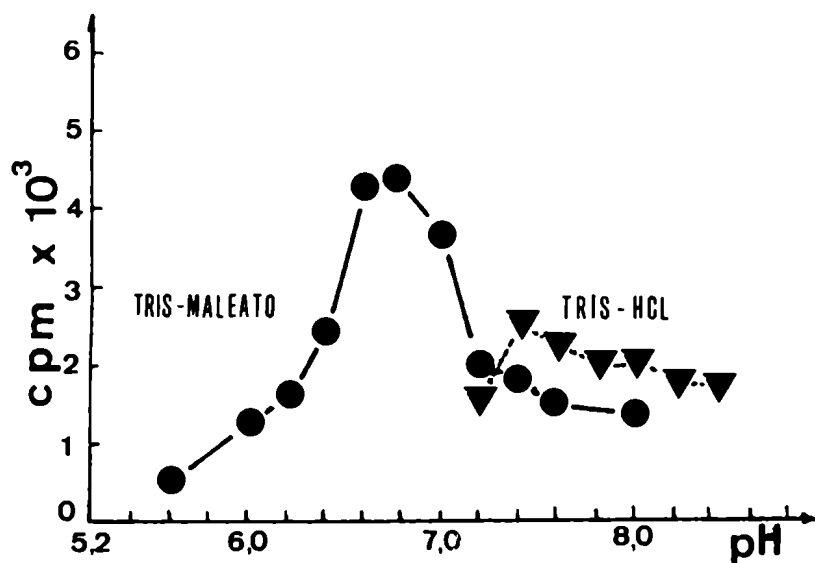
<u>Tiempo de preincubación</u>	<u>Lípido-oligosacáridos</u>		<u>Lípido-Man</u>	
	cpm	%	cpm	%
0 min	34.235	100	33.107	100
1 min	25.876	76	20.481	61
5 min	25.915	76	17.468	53

Después de incubar la enzima microsomal (0,1 g) con la mezcla de incubación por los tiempos indicados, se incorporó el GDP-(^{14}C) Man (10^5 cpm). Condiciones idénticas a Figura 88 .

factores del medio (proteasas, fluidez de membrana, agotamiento de los sustratos endógenos, etc.) .

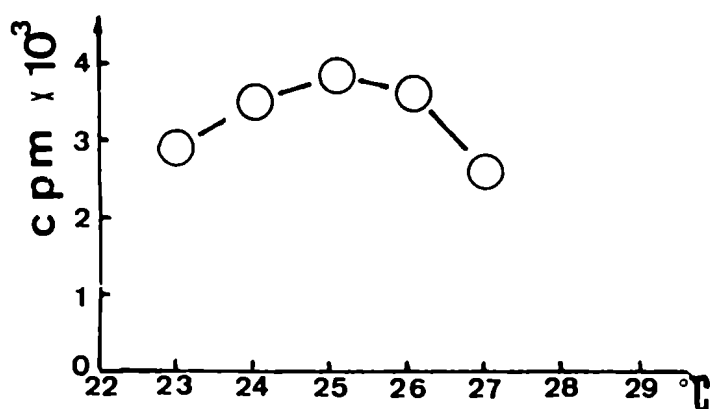
- El pH óptimo para la incorporación a los lipo-oligosacáridos fue el 6,8 cuando se empleó un tampón de Tris-Maleato mientras que empleando Tris HCl la incorporación fue menos eficiente y el óptimo se situó en 7.4 (Figura 89). Esta discrepancia puede atribuirse a que se están promediando datos de varias manosil transferasas.

FIGURA 89 Curva de pH



- La temperatura óptima para la incorporación fue de 25° C (Figura 90).

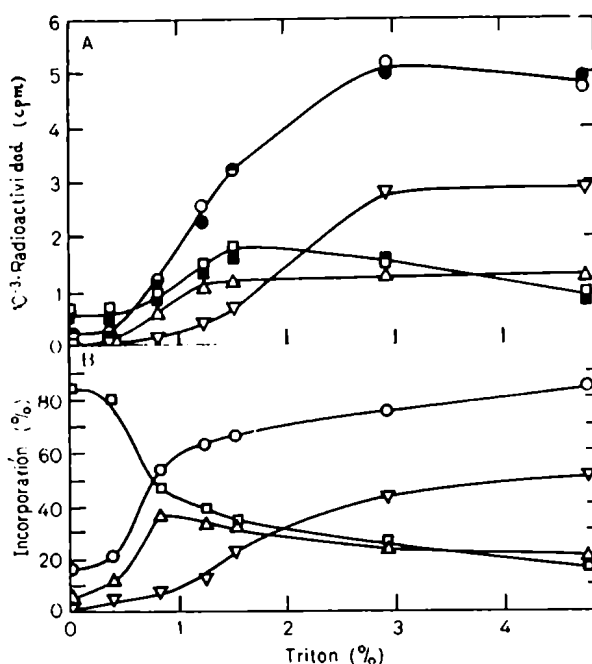
FIGURA 90 : Curva de temperatura óptima



- La formación endógena de lipo-oligosacáridos se inhibió ligeramente por la adición de detergentes, como ocurre en la síntesis del Dol-P-Man de insecto y en muchos otros sistemas similares. Sin embargo, cuando se agregó el lípido aceptor de insecto (u otro lípido) a la mezcla de incubación, se precisó asimismo algún detergente. Tanto el Nonidet P-40 como el estructuralmente similar Tritón X-100 resultaron adecuados para

la estimulación de la formación de lipo-oligosacáridos. En la Figura 91 se grafican las curvas de formación de éstos últimos respecto a la concentración de Tritón X-100. Se observan muy buenas incorporaciones a altas concentraciones de detergente. Cuando la concentración del detergente llegó a 4.8 % final en la mezcla de incubación, el 83 % de la radioactividad incorporada a la fase inferior estuvo constituida por lipo-oligosacáridos (Figura 91, B).

FIGURA 91 : Efecto de la concentración de detergente en la biosíntesis de doliquil-oligosacáridos



Condiciones del ensayo y símbolos como Figura 88 (página 174). (Se incubaron 20 min a 25 ° C). A) Radioactividad incorporada B) Distribución porcentual de la radioactividad en cada sustancia. Figura publicada en Quesada y Belocapitow (203).

Se aprecia que, en las condiciones para biosíntesis de lipo-oligosacáridos como las de la Figura 91, la máxima formación de Dol-P-Man se obtuvo con 1,5 % de Tritón X-100. En condiciones más favorables para la síntesis de este último la concentración óptima de

Tritón era de 0.2 - 0.7 % (Figura 56 en la página 137) .

Ello se debe a la presencia, en la mezcla de incubación, del lípido estimulador de la biosíntesis de lipo-oligosacáridos, que asocia parte del detergente, con lo que la concentración real de éste se hace menor.

Para experimentos como los descritos en el presente párrafo se utilizó también un método no destructivo para la separación de los derivados mono y difosforilados de dolicol. Este método consistió en separarlos por intercambio iónico con DEAE-celulosa (ver Métodos) . Como se aprecia en las Figuras 88 y 91 , se obtuvieron resultados similares a los proporcionados por el método destructivo (en que se analizaron los productos de hidrólisis ácida) . (El método fué puesto a punto por E. Belocopitow)

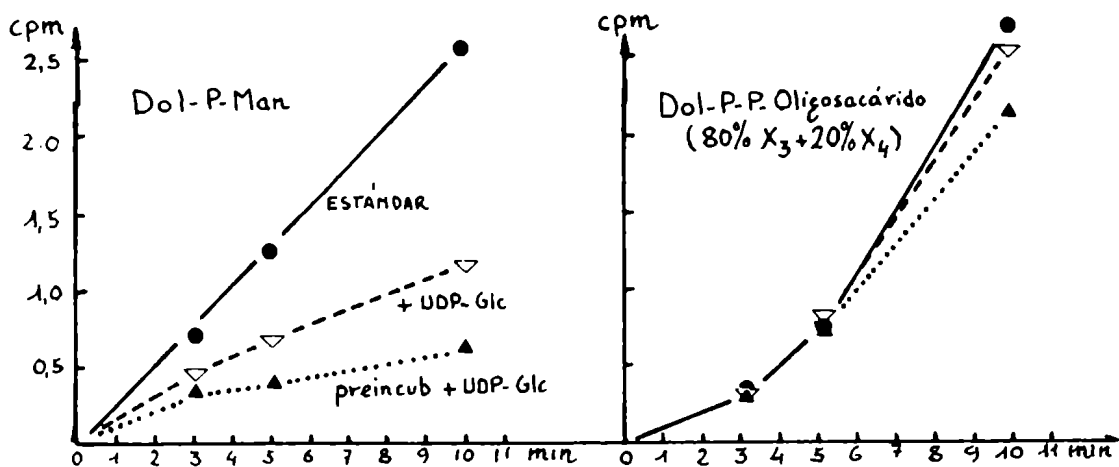
- La formación de los lipo-oligosacáridos se estimuló en presencia de iones Mn^{2+} mientras que el Mg^{2+} estimuló poco y el Ca^{2+} o Co^{2+} no parecen tener efecto, en las condiciones dosadas. El EDTA en concentración de 20 mM inhibió la biosíntesis de los glicolípidos pero a concentraciones menores estimulo la síntesis ciertos miembros de la familia de oligosacáridos. Un efecto similar fue descrito en células plasmáticas tumorales de ratas por Baynes y col. (66) . La espermina (20 mM) y la putrescina (15 mM) sustituyeron el efecto de magnesio aunque no estimularon tanto como el Mn^{2+} .

3.4.5. Origen de los residuos de manosa incorporados a los lipo-oligosacáridos

Teniendo en cuenta que las preparaciones de Ceratitis ricas en microsomas son capaces de transferir glucosa al doliquil fosfato endógeno a partir de UDP-Glc (ver 3.3.3.), se añadió este nucleótido azúcar como competidor del GDP(^{14}C)Man en incubaciones típicas para la síntesis de lipo-oligosacáridos.

Se hicieron adiciones simultáneas o previas (5 min) de 1 mM de UDP-Glc y a los 10 min se obtuvo una inhibición del 50 % y 80 % respectivamente en la biosíntesis de Doliquil-P-Man mientras que la del lípido-trisacárido no se alteró (Figura 92). Este

FIGURA 92 : Efecto de la disminución de Dol-P-Man ocasionado por la competencia del UDP-Glc por el Dol-P mientras que el lípido-oligosacárido no varía



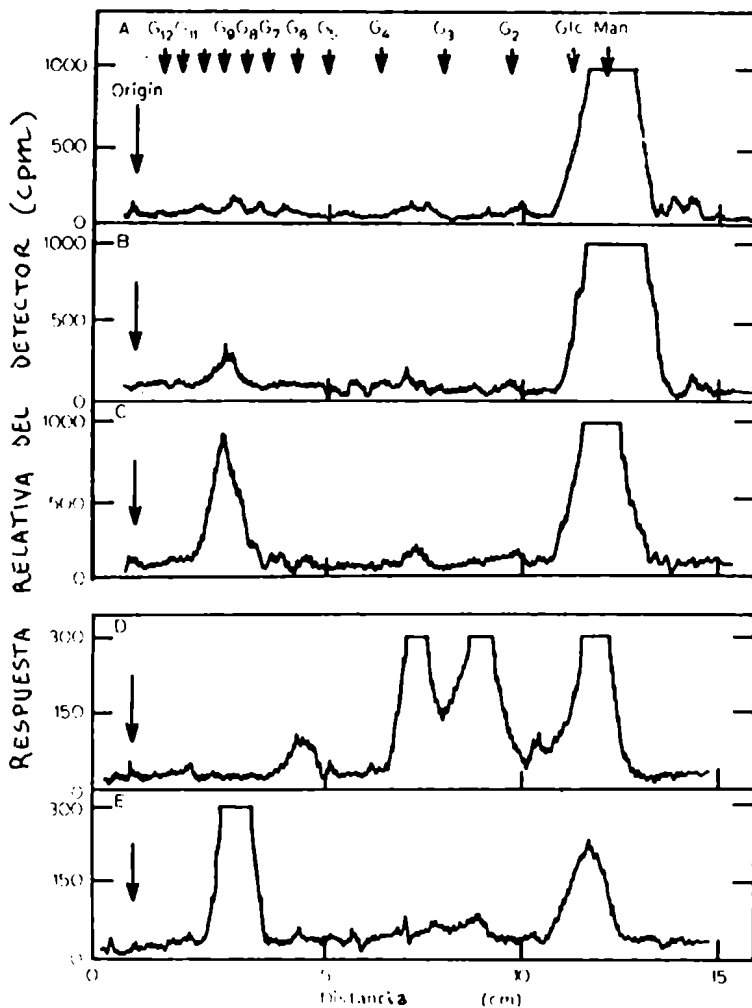
resultado indica que el Dol-P no parece ser un sustrato necesario para la biosíntesis del Dol-P-P-(Glc NAc)₂-Man, como se aprecia también en los casos en que se agrega Doliquil-P a la mezcla de incubación (Figura 81, página 167).

En la Figura 88, página 174, se observó que la incorporación de manosa al lípido (GlcNac)₂-Man no tuvo un tiempo de latencia, sugiriendo que la transferencia a partir del

GDP-Man fue directa. A pesar de ello, no puede descartarse una transferencia de manosas vía Doliquil-P-Man por lo que se hicieron experimentos en que se testeó este glicolípido- (^{14}C) como dador de manosas.

En la Figura 93 , A-C , se ve que la manosa radioactiva del Dol-P-Man no se incorporó

FIGURA 93 : Biosíntesis de lípido-oligosacáridos de tamaño grande



(A-C) Transferencia de radiomarca a partir del Dol-P ^{14}C Man. La mezcla de incubación contenía 11.000 cpm del dador, que fue llevado a seco bajo flujo de N_2 , con 5 mM EDTA, 1 mM GDP-Man y el acetato lipídico obtenido de 5 g de pupas de *Ceratitis*. Se añadió luego: Tritón X-100 4,2 % ; 120 mM de 2-mercaptoetanol, 0,16 M de Tampón Tris-maleato a pH 6,9, 8 mM de MnCl_2 y enzima microsomal (6 mg de proteína). El volumen final fue de 60 μl y se incubó a 25°C. Tras el procesamiento estándar se mezclaron las fases inferiores y los extractos con el solvente J. Se hidralizaron a pH 2,0 y el material hidrosoluble resultante se cromatografió con el solvente B. A) Control, sin incubación B) 4 min de incubación C) 20 min de incubación

(D-E) Transferencia de radiomarca desde lipo-oligosacáridos manosilados. La mezcla de incubación contenía 3.000 cpm de éstos junto con 0,66 de Tritón X-100 ; 90 mM de Tampón Tris-maleato a pH 7,7 ; 90 mM de 2-mercaptoetanol 9 mM de MnCl_2 y 6 mg de proteína enzimático. Se incubó 30 min a 24°C en ausencia (D) o en presencia de 3,6 mM de GDP-Man.

Esta figura se publicó en (203).

al lípido-trisacárido. En cambio apareció marcado un glico-lípido cuyo resto hidrofílico se comportó como un maltooligosacárido de 8-10 unidades sacáridas. No ha podido obtenerse suficiente cantidad de este oligosacárido como para evaluar su Peso Molecular por otros

métodos.

Esta sustancia se obtuvo también por incubación de una mezcla de lípido-trisacárido y lípido-"tetrasacárido" junto con GDP-Man y enzima microsomal (Figura 93, D-E).

Los experimentos expuestos indican que la manosa del lípido trisacárido procede del GDP-(^{14}C) Man mientras que para lipo-oligosacáridos de mayor tamaño, al menos uno de los manosilos procede del Doliquil-P-Man. Los experimentos de cinética apuntan en esa dirección; por ejemplo, en la Figura 87, página 173 , se ve que la incorporación de marca radioactiva al lípido-"tetrasacárido" creció siguiendo una curva sigmoideal precedida por la biosíntesis previa de Dol-P-Man y de lípido-trisacárido.

En la Tabla 60 se aprecia que la disminución de radioactividad específica en el

TABLA 60 : Desplazamiento de la marca radioactiva entre glicolípidos

Adiciones a los 20 min de incubación	cpm Incorporados en				
	Dol-P-Man	Lípido-trisacárido	Lip-"tetrasac"	(Lip-X ₆) + Lip-X ₇	Proteína
enzima calentada	18.860	4.007	408	5.110	1.8:8
enzima	15.998	3.738	871	7.125	3.587
enzima + GDP-Man 4 mM	14.884	1.920	890	6.932	4.373

Condiciones como en figura 87, pág. 173. Proteína se refiere a material insoluble en TCA caliente. Enzima= 1 mg. de proteína de Ceratitis .

GDP-Man acarrió un aparente desplazamiento de ^{14}C desde el lípido-trisacárido hacia los lipo-oligosacáridos y la proteína. Esto sugiere una relación precursor-producto (ver también Tabla 62 en página 186).

3.5. FORMACION DE DOLICOL - OLIGOSACARIDOS CONTENIENDO ACETILGLUCOSAMINA

A pesar de que el Dolicol-P-P-GlcNAc fue el primer poliprenil-azúcar de insecto detectado, concomitantemente a la síntesis de quitina (ver 3.2. y (164, 180)), resultó muy dificultoso obtener lipo-oligosacáridos con radiomarca en acetilglucosamina. Esta parece ser una característica general para otros eucariotes donde, como en artrópodos, las transferasas de GlcNAc son lábiles y los sistemas "in vitro" muy poco eficientes.

3.5.1. Doliquil-P-P- (GlcNAc)₂

No se pudo elongar el Dol-P-P- (¹⁴C) GlcNAc por re-incubación con UDP-GlcNAc, como se ha descrito para otros organismos (167). Sólo se obtuvo un aparente lípido- (disacárido) con radiomarca en GlcNAc cuando se utilizaron larvas de 6 días de Ceratitis y se incubaron sus homogenatos en condiciones apropiadas (Figura 94). La mitad hidrofílica, liberada por hidrólisis ácida débil del glicolípido, se comportó como N,N'-diacetilquitobiosa en cromatografía en papel, con diferentes solventes (Tabla 61).

FIGURA 94

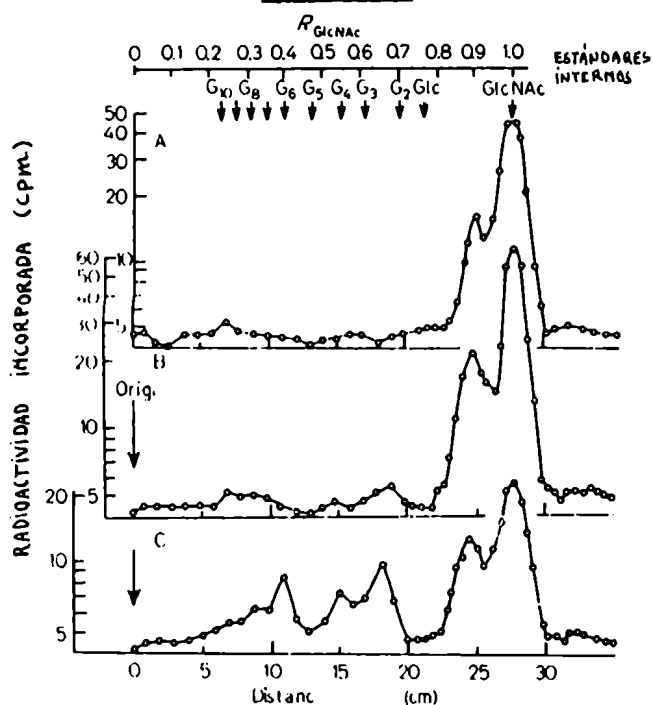


Figura 94: Formación de lipo-oligosacáridos radiomarcados en $(^{14}\text{C})\text{GlcNAc}$.

Se incubaron 30 nanomoles (en P) de Dol-P con: Tritón X-100 1,5%; UDP(^{14}C)GlcNAc 40 μM (105 cpm); 2-mercaptoetanol 50mM y enzima de pupas (1 mg. de proteína). Vol. final=55 μl . Las muestras duplicadas se incubaron, procesaron y contaron como en figuras anteriores. Las cromatografías en papel se desarrollaron con el solvente B. (a) 7 minutos antes de terminar la incubación (20 min) se añadieron: Glic de agua bidestilada. (b) Además del Dol-P la incubación contenía aceptores de insecto (lípidos aceptores, pág. 60) y también se añadió agua como en A. (c) Igual a B pero el agua se substituyó por 0,2 micromoles de GDP-Man disueltos en 10 μl de agua. Glc-Glc^mmalto-oligosacáridos añadidos como estándares. Figura publicada en Quesada y Bilezikian (203).

TABLA 61; Comportamiento cromatográfico del lípido-disacárido de insecto y de su producto de hidrólisis ácida suave.

	SISTEMA / Solvente	MOVILIDAD
(I) GLICOLIPIDOS INTACTOS		
. Dol-P-P-(GlcNAc) ₂ de hígado	TLC / P	3,2 ± 0,1 cm
. Lípido-disacárido de insecto	idem	3,0 ± 0,3 cm
(II) PRODUCTOS DE HIDROLISIS ACIDA SUAVE		
. (GlcNAc) ₂ de hígado	Papel / A	R_{GlcNAc} 0.66
. Disacárido de insecto	idem	0.71
idem	Papel / B	0.81
. (GlcNAc) ₂ de hígado	idem	0.87

3.5.2. Doliquil-P-P- (GlcNAc)₂ - Man

Cuando se añadió el lípido aceptor de insectos a la incubación-tipo para síntesis de lípido diacetilquitobiosa no se modificó la distribución de radioactividad en los cromatogramas (Figura 94, B). Cuando se incubó simultáneamente en presencia de GDP-Man sin marca, tampoco se apreciaron cambios significativos. Al añadirse el GDP-Man (4 mM) 7 min antes del término de la incubación (20 min) decreció la incorporación de ¹⁴C en el lípido diacetil-quitobiosa y simultáneamente aparecieron marcados lipo-oligosacáridos de mayor tamaño (Figura 94, C). Este resultado parece indicar que el lípido disacárido se elongó con manosas a partir del GDP-Man. En realidad, en las incubaciones sin GDP-Man agregado se advertían pequeñas pero significativas incorporaciones de marca a estos glicolípidos largos (Figura 94, A y B) probablemente por adición de manosas provenientes de GDP-Man endógeno (una hipótesis alternativa sería que se estén agregando acetilglucosaminas "externas" a cadenas preformadas).

El resto hidrofílico que migró en cromatografía en papel (con el solvente B) entre maltosa y maltotriosa se comportó exactamente como el lípido trisacárido radiomarcado en manosa descrito en 3.3.2. A modo de control, ambos trisacáridos con la marca respectivamente en GlcNAc y en Man, se mezclaron y recromatografiaron en papel con el solvente B obteniéndose un único pico simétrico (Figura 95).

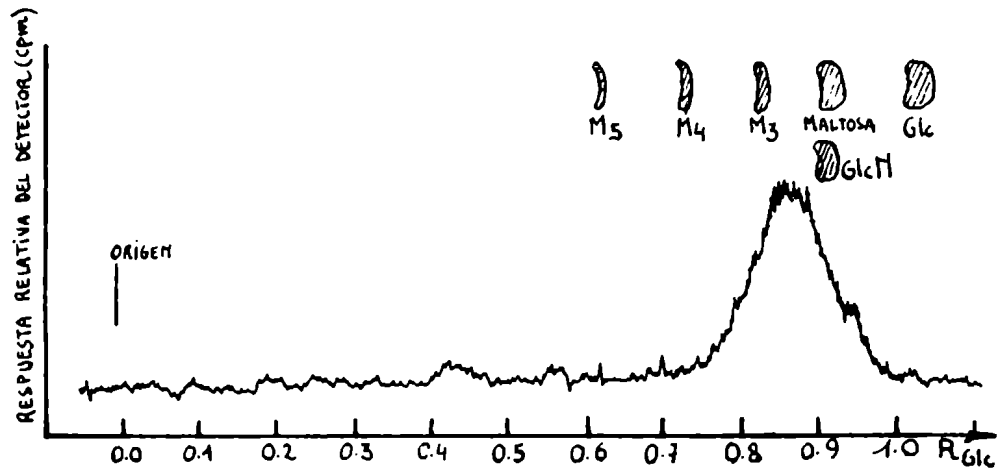


FIGURA 95: Cromatografía en papel de la mezcla de trisacáridos de hígado y de insecto. (Solvente B)

Debido a su escasez los lípido-oligosacáridos radiomarcados con (^{14}C) GlcNAc de mayor tamaño no han podido ser analizados todavía.

Por otra parte, la presencia de UDP-GlcNAc en el medio de incubación favoreció la formación de lípido-oligosacáridos radiomarcados con manosa (Tabla 62, A). Tanto el lípido-trisacárido como el lípido-"tetrasacárido" aumentaron ligeramente (10%) su marcación con respecto a los valores en ausencia de UDP-GlcNAc (Tabla 62, B). Esto puede explicarse como el resultado de una mayor cantidad de lípido-quitobiosa disponible para su elongación con manosas. La estimulación observada en lípido-oligosacáridos de mayor tamaño es difícil de interpretar debido a las bajas incorporaciones.

TABLA 62 : Desplazamiento de la ^{14}C Manosa por adición de UDP-GlcNAc

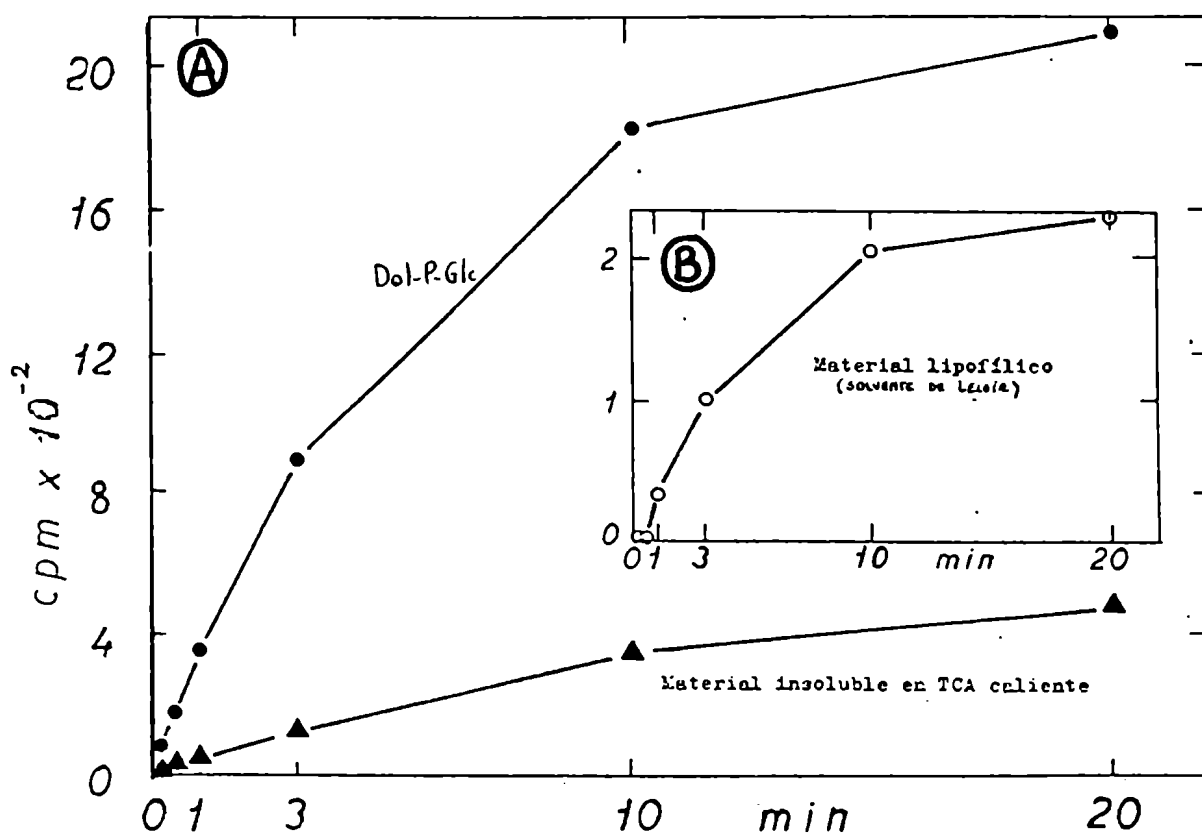
A) Adiciones	radioactividad incorporada a			
	Lípido-manosa		Lípido-oligosacárido	
	cpm	%	cpm	%
NINGUNA	18.489	100	8.085	100
+ aceptor	33.107	179	34.235	423
+ UDP-GlcNAc	15.101	81	8.742	108
+ aceptor + UDP-GlcNAc	29.300	158	44.713	553

B) Adiciones	Lípido-Trisac.*		Lípido-"Tetrasacárido"		Lípidos mayores ($X_8 + X_7 + X_9$)	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
	NINGUNA	1.757	100	3.210	100	3.118
+ aceptor	13.630	775 (100)	13.717	427 (100)	6.621	212 (100)
+ aceptor + UDP-GlcNAc	15.599	887 (110)	15.637	487 (114)	13.477	432 (203)

3.6. FORMACION DE DOLICOL - OLIGOSACARIDOS CONTENIENDO GLUCOSA

Cuando se incubaron extractos microsomales de insecto con UDP- $[^{14}\text{C}]$ - Glc, además de la formación del Dolicol-fosfato-glucosa descrito en el capítulo 3.3.3. , se observó incorporación de radioactividad a material insoluble en TCA y a sustancias extraíbles con cloroformo/metanol/agua 10:10:3 (Figura 96).

FIGURA 96 : Incorporación de radioactividad a material soluble en cloroformo/metanol/ /agua 10:10:3 y al insoluble en TCA caliente

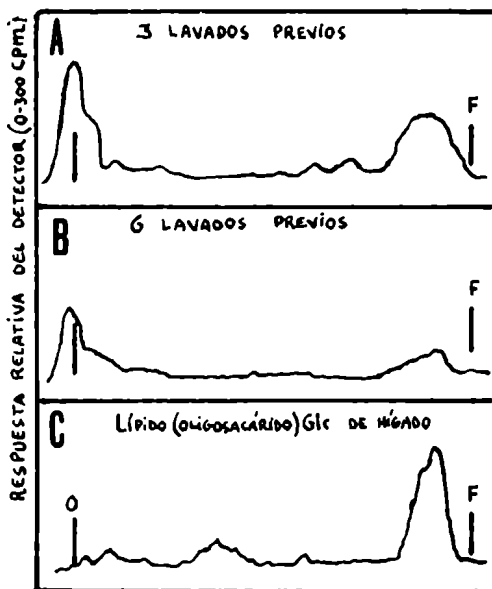


- A Se procesaron las muestras de acuerdo a lo explicado en Métodos (página 66)
 B El material extraído con el solvente de Leloir se cromatógrafió en papel con el mismo solvente. Las sustancias lipofílicas migraron con el frente y se eluyeron y contaron en centelleo líquido.

El 80 % de las sustancias extraídas con este último solvente resultó ser hidrosoluble.

Cuando se pretendió reducir esa contaminación mediante el recurso de aumentar el número de lavados previos (ver Métodos, página 66-67) se observó que también disminuía la sustancia lipofílica (migra con el frente, Figura 97).

FIGURA 97 : Radiocromatogramas de sustancias extraíbles con el solvente de Leloir



A) Extracción estándar (Materiales y Métodos, página 66)

B) Extracción precedida de lavados adicionales

C) AE-Glc de hígado, cromatografiado como patrón.

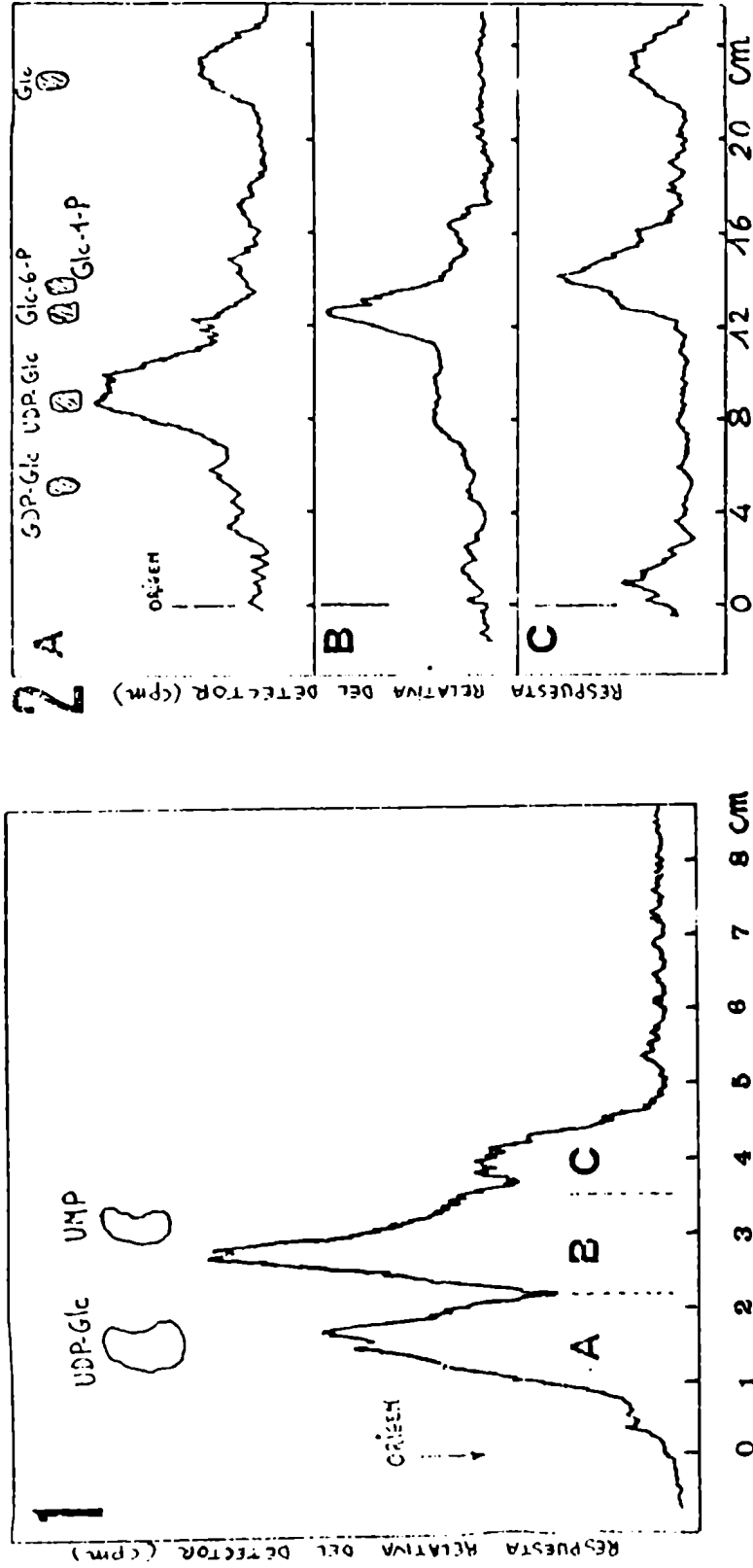
Las muestras se cromatografiaron en tiras de 14 cm de papel con el solvente de Leloir, en forma ascendente. En el origen, o con poca movilidad, se encuentran las sustancias hidrofílicas; las lipofílicas van al frente.

Se comprobó que la sustancia lipofílica era ligeramente soluble en el solvente utilizado en los lavados (cloroformo/metanol/agua) (1:16:16) por lo que sólo se hicieron tres lavados previos, manteniendo la contaminación de material hidrofílico.

Análisis de material hidrosoluble

Se eluyeron las sustancias radioactivas cercanas al origen en cromatogramas como los de la Figura 97 y se las cromatografió, nuevamente, con el solvente E . Como se aprecia en la Figura 98 las sustancias radiomarcadas se separaron en tres entidades. Estas se recromato-

FIGURA 98 : Análisis de sustancias hidrosolubles extraídas con el solvente de Leloir



El material eluido de cromatogramas como los de la Figura 97 se cromatografió en tiras de papel de 9 cm de largo con el solvente E, para separarlo en las sustancias denominadas A, B y C (Cuadro 1). Estas fueron eluidas y cromatografiadas por separado durante 14 hs con el solvente E. (Cuadro 2),

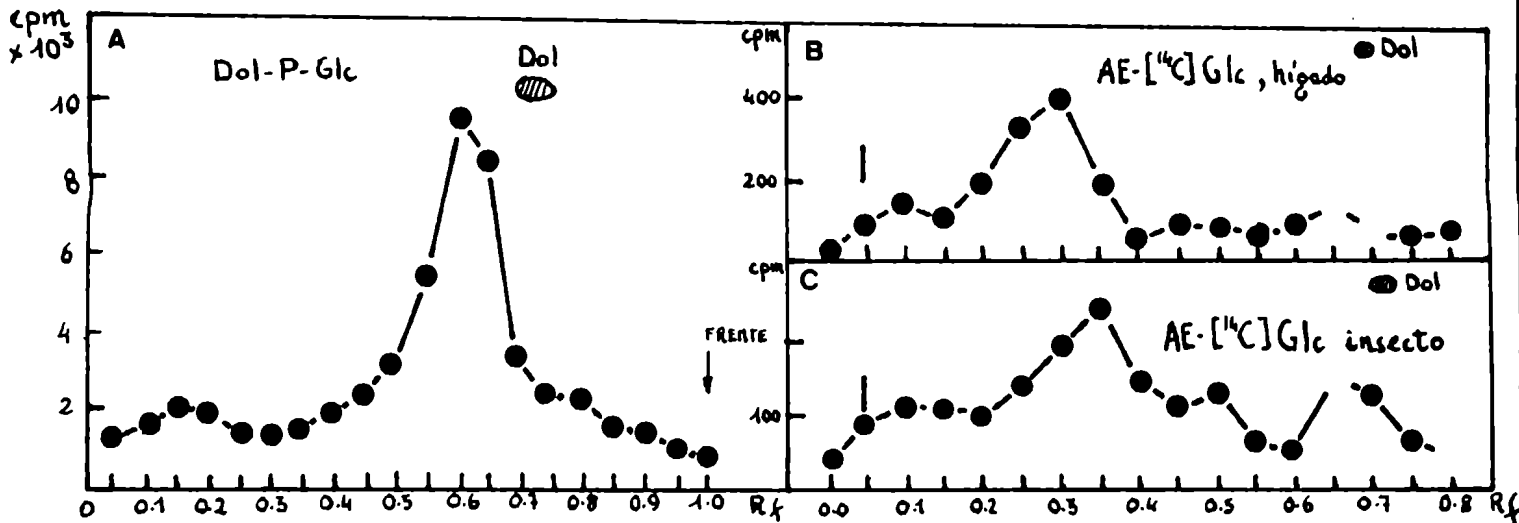
grafieron por separado en el mismo solvente. La sustancia de menor movilidad co-cromatografió con UDP-Glc y, sometida a hidrólisis ácida liberó una sustancia que se comportó como glucosa. La sustancia de movilidad intermedia se comportó como Glc-6-P y resistió una hidrólisis ácida suave. Por tratamiento con fosfatasa alcalina (Métodos) liberó glucosa radioactiva. La sustancia de mayor movilidad se comportó, por los mismos criterios, como Glc-1-P.

El análisis cromatográfico de la curva de marcación "in vitro" de sustancias a partir de UDP- (^{14}C) Glc permitió apreciar una muy rápida degradación de éste dando Glc-1-P y Glc-6-P (no se muestra).

3.6.1. Identidad del material lipofílico

Al cabo de un minuto de incubación ya pudo detectarse la sustancia liposoluble en los extractos con el solvente de Leloir. Esta sustancia fue totalmente hidrolizada a pH= 2,0 en caliente, liberando una sustancia con comportamiento de oligosacárido. Por su solubilidad, su comportamiento cromatográfico y su labilidad al ácido, se pensó que la sustancia podía ser un poliprenil-oligosacárido - (Glc) similar al AE-Glc descrito en hígado de mamífero (143). Se comparó el comportamiento del presunto lípido-oligosacárido de insecto con el AE-Glc de hígado de rata en diferentes sistemas cromatográficos. Tanto en capa fina (Figura 99) como en columna analítica de intercambio aniónico (DEAE_celulosa) (Figura 100) el glicolípido de insecto se comportó en forma similar al AE-Glc de hígado y en forma diferente al Dol-P-Glc.

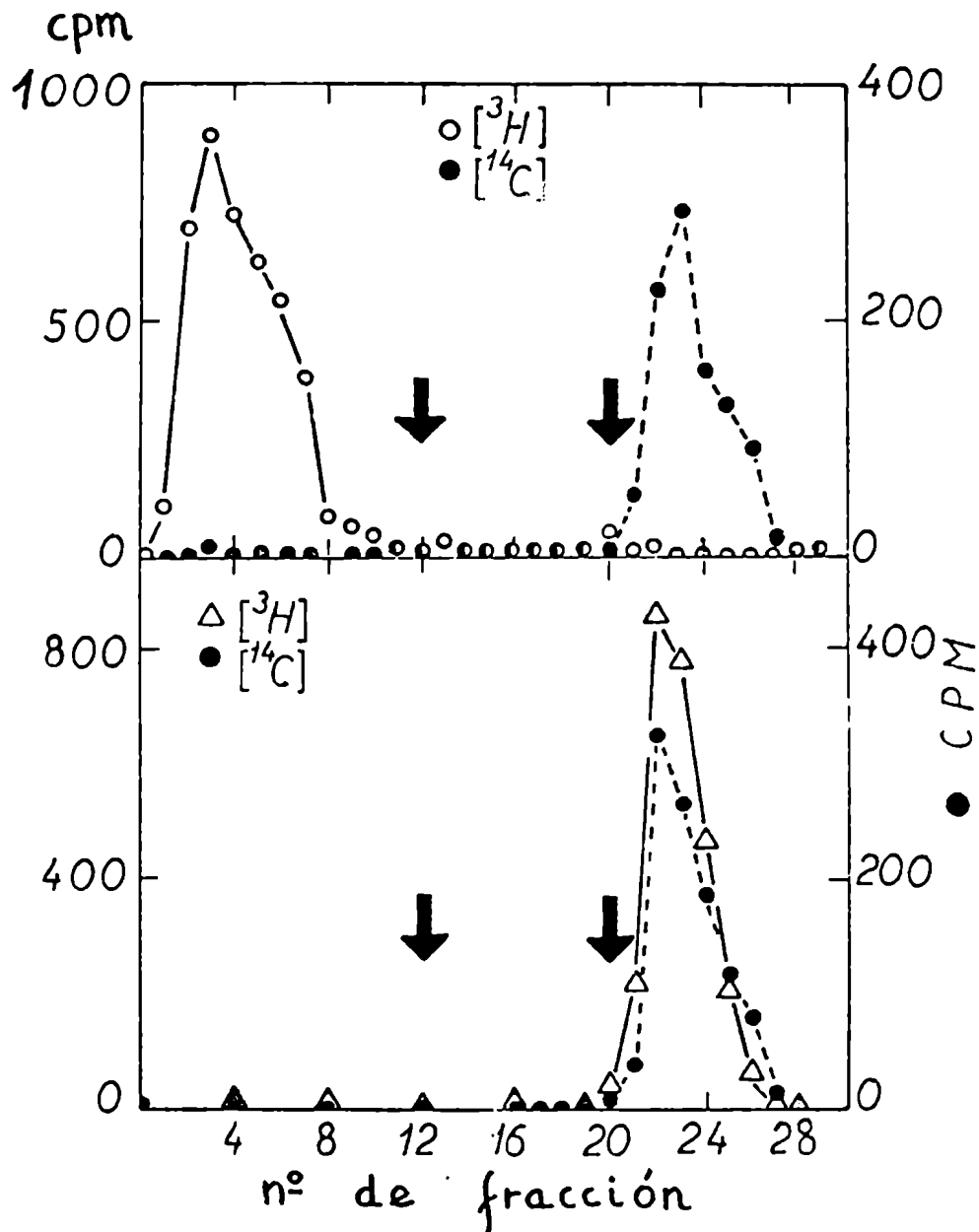
FIGURA 99 : Comportamiento en cromatografía de capa fina del aceptor endógeno de glucosa, de insecto.
Solvente O



La propiedad de la Concanavalina A de retener al lípido-oligosacárido (Glc) de hígado (Staneloni, comunicación personal) se aprovechó para comparar el lípido oligosacárido de insecto con aquel y con los lípido-oligosacáridos • ((¹⁴C) Man) de insecto.

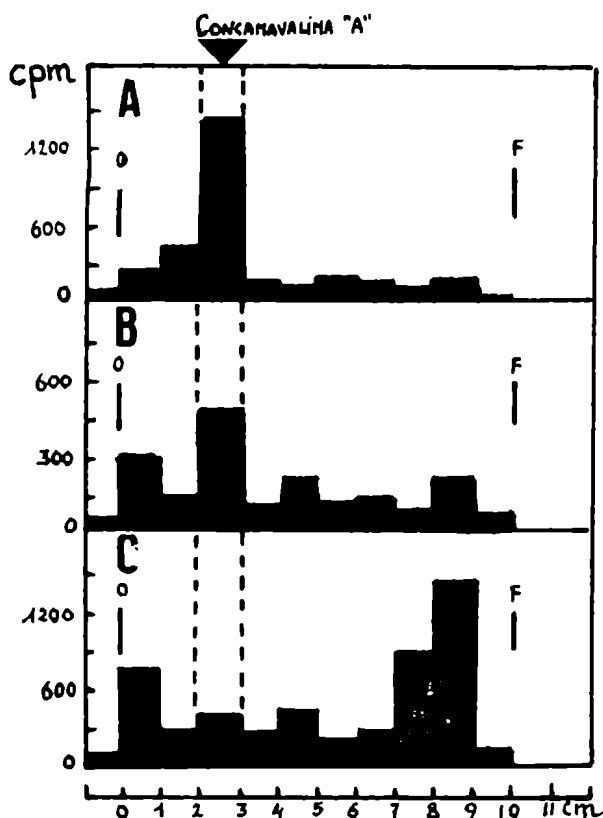
En la Figura 101 (ver página 193) se aprecia que los lipo-oligosacáridos conteniendo Glc fueron retenidos por la barrera de Con. A, mientras que el Dol-P-Glc no fue retenido en absoluto.

FIGURA 100 : Cromatografía en columna de DEAE-celulosa microanalítica del AE-Glc de insecto



La cromatografía se realizó como se describe en Métodos (página 84). Se mezcló el glicolípido de insecto (●---●) con Dol-P-Glc de hígado (○—○) ó con AE-Glc de hígado (Δ—Δ) y se pasó la muestra por la columna, que se eluyó con 2 y 15 mM (flechas) de formiato (NH_4) en el solvente J .

Figura 101: Afinidad del AE-Glc de insecto por la Concanavalina



Se utilizó papel SS2043a de 25,5 mm de ancho por 14 cm de largo. En el tercer cm. a partir del origen se sembró, a todo lo ancho del papel, una solución conteniendo: 1 mg de Con. "A" (Grado IV, Σ) 15 micromoles de NaCl; 0,02 micromoles de $MgCl_2$ y 0,02 micromoles de $MnCl_2$. Se secó con aire frío forzado² y se sembraron 10 μ l de cada solución conteniendo los lipido-azúcares. No se secó. Se cromatografió en forma ascendente con el solvente J, con un flujo promedio de 9cm/hora. Después de la corrida se cortaron bandas de 1cm y se contaron en centelleador. A) EA-Glc de hígado.

B) EA-Glc de insecto .C) Dol-P-Glc insecto.

El análisis de los productos de degradación de la hidrólisis ácida débil reveló que el oligosacárido de insecto se comportó como una sustancia de mayor dispersión que el de hígado y de tamaño aparente menor (Figura 102). Además, en ambos casos una pequeña parte de la radioactividad permaneció en el origen como si fuera un oligosacárido de mayor tamaño. Esta sustancia, extraída y recromatografiada volvió a permanecer en el origen del cromatograma. Por lo escaso del material no se pudo analizar si poseía carga neta.

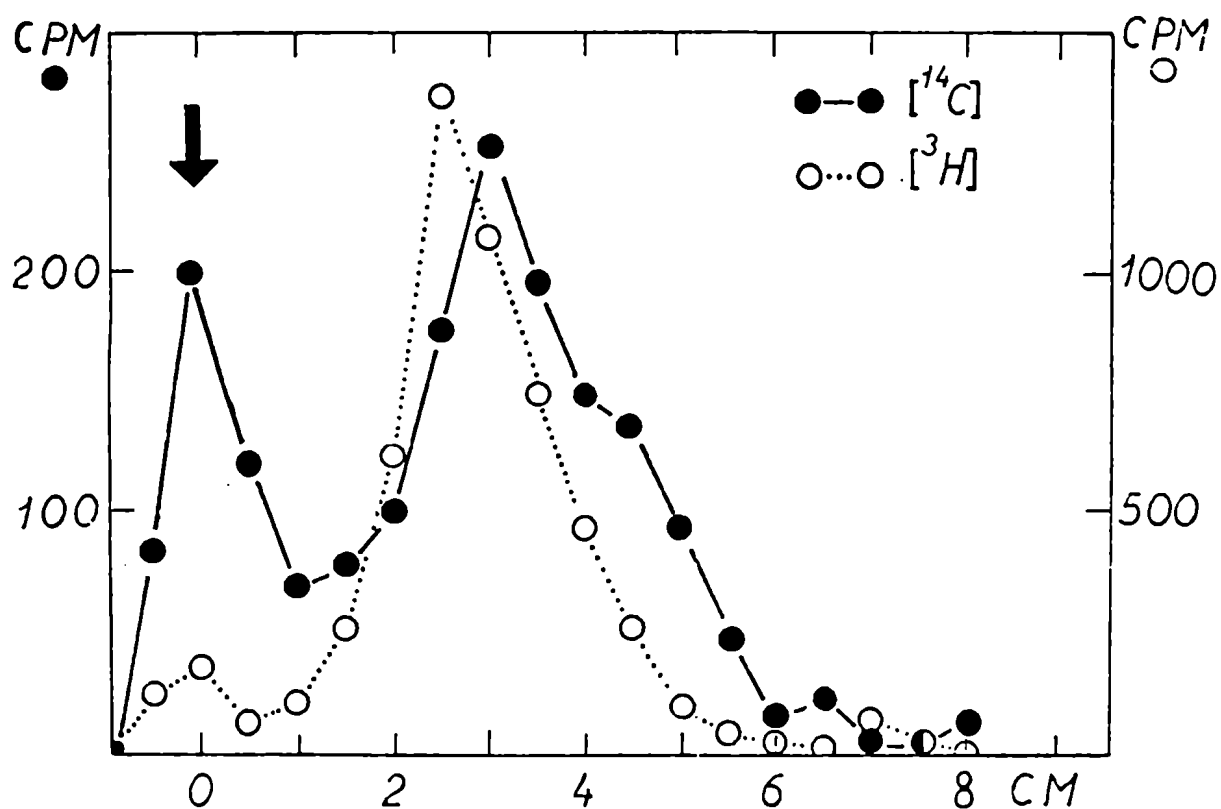


Figura 102: Cromatografía en papel del resto oligosacarídico del AE-Glc de insecto.

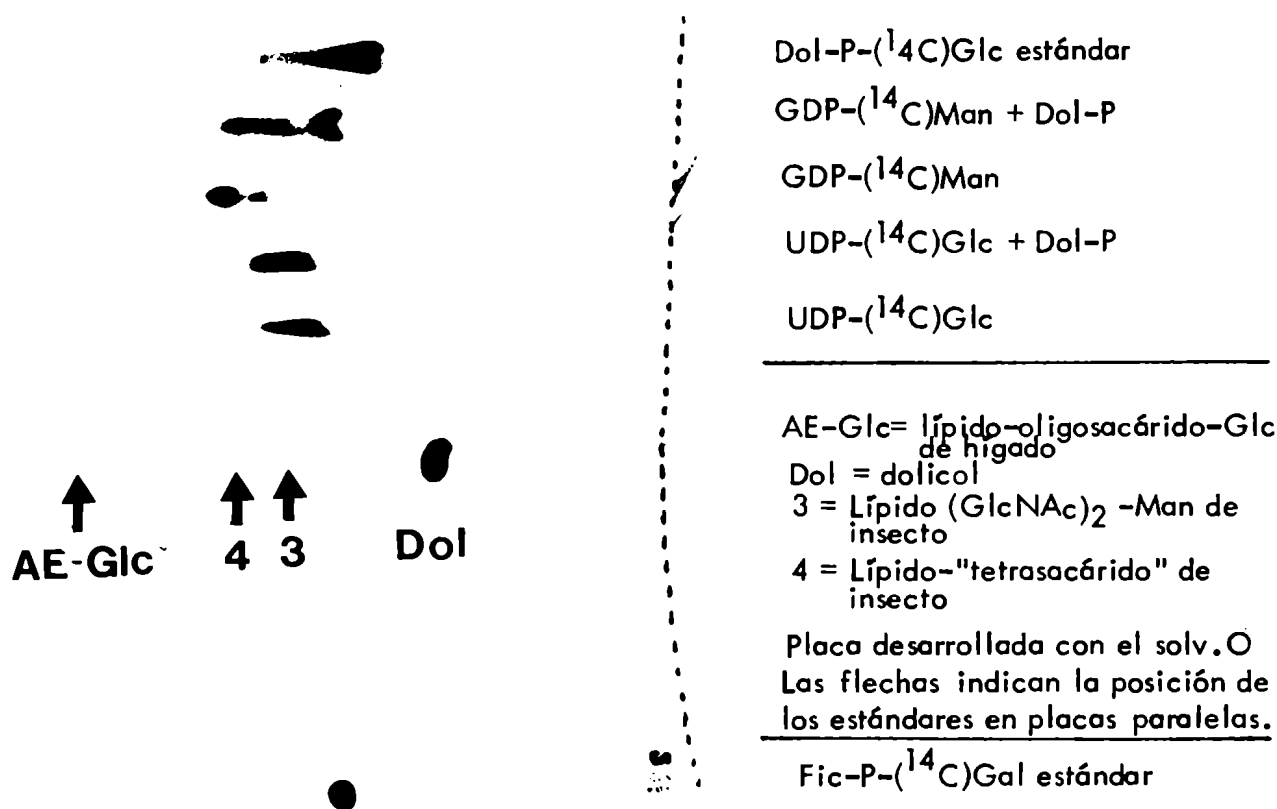
Se mezcló AE-(³H)Glc de hígado (10.000 cpm) (O...O) con AE(¹⁴C)Glc de insecto (1.700 cpm) (●—●) y se llevaron a seco. Se los sometió a hidrólisis ácida suave (PH=2,0) y los restos hidrofílicos liberados se cromatografiaron con el solvente B. Se cortaron bandas de 0,3 cm y se contaron en centelleador ambos isótopos.

Resultados previos indicarían que la biosíntesis del lípido (oligosacárido) glucosa se inhibió en presencia de detergentes y se estimuló por ciertas fracciones de lípidos aceptores de insecto. El manganeso y el Mg estimularon la biosíntesis endógena.

3.7. DOLICOL-OLIGOSACARIDOS EN ARTEMIA SP (CRUSTACEA)

Se estudió la capacidad de las preparaciones de Artemia salina y Artemia sp para sintetizar lipo-oligosacáridos radiomarcados con manosa. En la Figura 103 se aprecia que se formaron glicolípidos que cromatografiaron en la posición del lípido trisacárido y " tetrasacárido " de insecto, además de otros que por su escasez no han sido caracterizados. El glicolípidos principal sólo se hidrolizó (a pH = 2.0) en un 20 % , lo que indicaría que se trata de una mezcla, donde predominan glucósidos resistentes.

FIGURA 103: Autorradiografía de la TLC de lipo-oligosacáridos de Artemia



(Ver también fig 77, página 160)

3.8. BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS

3.8.1. Glicosilación a partir de nucleótido-azúcares

A partir de GDP- (^{14}C) Man se incorporaron manosas a la fracción insoluble en ácido tricloroacético caliente al 10 % en prácticamente todos los ensayos en que se obtuvo biosíntesis de manolípidos.

Más de la mitad (entre 55 y 70 %) de este material pasó a ser soluble en TCA 10 % después de ser tratado durante 72 hs con proteasa de Streptomyces griseus (ver Métodos).

La quimotripsina y otras proteasas también fueron capaces de solubilizar la marca radioactiva. Se asumió, por tanto, que se trataba de una glicoproteína que contenía manosa. Las sustancias solubilizadas se cromatografiaron en Sephadex G-15. Casi toda la marca emergió con el volumen muerto. Al pico de radioactividad se lo sometió a electroforesis sobre papel y se obtuvieron dos picos radioactivos que migraron tanto en solvente ácido como básico como si fueran glicopéptidos.

A partir de UDP- (^{14}C) GlcNAc se obtuvo una sustancia precipitable por TCA que, sometida a β -eliminación, sufrió la pérdida de un 60 % de la radioactividad que pasó a ser soluble en TCA.

Se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida (con y sin SDS) del material proteínico radiomarcado, obtenido a partir de ambos nucleótido-azúcares. Los resultados fueron erráticos (gran dispersión de la marca radioactiva y poca reproducibilidad de un ensayo a otro). Ello parece debido a la acción de proteasas ya que la biosíntesis concomitante de quitina fué reproducible.

3.8.2. Glicosilación de proteínas a partir de dolicol derivados

Los datos cinéticos sugieren que los lipo-oligosacáridos pueden estar involucrados en la manosilación de proteínas mencionada en 3.7.1. No se ha podido obtener manosilación fehaciente de proteínas de insecto a partir de los manolípidos aquí descritos. Sin embargo se probó la capacidad de estas últimas para actuar como sustratos de las manosiltransferasas de hígado de rata.

En la Tabla 63, experimento 1 se ve que tanto los restos oligosacarídicos de los mano-

TABLA 63: Transferencia de radiomarca de los manolípidos de insecto a los aceptores de hígado de rata.

EXPERIMENTO	Manolípidos de	Incorporación de radioactividad			
		Sin incubar(control)		Incubados	
		FASE ORGAN.	INSOLUBLE EN TCA	FASE ORGAN.	INSOLUBLE EN TCA
1	HIGADO	5.046	95	4.211	543
	INSECTO	14.544	78	12.117	973
2	INSECTO	2.400	110	376	1.745

Los lipo-oligosacáridos preparados con las respectivas enzimas se purificaron en columnas microanalíticas de DEAE-Celulosa (métodos). Se incubaron exactamente como describen Behrens y col(14) con microsomas de hígado conteniendo 4,5 mg.de proteína.El detergente usado en el experimento 1 fué Deoxicolato de Na al 0,5% mientras que en el experimento 2 se utilizó Tritón X-100 al 3,8%. Se incubó 5 min a 25°C. Todos los ensayos se hicieron por duplicado (la cifra en la tabla es el promedio) y han consignado los mejores experimentos. Tabla publicada en Quesada y Belocapitow (203).

lípidos de insecto como los de hígado son transferidas a glicoproteína(s) por las enzimas microsomales de hígado. Cuando el experimento se realizó en condiciones de total disgregación de las membranas (3.8 % final de Tritón X-100) se ve que alrededor del 80 % de la radioactividad se transfirió a la fracción TCA-insoluble (Tabla 63, Experimento 2).

No se sabe si estos resultados " in vitro " representan un fenómeno fisiológico o - por el contrario - se trata de un artificio. Se sabe que en parecidas condiciones la ovoalbúmina puede llegar a glicosilarse en sitios fisiológicamente aglicosilados (206).

En cualquier caso es evidente que las manosiltransferasas de hígado reconocieron los glicolípidos de insecto como si fueran los sustratos naturales.

Los microsomas de Ceratitis fueron aptos, en cambio, para transferir la parte azúcar del lípido-oligosacárido (^{14}C) Glc de rata (EA-Glc) a la proteína endógena. Como se demostró en 3.6 este gluco-oligosacárido-lípido es prácticamente idéntico al homólogo de insecto. En la Tabla 64 se ve que los microsomas de insecto transfirieron la radioactividad con similar eficiencia a la de los de hígado.

TABLA 64 : Formación de glicoproteínas a partir de doiquil oligosacáricos

AE-Glc de	Enzima de	C/M/H ₂ O 10:10:3	Proteína (TCA insol.)
Hígado	Hígado	1.745	819
Hígado	Hígado (control)	3.024	67
Hígado	Insecto	1.356	667
Hígado	Insecto (control)	2.668	51

El AE-Glc de hígado se obtuvo como se explica en Métodos (página 64). Después de la incubación las muestras se procesan como se describe en Métodos. Las diferencias corresponden a sustancias aparecidas en otras fracciones. Los controles se realizaron con enzimas pre-cien-
ados.

La curva de incorporación de radioactividad a glicoproteína parece indicar que existió degradación del AE-Glc y/o de la glicoproteína sintetizada (Figura 104). A los 8 min

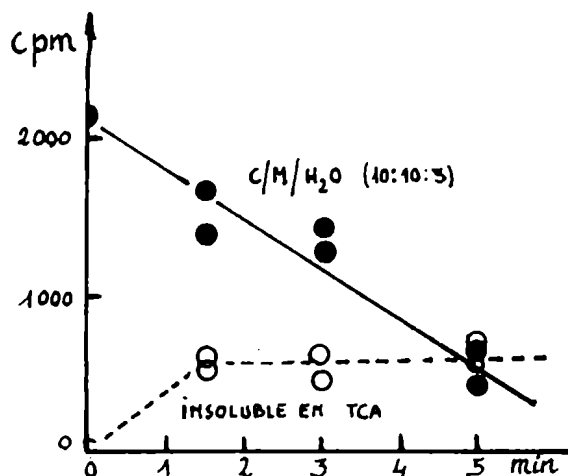


Figura 104: Incorporación de radiomarca a glicoproteína(s) en función del t.

La solución con AE-Glc se llevó a seco bajo N₂ y se procedió como se indica en la Fig.105 y en métodos.

el AE-Glc está totalmente consumido y casi no se detectó radioactividad en material insoluble en TCA .

El producto insoluble en TCA se trató con urea para romper los puentes hidrógeno entre cadenas polipéptidas y con ditiotreitól para clivar los puentes disulfuro. Se lo cromatografió por Sephadex G-50 obteniéndose el perfil que se observa en la Figura 105 . La heterogeneidad de tamaños podría explicarse por la presencia de proteasas endógenas en forma similar a lo que parece suceder en levadura (140) .

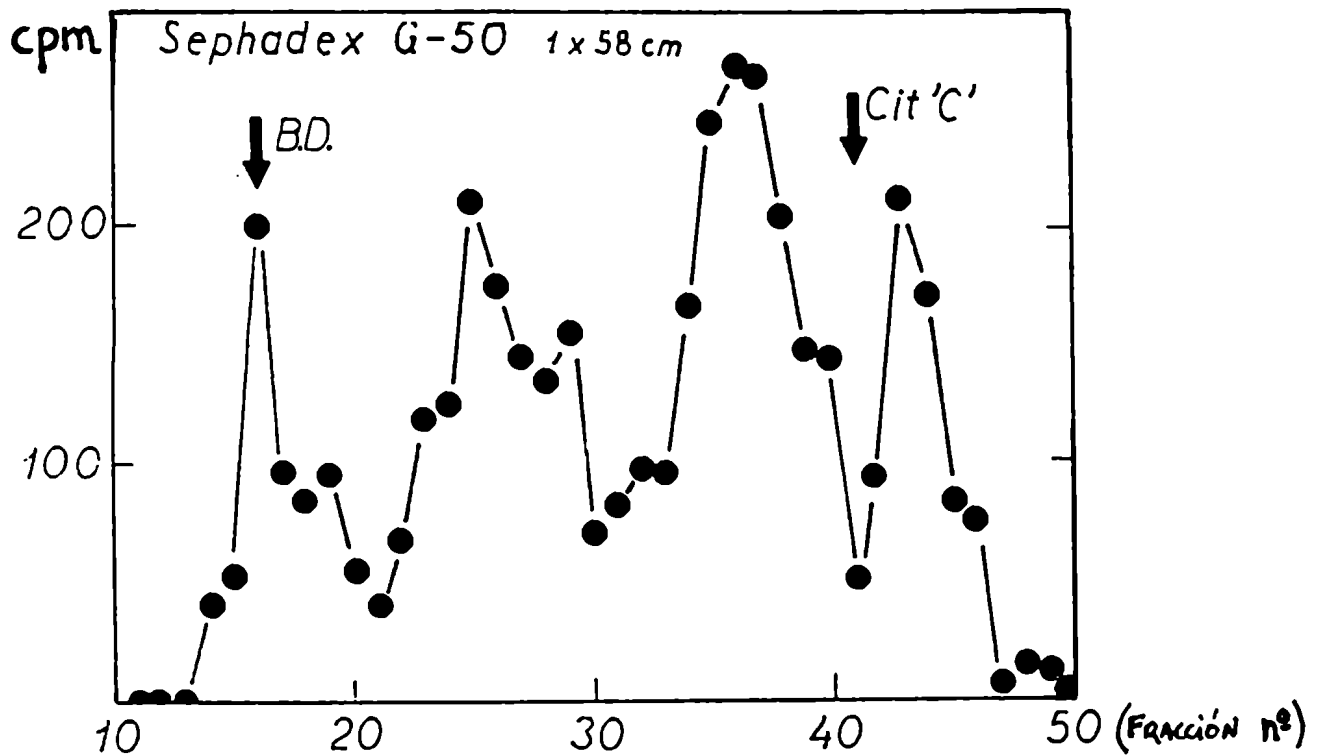


FIGURA 105 : Filtración molecular de las sustancias radiomarcadas insolubles en TCA caliente

La transferencia del EA-Glc a proteína se realizó de acuerdo a lo indicado en Métodos, con una concentración final de Tritón X-100 de 0,5 %. Para evitar la interferencia de ese Tritón en la precipitación de la glicoproteína (aprox. 0,04 % cuando se añade el TCA), se añadió SDS (0,05 % final) y KCl (6 mM final). La suspensión en TCA se dejó a 0 ° C por min., se centrifugó y se descartó el sobrenadante que contenía los detergentes. Se volvió a resuspender en TCA 10 % durante 2 hs. a temperatura ambiente y luego se calentó 5 min a 100 ° C. Después de lavados sucesivos con éter etílico y metanol, se añadió a la muestra 0,4 ml de: Tris-HCl pH 7,2 50 mM; ditiotritol 35 mM; urea 4 M; Tritón X-100 0,75 %; SDS 0,1 % y glicerol 1,5 % (tomado de diferentes autores). Se utilizó una columna de Sephadex G-50 de 1,0 x 50 cm equilibrada con 0,1 % SDS en tampón fosfato 5 mM a pH = 6,8. A partir de la fracción 10 se tomaron volúmenes de 1,8 cc. B.D. indica dextrano azul. Cit.C. = Citocromo "C". El oligosacárido del EA-Glc, en una cromatografía previa de calibración apareció en las fracciones 40 a 45.

Por otra parte, la incubación del Dolicol-P-P-GlcNac y Dol-P-P-(GlcNac)₂ de insecto (o de hígado) con microsomas de insecto originó la síntesis de un material TCA 10 % (frío) insoluble. Parte de este material se solubilizó en TCA 10 % calentando a 100 ° C durante 3-5 minutos. Tratada con álcali suave (β -eliminación), un 75 % de la radioactividad incorporada a partir de Dol-P-P-GlcNac se solubilizó en TCA, en forma similar a lo que sucedió con la sustancia sintetizada a partir de UDP-GlcNac (Tabla 65). La incorporación a partir de Dol-P-P-(GlcNac)₂ fue sumamente baja, por lo que resulta pre-

matura sacar conclusiones.

TABLA 65 : Biosíntesis de una glicoproteína β -eliminable

Material radiomarcado o partir de	cuentas / min incorporadas a			%
	Insoluble en TCA	Soluble en TCA	(Después de β -eliminación) Insoluble en TCA.	
UDP-GlcNAc	15.400	9.453	5.912	30
Dol-P-P-GlcNAc	440	337	105	25
Dol-P-P-(GlcNAc) ₂	169	160	0	0

Las incubaciones se realizaron con enzima de *Palendus dermestoides* (larvas) en una mezcla conteniendo: Tris-Maleato 0,1 M a pH = 8,0 como tampón; MnCl₂ 10 mM; Nonidet P-40 1:5; y UDP-(¹⁴C)GlcNAc (200.000 cpm) con Dol-P 30 nanomoles (en fosfato) o bien Dol-P-P-(¹⁴C)GlcNAc 3.100 cpm o bien Dol-P-P-(¹⁴C)GlcNAc-GlcNAc (1.600 cpm).

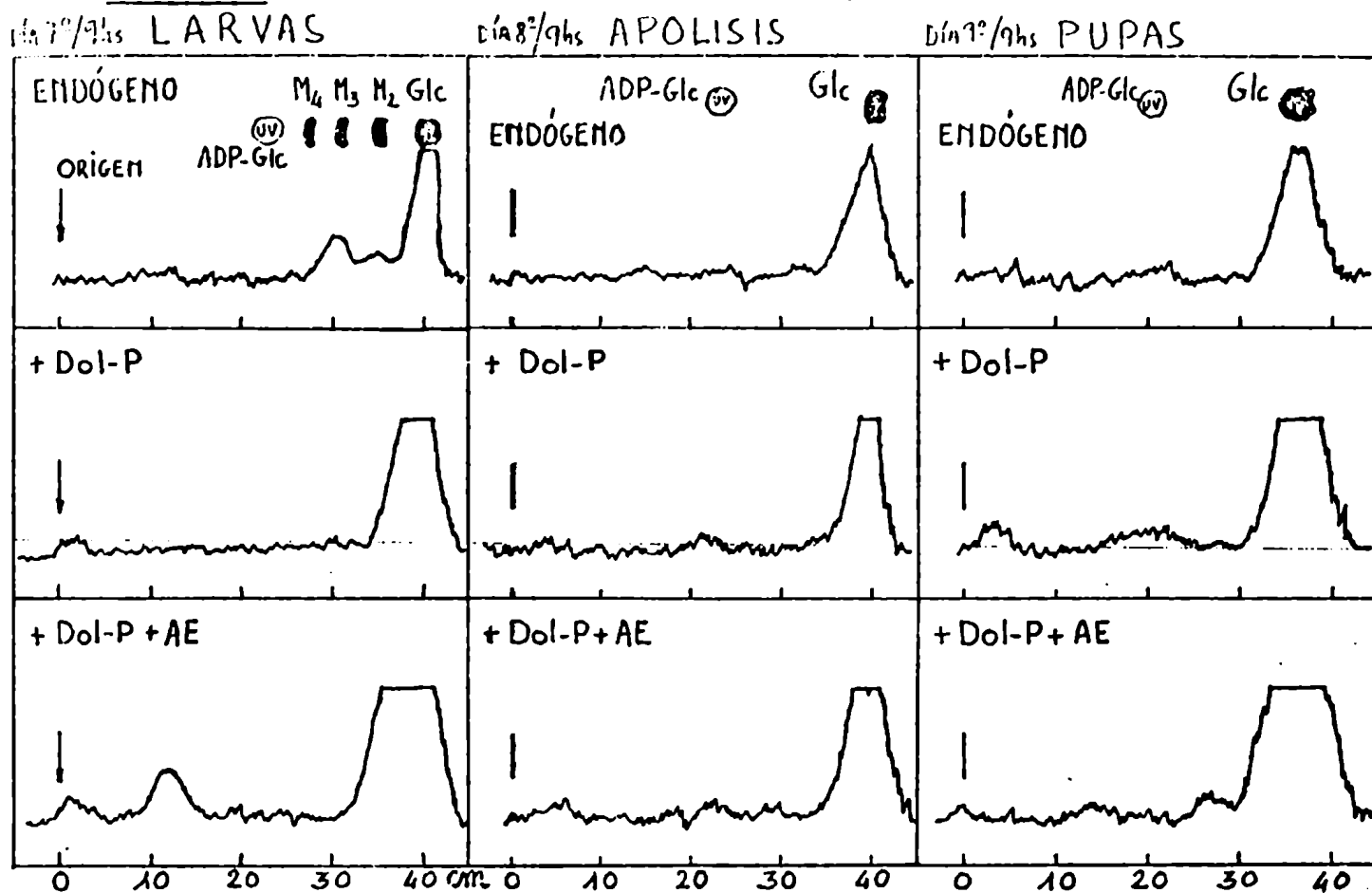
3.9. BIOSÍNTESIS DE DERIVADOS DE DOLICOL EN RELACION AL CICLO DE VIDA

Se realizaron experimentos tendientes a correlacionar aspectos cualitativos y cuantitativos de la biosíntesis de Dol-P-monosacáridos con el ciclo de vida de diferentes artrópodos.

3.9.1. Insectos: Ceratitis

Como se aprecia en la Figura 106 las sintetetas de Dol-P-Glc fueron aparentemente más

Figura 106: Biosíntesis de glucolípidos a lo largo del ciclo de vida



Incubaciones estándar. Cromatografía de los restos hidrosolubles en papel, solv. B

activas en los estados pupal y larval, como era de esperar, pero siguieron siendo detectables en la apolisis.

En todos los casos el añadido de Dol-P estimuló la biosíntesis de Dol-P-Glc.

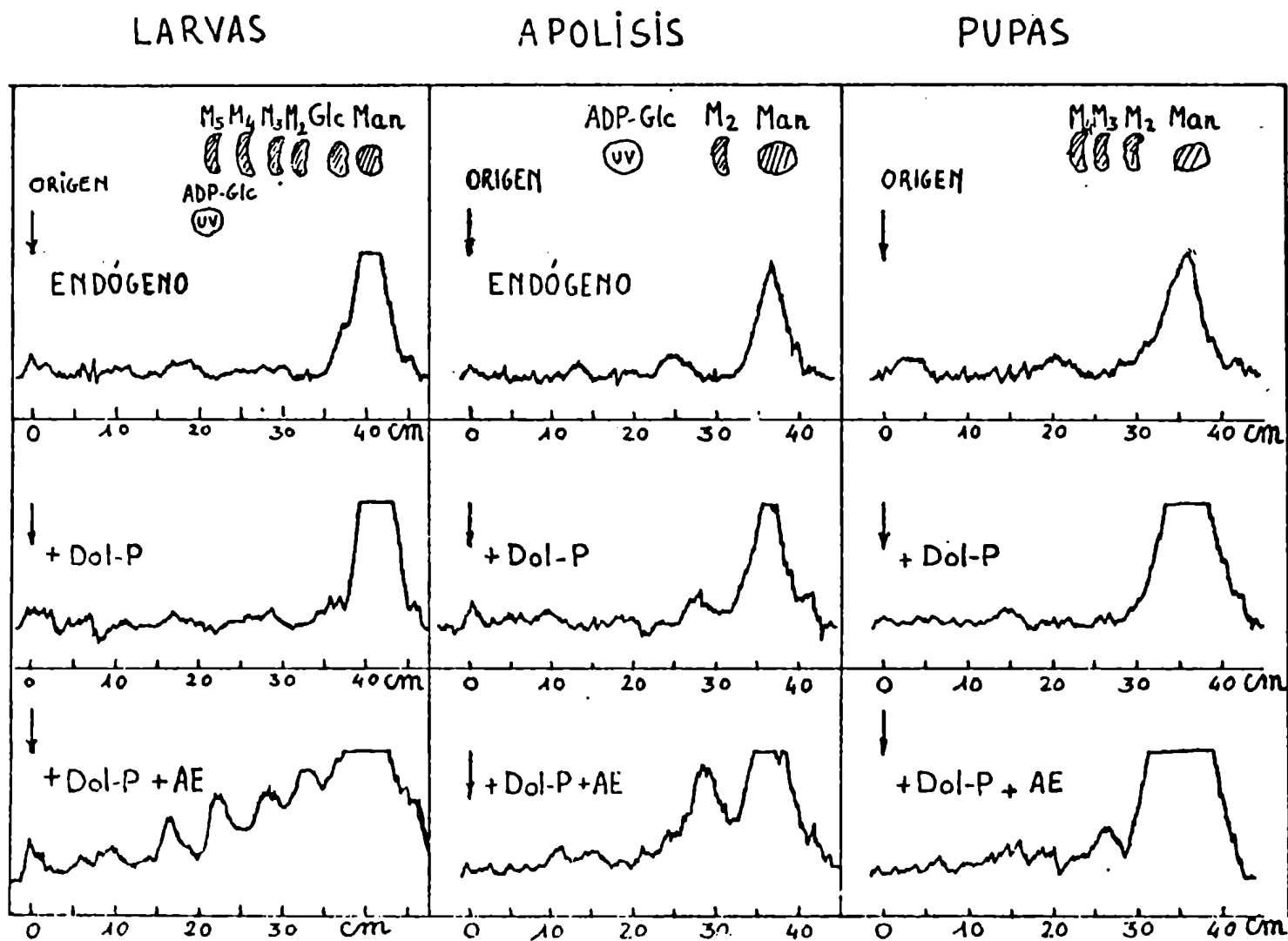
TABLA 66: Incorporación de radioactividad a material insoluble en ácido tricloroacético, en diferentes estadios.

LIPIDO ACEPTOR	Estadio	MATERIAL INSOLUBLE EN TCA (cpm/mg proteína)		
		(¹⁴ C)Manosa	(¹⁴ C)Glc	(¹⁴ C)GlcNAc
#Endógeno	Larvas	3.758	1.710	1.082
	Apolisis	559	550	204
	Pupas	8.750	2.706	1.157
#+Dol-P	Larvas	2.452	2.003	593
	Apolisis	432	461	376
	Pupas	6.906	3.136	1.324
#+ Dol-P + Lípido aceptor	Larvas	1.434	1.792	604
	Apolisis	445	343	451
	Pupas	5.690	2.654	800

Condiciones experimentales estándar.

En el caso de las manosil transferasa de Dol-P-Man, también fueron más activas las de larvas y pupas y todas se estimularon por agregado de Dol-P. Las larvas, como ya se demostró en el correspondiente capítulo (página 165), sintetizaron lípido-oligosacáridos en presencia de aceptor exógeno de insecto (Figura 107). También en apolisis hubo síntesis

Figura 107 : Biosíntesis de manolípidos a lo largo del ciclo de vida.



Los manolípidos obtenidos en incubaciones estándar se hidrolizaron a pH=2.0 y los restos manosilados se cromatografiaron en papel con el solvente B.

de lípido-trisacárido .

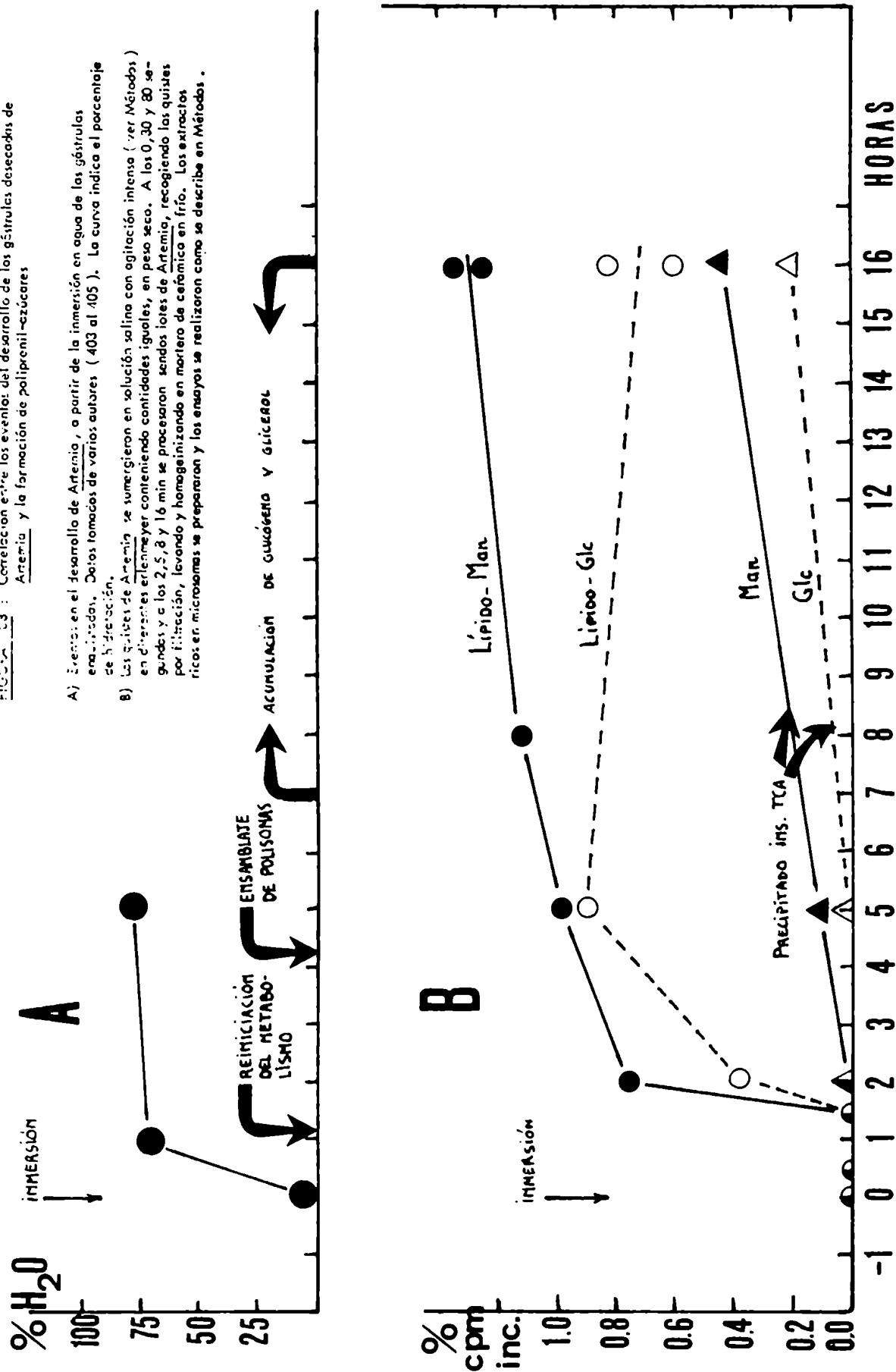
Los lípido-oligosacáridos no se sintetizaron en pupas. Sugiriendo una aparente relación precursor-producto, en este estadio se sintetizaron más sustancias insolubles en TCA y radiomarcadas con manosa que en larvas (ver Tabla 66, página 203). El añadido de lípidos exógenos (Dol-P y lípido aceptor de insecto) inhibió las manosiltransferasas a proteínas (Tabla 66).

Finalmente, la síntesis de quitina (la mayor parte) y otras acetil-glucosaminil-proteínas, fue mayor en pupas, como era de esperar, debido a la construcción de la nueva cutícula. Lo escaso de la biosíntesis obtenida de Dol-P-P-GlcNAc no permitió hacer análisis en ninguna de las series distintas de experimentos.

3.9.2. Crustáceos: Artemia salina

Los eventos de la reiniciación del metabolismo de las gástrulas desecadas de Artemia se encuentran indicados en la Figura 108 . En la misma se aprecia una muy temprana biosíntesis de lípido-Man y de lípido-Glc, seguida poco después por la de proteínas y polisacáridos, todos ellos radiomarcados con los respectivos trazadores. Los estudios indicaron que el lípido-Man es una mezcla de un aparente Dol-P-Man y Lípido -oligosacárido (ver capítulo 3.7.)

FIGURA 103 : Correlación entre los eventos del desarrollo del Artemia y la formación de poliprenil-cúcares



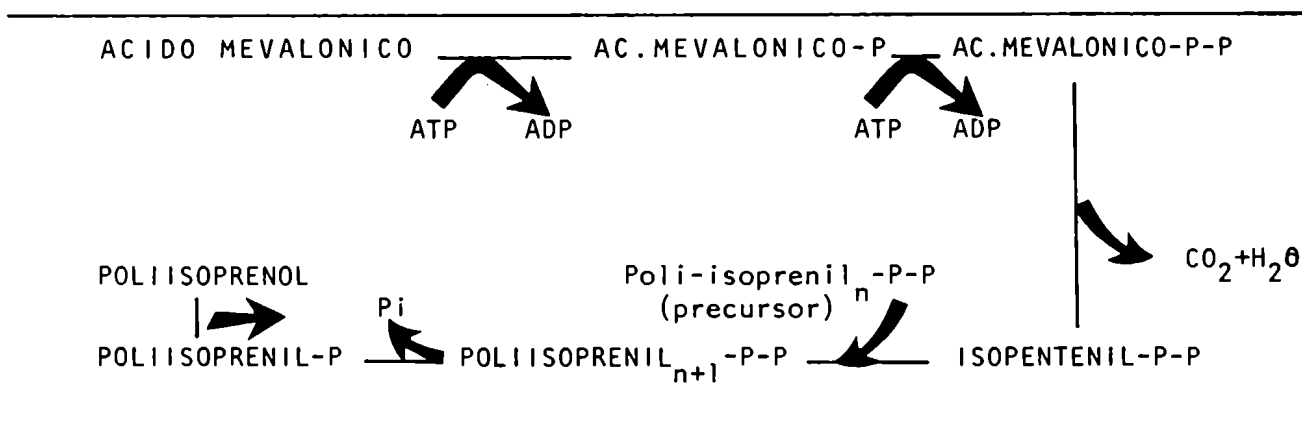
3.10. FOSFORILACION DE DOLICOL POR ENZIMAS DE INSECTO

Como se vio en la Introducción (capítulo 1.2.1.), la formación de poli-isoprenil pirofosfatos bacterianos, con n unidades isoprénicas, implica la condensación de una molécula de di-metil-alil-pirofosfato con $n-1$ moléculas de isopentenil pirofosfato (ver Introducción 1.2.1. y Figuras 3 a 5. Este tipo de reacciones es catalizado por varias enzimas llamadas prenil pirofosfato sintetasas (E.C. 2.5.1.1.).

Por su parte, la formación del isopentenil pirofosfato es consecuencia de la sucesiva fosforilación de mevalonato por la mevalonato quinasa (E.C. 2.7.4.2.). También se origina por isomerización del dimetil-alil-pirofosfato (E.C. 5.3.3.2.) (ver Figura 3 , página 8).

Los poliprenil pirofosfatos serían defosforilados a monofosfatos (14,19) y éstos a alcoholes libres (Figura 109).

Figura 109: Esquema aceptado de la formación de poliisoprenoles y poliisoprenoles fosfato.



El esquema está basado en lo conocido en bacterias (14) y, en principio, se acepta que es válido para los eucariotes (Kornberg, Comunicación personal).

La biosíntesis de dolicoles parece seguir este esquema (19,61,63) con la particularidad de que debería existir una enzima capaz de saturar la unidad α -isoprénica. El dolicol podría, eventualmente, fosforilarse por la acción de una poliprenil quinasa similar a la descrita por Strominger y col. (32) en los procariones. Sin embargo no existe hasta la fecha en la bibliografía ninguna evidencia en ese sentido.

El presente capítulo intenta aportar pruebas de la existencia de una posible quinasa de dolicol en insectos, que sería entonces una novedad para los eucariotes.

3.10.1. Evidencias indirectas

Como se vio en 3.1. la cantidad estimada de dolicol presente en los tejidos de pupas de Ceratitis capitata fue muy superior a la de dolicol fosfato, como sucede en otros eucariotes

Tabla 67 .

TABLA 67: Concentración de Dol y Dol-P en insectos, comparada con otros organismos

Material biológico	Concentración en ug/g tejido		Datos calculados o tomados de
	Dol	Dol-P	
. Levadura	6	0,6	Jung y Tanner (57)
. Cerebro de vaca	15	-	Breckenridge y col. (30)
. Cerebro de rata	0,01	-	idem
. Hígado de cerdo	100	-	Burgos y Morton (31, 51)
. Hígado de cerdo	73	-	Idón de Iannino (comunicación personal)
. Hígado de cerdo	-	1,0	Tábera (187) y comunicación personal
. Hígado de rata	-	0,7	Dallner y col. (56)
. Pupas de <u>Ceratitis capitata</u>	1,4-3,7	0,05-0,30	Esta Tesis*

* Se calculó la concentración de Dol en base al peso seco de aluidos de cromatografía preparativa en capa delgada con respecto al peso de las pupas vivas. Se indican valores extremos hallados. La concentración del Dol-P se estimó mediante ensayo biológico. Comparando con cantidades conocidas de Dol-P de hígado, en términos de fosfato total, se obtuvo el valor máximo (pueden estar considerando otros fosfolípidos). El valor mínimo se calculó en base al deliquil-manosa formado en un ensayo tipo, descontando el formado endógenamente.

En el transcurso de los estudios de formación "in vitro" de Dolicol-P-Manosa (capítulo 3.2.2.) y de Dolicol-P-P-GlcNAc (capítulo 3.3.1.) en los insectos, se observó que, en ciertos casos, el ATP fue capaz de aumentar la cantidad de glicolípido biosintetizado. Esta observación parecía depender del momento del ciclo de vida del insecto (mejores larvas), del tipo de fracción subcelular utilizada (mejor fracción mitocondrial) y de las condiciones de la incubación.

Resulta interesante conocer el origen y/o el mecanismo de recambio del fosfato en el Dol-P.

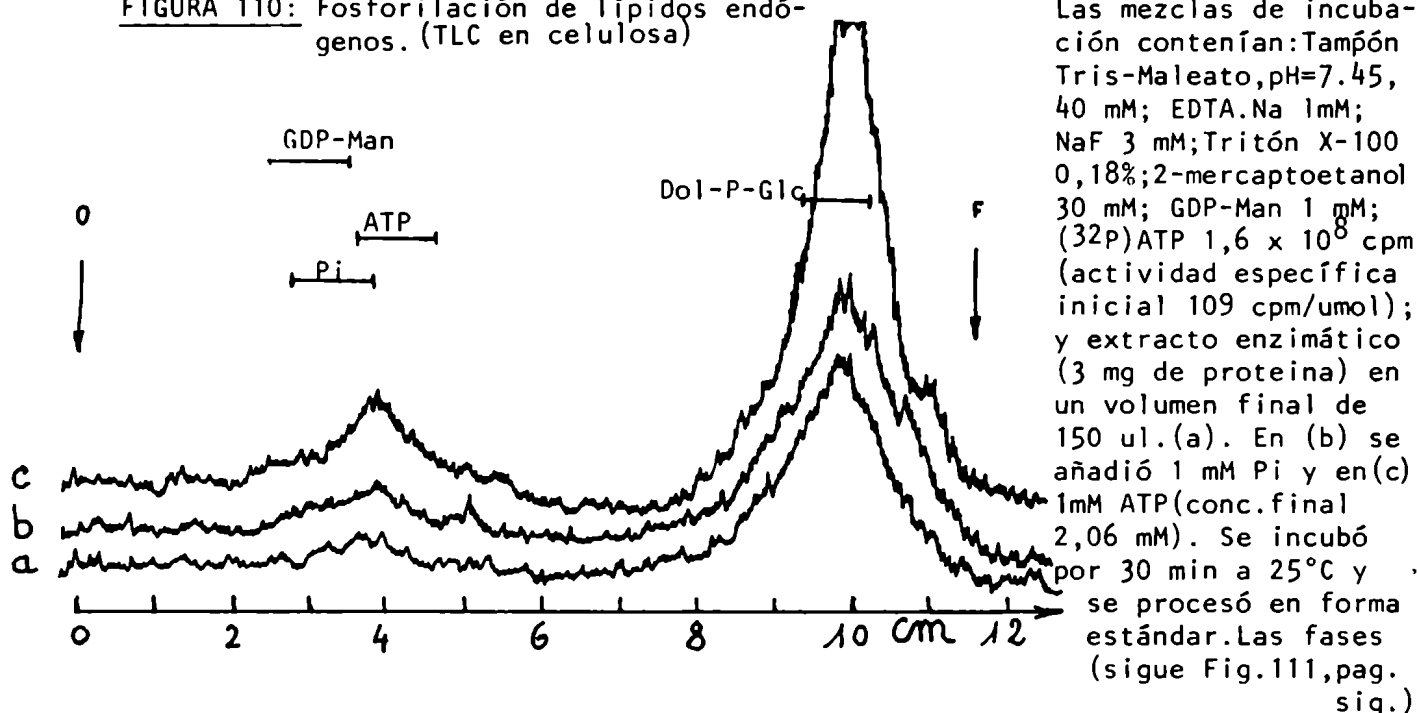
En los experimentos que se describen aquí se demostró que el fosfato en posición del ATP- $[\gamma-^{32}\text{P}]$ fue incorporado por extractos de larvas de insecto a dolicol-fosfato-manosa, dolicol-pirofosfato-oligosacárido y a una sustancia que se comportó como dolicol-fosfato.

3.10.2. Formación de sustancias radiomarcadas con ^{32}P

Los extractos de Ceratitis capitata suplementados con NaF 3 mM (para disminuir la degradación de los sustratos) y con GDP - Man (con objeto de retener el Dol-P como Dol-P-Man), catalizaron la transferencia del ^{32}P del $[\gamma-^{32}\text{P}]$ -ATP a material lipídico.

Las sustancias radiomarcadas se comportaron como fosfolípidos en una columna cromatográfica de ácido silícico y co-cromatografiaron con el Dolicol-P- (^{14}C) Glucosa de insecto en una cromatoplaque de celulosa desarrollada con el solvente A (isobutírico / OHNH_4 5:3) (R_f : 0,87) (Figura 110 a). El agregado de Pi frío no produjo cambios (110 b). La incorporación óptima se obtuvo en presencia de ATP de 2 mM (Figura 110 c).

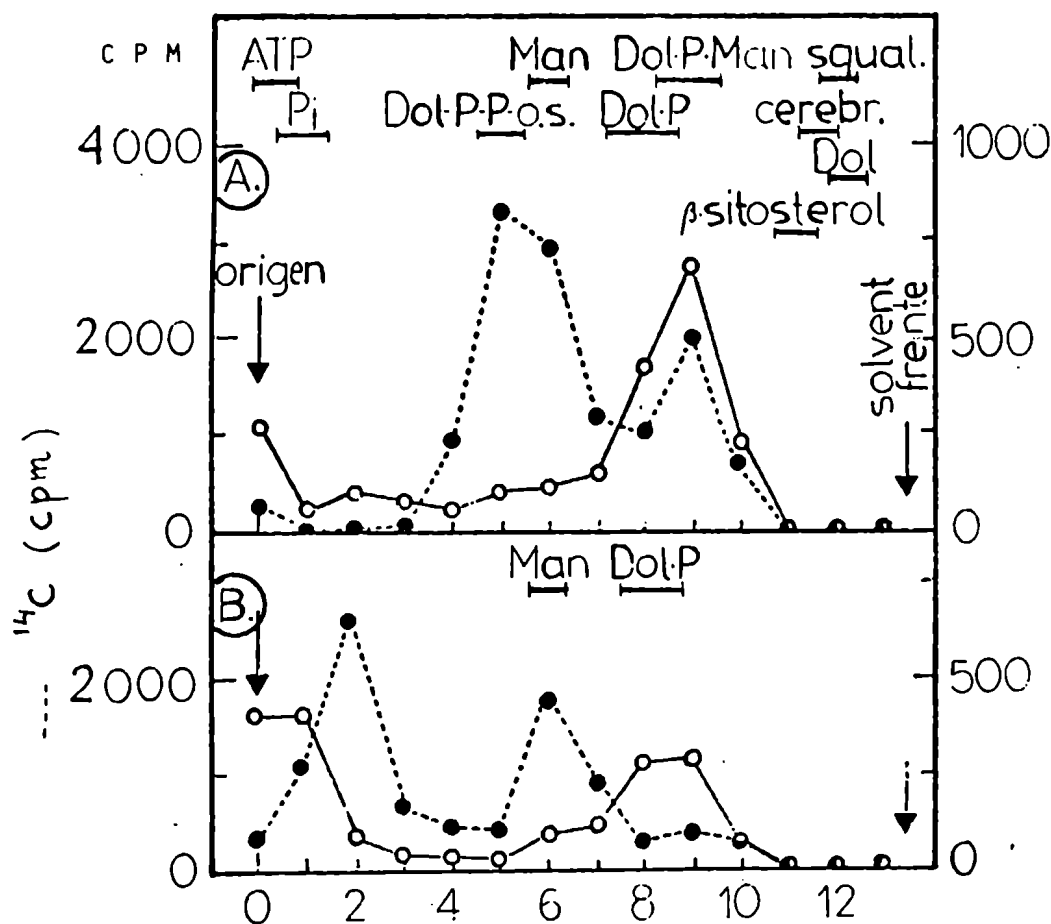
FIGURA 110: Fosforilación de lípidos endógenos. (TLC en celulosa)



La incorporación no se alteró tampoco por la adición de Manosa-1-P. De los datos que preceden se puede deducir que el sustrato para la actividad transferente no es alguno de los productos de degradación del ATP. Se eluyó el material radiomarcado y se lo recromatografió en cromatoplasmas de celulosa con el solvente Q, donde se separó en dos sustancias. Una de ellas co-cromatografió con el Dol-P-Man de insecto (ver capítulo 3.3.2, pág.132) mientras que la otra se movió con un R Dol-P-Man de 0.88. Resultados similares se obtuvieron con cromatografía en capa fina con el mismo solvente: se visualizaron dos sustancias con R Dol-P-Man de 0.80 y 1.0 respectivamente.

Cuando los extractos larvales fueron incubados con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y $\text{GDP}[^{14}\text{C}]\text{Man}$ se formó una sustancia doblemente radiomarcada que se comportó como una doliquilfosfato-hexosa (Figura 111 A) (Rf.: 0.65). Otra sustancia radiomarcada con ^{14}C y que sólo contenía trazas de ^{32}P exhibió la movilidad de un poliprenil-P-P-oligosacárido (ver capítulo 3.4) (Rf.: 0.44) (Figura 111 A).

FIGURA 111: Incorporación de ^{32}P de (^{32}P)ATP a Dol-P-Man



No se detectaron otras sustancias doblemente radiomarcadas

(Ver Fig.110) inferiores se lavaron 10-15 veces con fase superior "teórica" conteniendo 1mM ATP y se cromatografió en TLC con el solvente :Acido isobutírico/1 M NH_4OH : (5/3) (Figura 110).

En ésta Fig.(111) se utilizó la misma incubación que en 110,c pero sustituyendo el GDP-Man por $2,0 \times 10^5$ cpm de $\text{GDP-}(^{14}\text{C})\text{Man}$ (aprox. 10^9 cpm). Los fosfolípidos se cromatografiaron en sílica gel G con el solv. X. Se cortaron bandas y se contó la radioactividad. (A) Sin y (B) con hidrólisis ácida (ver texto).

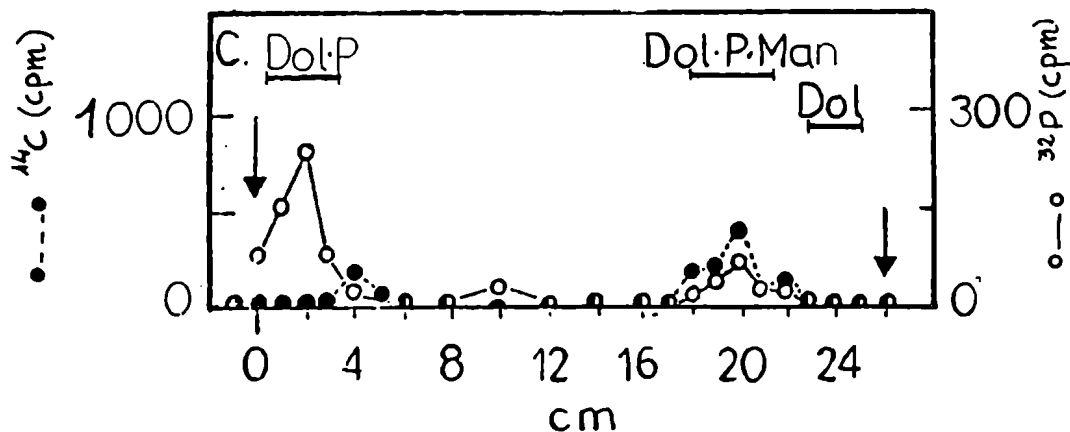
3.10.3. Hidrólisis ácida

Se sometió la sustancia doblemente marcada al tratamiento en ácido débil típico para los poliprenil-azúcares. La mayor parte del ^{14}C se hizo hidrosoluble mientras que la mayor parte del ^{32}P siguió solubilizando en la fase orgánica de una partición de Folch.

La sustancia marcada hidrosoluble se resolvió en otras dos que cromatografiaron respectivamente como manosa y como un oligosacárido (Figura 111, B). El material [^{32}P]-marcado

se comportó como doliquil-fosfato tanto en cromatografía en capa fina (Figura 111, B) como en papel (Figura 112).

FIGURA. 112: Cromatografía en papel de fosfolípido resistente a la hidrólisis ácida suave

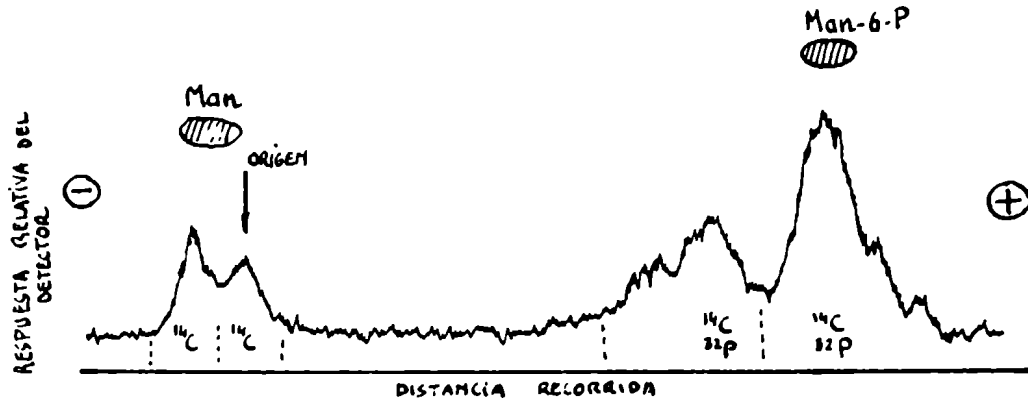


Las bandas 7,8 y 9 del cromatograma (B) mostrado en la figura 111, (pág. anterior) correspondientes al Dol-P, se lavaron con Tolueno (para eliminar el centelleador) y se raspó la sílica que se extrajo con 0.6N HCl en Clorof./met. (2:1). Se cromatografió en papel utilizando el solvente ;2-propanol/agua 4:1.

El estándar de Dol se localizó por revelado con anisaldehído. El Dol-P-Man estaba radiomarcado con ^{14}C . El Dol-P se localizó por dosaje enzimático (Métodos). La ubicación de las sustancias incógnitas se hizo cortando tiritas de 1 cm del cromatograma y analizándolas en centelleador (líquido) con el método de canales diferenciales.

3.10.4. Hidrólisis alcalina

El material doblemente marcado fue sometido a tratamiento alcalino débil (0.1 M KOH en 50 % n-propanol/69° C por 60 min) y parte de la radioactividad pasó a ser soluble en agua. La sustancia hidrosoluble fue sometida a electroforesis de alto voltaje en papel. En el radioelectroforetograma se obtuvieron 2 picos negativamente cargados: uno de ellos doblemente radiomarcado, se comportó como Manosa-1-fosfato mientras que el otro fue más lento y tenía una relación de marca $^{32}\text{P}/^{14}\text{C}$ mucho menor. Su comportamiento parecería el de un oligosacárido - fosfato (Figura 113,). Además se observaron en el electroforetograma dos sustancias marcadas con ^{14}C pero no con ^{32}P : una permaneció en el origen y la otra migró ligeramente hacia el cátodo, tal como lo hizo la manosa estándar (debido a la



electro-endósmosis) (Figura 113). Se eluyó del papel el pico aniónico "rápido" , se lo trató con HCl por 5 min a 98° C y se lo volvió a someter a electroforesis en papel. Como se ve en la Figura 114 volvió a comigrar con la Manosa-1-P . Después de un tratamiento con

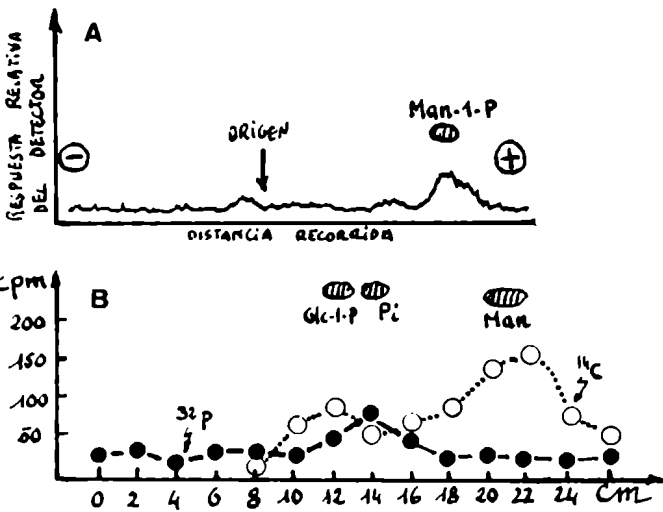


Figura 114::Análisis de la Hexosa-P doblemente radiomarcada.

(A) Después de la hidrólisis ácida se hizo una electroforesis idéntica a la de la Fig.113 (pág.anterior).

(B) Se trató la hexosa-P con fosfatasa alcalina (métodos) y los productos de hidrólisis se cromatografiaron en papel con el solvente E. Se cortaron tiritas del cromatograma y se analizó con centelleo líquido.

fosfatasa alcalina de E. coli , la radiomarca de ¹⁴C pasó a comportarse como manosa mientras que la radiomarca de ³²P pasó a comportarse como fosfato inorgánico .

Dado que un tratamiento alcalino idéntico del Dol-P-Man de insecto liberó manosa - 2 - fosfato (debido a la configuración β de la manosa en el glicolípido) (ver capítulo

3.3.2 y 136) , se asume que la sustancia "rápida" aniónica debe ser $[^{14}\text{C}]\text{-manosa-2-} [^{32}\text{P}]$ proveniente de doliquil- $[^{32}\text{P}] - [^{14}\text{C}] \text{ Man.}$

3.10.5. Adición de dolicol fosfato

Se diseñó un experimento de dilución isotópica consistente en incubar extractos de insecto con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ ATP}$ y $\text{GDP } [^{14}\text{C}] \text{ Man}$ con o sin 50 nanomoles de Dol-P de hígado purificado. La incorporación de ^{32}P al Dol- $[^{32}\text{P}] - [^{14}\text{C}] \text{ Man}$ decreció 18 veces sugiriendo una competencia entre el Dol-P exógeno y el aceptor endógeno radiomarcado (Tabla 68). Analizando en cromatografía de capa fina los productos de las incubaciones

TABLA 68: Efecto del Dol-P en la marcación de Dol-P-Man con ^{32}P

	Proporción $^{32}\text{P} / ^{14}\text{C}$ en	
	Dol-P-Manosa	Dol-P-P-Oligosacáridos
SIN ADICIONES	0,350	0,023
+ Dol-P (50 nanomol)	0.019	0.056

Cálculos en base a 3 experimentos. La concentración de Dol-P se expresa en base a la cantidad de fósforo presente.

conteniendo Dol-P exógeno se observó un pico de radioactividad diferente del que se ve en el control, en ausencia de Dol-P . Se trata de una sustancia radiomarcada con ^{32}P de movilidad intermedia (Rf.: 0.55) entre la del Dol-P-Man (Rf.: 0.60) y la de los

poliprenil-oligosacáridos (Rf.: 0.44). Esa es la posición en que cromatografía el Dol-P (dosado enzimáticamente) por lo que puede asumirse que el Dol- [^{32}P] se acumuló debido a la presencia del Dol-P no marcado.

3.106. Adición de dolicol

El dolicol de hígado añadido a la mezcla de incubación suplementada con ATP estimuló la biosíntesis tanto del Dol-P-Man marcado con ^{14}C como la del Dol-P marcado con ^{32}P (Tabla 69). Esta estimulación dependió de la cantidad de dolicol de insecto endógeno

TABLA 69: Efecto de la adición de Dolicol

(A) Biosíntesis de Dol-P-(^{14}C)Man			(B) Biosíntesis de Dol-(^{32}P)		
ADICIONES	CPM	% estim.	Dol añadido	CPM	% de estim.
Ninguna	4.232	-	<u>EXPERIMENTO I</u>		
+2,3mM ATP	4.964	17,2	Ninguno	907	-
+50 ug Dol	4.413	4,0	+ 15 ug	1.743	92.2
+ 2,3 mM ATP			<u>EXPERIMENTO II</u>		
+ 5 ug Dol	5.185	22,5	Ninguno	1.444	-
+ 2,3 MM ATP			+ 15 ug	2.875	99.1
+ 15 ug Dol	5.642	33,3			
+ 2,3 mM ATP					
+ 50 ug Dol	5.867	38,6			

La misma mezcla de incubación que en la Figura con las siguientes modificaciones: (A) Se omitió el ATP radiomarcado y se hicieron los añadidos indicados. La concentración del Tritón X-100 fué de 0.03% . (B) Se omitió el detergente y se utilizaron $1,6 \times 10^5$ cpm de GDP(^{14}C)Man (aprox. 9 uM) en lugar del GDP-Man. Las muestras se procesaron y cromatografiaron como se indicó anteriormente. La radioactividad se localizó cortando bandas de 0,5 cm. y contando en centelleador líquido.

presente en las membranas Ceratitidis que se ha estimado entre 1.4 y 3.7 μg por gramo de proteína (ver capítulo 3.8.0.). Por ello se precisa para observar el efecto de dolicol que las membranas posean bajos niveles del mismo.

El posible efecto de solubilidad de membrana o de disminución relativa de los detergentes naturales (fosfolípidos) se descartó, ya que en los presentes experimentos el agregado de Tritón X-100 entre 5 y 30 μMolar estimuló sólo ligeramente la formación endógena de poliprenil derivados.

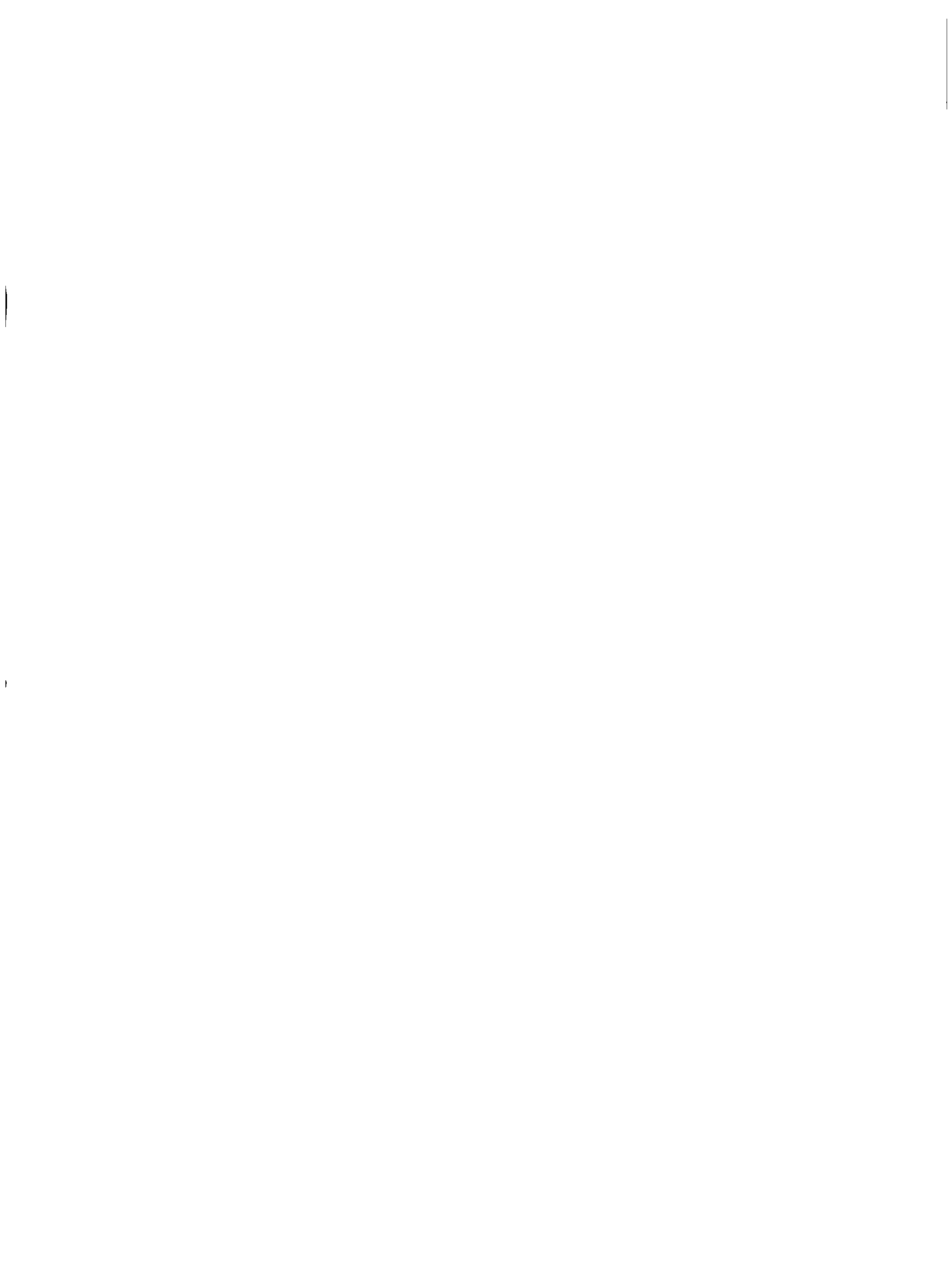
Esto es opuesto a lo previamente descrito para las preparaciones enriquecidas en microsomas y puede ser debido a que éstas tienen habitualmente mayor proporción de fosfolípidos con respecto a los lípidos total . Es decir que las suplementaciones de dolicol, realizadas en presencia de Tritón X-100 estimularon por encima del ligero incremento de incorporación proporcionado por el detergente.

Los resultados indican que gran parte del ^{32}P incorporado apareció en los doliquil derivados. Esto quizás se explique por el bajo nivel de síntesis de glicero-fosfolípidos a los 6 - 8 días del ciclo de vida de Ceratitidis (421) y a la baja tasa de recambio de muchos de estos lípidos en los insectos (422).

Como el dolicol estimuló la incorporación de ^{32}P , la mayor parte - al menos - de los fosfatos deberían ser atribuidos a una poliprenil quinasa similar a la descrita para bacterias por Strominger y col. (32) (ver discusión al respecto en la página 208).

La(s) actividad(es) de quinasa no ha(n) podido purificarse en los tejidos de insecto, aún usando solventes orgánicos, método empleado por Strominger y col. en la purificación

de la poliprenil quinasa procariótica (32).



4. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el transcurso del presente trabajo de Tesis han extendido los conocimientos previos sobre el metabolismo de dolicol a los artrópodos (fundamentalmente a los insectos). Además, en éstos se han realizado hallazgos que probablemente sean extensibles a los demás eucariotes, como la detección por vez primera de una dolicol kinasa. Se aportan también en el presente trabajo, datos que correlacionan estadíos de diferenciación con biosíntesis de derivados de dolicol.

Walton y Pennock, en 1972, habían descrito la biosíntesis en invertebrados de poli-prenoles de cadena larga, a partir de (^{14}C) - mevalonato . En particular, el cangrejo ermitaño, Eupagurus bernhardus, y el cangrejo de playa, Carcinus maenas, resultaron capaces de sintetizar "in vivo" un aparente dolicol (25). Este trabajo, al menos en lo que a artrópodos respecta, no tuvo confirmación hasta que, al comienzo de esta Tesis, se detectaron dolicol y doliquil fosfato en extractos de la mosca mediterránea, Ceratitis capitata, y otros insectos. El dolicol de insecto se identificó en base a su comportamiento cromatográfico en diferentes sistemas, a su detección colorimétrica con reveladores relativamente específicos, a su fluorescencia bajo luz ultravioleta y - fundamentalmente -, cuando está fosforilado, a su capacidad de activar doliquil monosacárido transferasas de hígado. La sustancia radiomarcada de crustáceos solamente se identificaba por su movilidad cromatográfica. Poco después, confirmando nuestros resultados, Beedle y col., encontraron que los extractos de la mosca Calliphora erythrocephala sintetizaban a partir de (^{14}C)-mevalonato una sustancia que co-cromatografiaba con dolicol (28). Los datos de estos autores refe-

rentes al tamaño del dolicol de insecto coinciden con los nuestros que estimaban al componente principal como de 18 isoprenos (ver página 145).

Se acepta generalmente que la mayor parte de los insectos (406 al 408) y de los restantes artrópodos (409, 410) así como muchos invertebrados, son incapaces de sintetizar colesterol y otros esteroides. Una dieta sin estas sustancias es letal. El ácido mevalónico, el escualeno o el lanosterol son incapaces de reemplazar los esteroides (406) . Clayton (407) y otros autores han sugerido que los insectos requieren colesterol y otros esteroides como precursores de ecdisonas (hormonas de la muda) y como componentes de membranas. Por otra parte, todos los invertebrados investigados hasta ahora, salvo una esponja, son capaces de sintetizar dolicol y también ubiquinona (25, esta Tesis).

Los experimentos en moscas con ácido mevalónico marcado muestran que este precursor puede incorporarse al dolicol (28) . En cambio ese mismo precursor no se incorpora al colesterol. Esta última deficiencia no es letal porque los insectos reciben colesterol en su dieta. Seguramente también reciben dolicol . ¿ Porqué en un caso la cadena metabólica se ha hecho deficiente y no en el otro ? Una posibilidad es que el dolicol de la dieta no es absorbido (o - aunque lo sea - es insuficiente) y esto habría acarreado, a lo largo de la evolución, la desaparición de los organismos deficientes.

Es de destacar que en presencia del antibiótico tunicamicina, que inhibe la formación de Dol-P-P-GlcNAc, además de detenerse la biosíntesis de glicoproteínas, se interrumpe el desarrollo. Por ejemplo en el hongo Neurospora crassa las conidias desarrollan en un micelio aberrante, muy fino, a su vez incapaz de conidiar normalmente (Torres y col. , datos no publicados) .

En el presente trabajo se ha detectado por primera vez doliquil fosfato en los tejidos de

insecto. Behrens y Leloir lo habían descubierto en hígado de mamífero (6). Después, Jung y Tanner lo detectaron en levaduras (57) y, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas, en plantas (58). Las cantidades calculadas de Dol-P presente en tejidos de insecto (capítulo 3.1. y Tabla 67) son sólo estimativas. El dosaje enzimático sólo proporcionó una idea aproximada, pues se desconocen las condiciones óptimas para muchas incubaciones y el Km de las glicosil transferasas. Dosajes más exactos podrían haberse obtenido realizando curvas de concentración del Dol-P de insecto y del nucleótido-azúcar (Dankert, comunicación personal).

En general se acepta que el Dol-P se biosintetiza - a semejanza del undecaprenil-P bacteriano - por defosforilación del Dol-P-P (19) (ver capítulo 3.10). En esta Tesis se describe la obtención de Dol-(³²P)-Man y Dol-(³²P) a partir de ATP - (γ -³²P). Como ya se ha indicado, Beedle y col. demostraron que los huevos de Calliphora sintetizan [¹⁴C]dolicol incubándolos con DL- 2-[¹⁴C] ácido mevalónico lactona. Luego sería necesario descartar que el ³²P que aparece en Dol-P-Man no provenga de la mevalonato kinasa (Figura 108). No se han detectado ácido mevalónico fosfato ni isopentenil pirofosfato en nuestros extractos. Sin embargo no se puede descartar que una parte del ³²P provenga indirectamente del [γ -³²P]-ATP a través de la vía indirecta de la fosforilación de mevalónico.

Por otra parte no se puede excluir que el verdadero dador de fosfatos sea otro nucleósido trifosfato, previamente fosforilado por ATP .

Hasta ahora sólo se conocía la poliprenil quinasa de procariotes, descrita por Strominger y Col. (32). Teniendo en cuenta que la cantidad de Dol-P presente en todos los tejidos estudiados por diferentes autores (ver Tabla 67 , página 208) es menor que la

cantidad de dolicol, cabe suponer que exista una poliprenil quinasa similar en todos los eucariotes. Esta enzima tendría como función aumentar la disponibilidad de Dol-P por una vía más rápida que la síntesis a partir de mevalonato. (En los ensayos "in vitro", la cantidad de Dol-P endógeno/es aparentemente limitante de la actividad de las poliprenil-glicosil transferasa). Por tanto es posible que la poliprenil quinasa eucariótica sea una enzima clave, sujeta a regulación.

Los resultados obtenidos sobre formación de doliquil monosacáridos en los artrópodos refuerzan la idea de que se trata de un proceso común a todos los eucariotes.

La doliquil-fosfato-manosil-transferasa de insectos ha sido detectada en varios estadios del ciclo de vida (larva, larva en apolisis, pupa, pupa madura y adulto). En el crustáceo Artemia sp se detectó también síntesis de Dol-P-Man desde poco después de la completa hidratación de las gástrulas enquistadas (Figura 107). En todos los casos pudo observarse formación de Dol-P-Man a partir de Dol-P endógeno.

La doliquil-fosfato-manosil-transferasa presente en los extractos microsomales de insecto, preparados en presencia de Mg^{2+} y de anti-oxidantes, permaneció activa a $-70^{\circ}C$ durante un año, manteniendo al término el 15 % de su actividad. En cambio, la acetilglucosaminil transferasa de los mismos extractos se inactivó en menos de una semana. Parecería que la manosil transferasa es menos sensible a la acción de las proteasas bien por su estructura o bien por su ubicación en las membranas.

En insectos se formó Dol-P-Glc "in vitro" en todos los estadios del ciclo de vida pero

- frecuentemente - la biosíntesis a partir del Dol-P endógeno fue indetectable, debiéndose añadir a la incubación Dol-P exógeno. En experimentos con tejidos de Triatoma en cultivo se detectó, también (ver página 114) biosíntesis de Dol-P-Glc, a partir de $[^{14}\text{C}] \text{Glc}$.

La actividad específica aparente de la glucosil transferasa comparada con la de la manosil transferasa fue, en insectos, mucho menor. Establecer comparación entre actividades aparentes puede carecer de sentido dado que no se conocen las concentraciones endógenas de sustratos, los Km de las enzimas, las condiciones óptimas, etc. En insectos se conocen numerosas manoproteínas (ver Introducción) y en los mamíferos la parte interna de las glicoproteínas sintetizadas vía lípidos intermediarios es rica en manosas. Cabe suponer, entonces, que la aparentemente alta actividad de las doliquil-manosil-transferasas sea un reflejo de la multiplicidad de funciones del Dol-P-Man como intermediario en la manosilación de diferentes proteínas.

Se detectó la lípido acetilglucosaminil transferasa de insectos - en ensayos "in vitro" - solamente en ciertos momentos del ciclo de vida. En Triatoma se pudo medir transferencia de GlcNAc a lípido sólo inmediatamente después de la emergencia del imago. En Ceratitis las preparaciones más activas fueron las realizadas con larvas de 6 días (antes de entrar en inmovilidad) y los adultos farados (pupas) en el momento de comenzar la pigmentación de las ommatidas. Esta dificultad en la detección de la GlcNAc-transferasa (habitual también en otros sistemas) puede responder a numerosas causas. La baja radioactividad específica del $\text{UDP}-[^{14}\text{C}]\text{GlcNAc}$ probablemente se ve agravada por el alto contenido de UDP-Acetilhexosaminas (hasta $4 \mu\text{moles/g}$) en tejidos de insectos (411). Además, como para las otras transferasas se desconoce el Km y las condiciones óptimas de incubación estas varían de acuerdo al contenido de lípidos totales, alimentación previa, etc.

Por último, como ya se indicó, la doliquil-GlcNAc transferasa es muy sensible a las condiciones de preparación y almacenamiento. La preparación del homogenato debe ser lo más ^{rápida} posible con preferencia conviene usar N₂ líquido para congelar los insectos. Se requiere la presencia de un antioxidante de sacarosa y magnesio. En experimentos "in vivo" se obtuvieron también pequeñas incorporaciones de radioactividad a un aparente poliprenil-GlcNAc. Tanto en Triatoma, como en Periplaneta, sólo se lo detectó inmediatamente después de la muda.

En los experimentos "in vitro", para obtener cantidades medibles de Dol-P-P-GlcNAc se necesitó suplementar con Dol-P exógeno. Es interesante destacar que una cantidad dada de Dol-P de hígado agregado estimuló en mayor medida la biosíntesis de Dol-P-Man o de Dol-P-Glc que la de Dol-P-P-GlcNAc, con respecto a como la hizo el Dol-P de insecto (Ver Figuras 44 , 53 y 67 , páginas 44 , 134 y 150). Es difícil interpretar este hecho experimental, pero parecería haber una mayor necesidad de especificidad en la biosíntesis del Dol-P-P-GlcNAc. Esta especificidad podría estar dada por una utilización preferencial, por parte de la enzima, de dolicol de un largo de cadena menor. Fenómenos de este tipo han sido sugeridos por Pennock (290). En cuanto a la posibilidad de que el aceptor de GlcNAc en insectos no sea dolicol (posibilidad siempre latente porque no existen identificaciones a nivel de espectro de masa) existe un gran número de isoprenoides de cadena corta en los tejidos, que se descartan por sus propiedades cromatográficas. Las vitaminas con cadenas isoprenoides(A, E, K, D) podrían quizás actuar como aceptores del resto GlcNAc (u otros azúcares) pero el comportamiento cromatográfico del glicolípido resultante sería diferente al exhibido por el Dol-P-P-GlcNAc. La transferencia de GlcNAc reviste en los artrópodos una importancia particular. Además de las acetilglucosaminas presen-

tes en las glicoproteínas, alrededor del 30 % del peso de la cutícula está constituido por quitina (fundamentalmente poli-N-acetilglucosamina). En el capítulo 1.4.2. se discutió la posible composición de la quitina y su unión a glicoproteína (ver Figura 15, página 43). Hackman (315) estima probable que exista, además de la unión a proteína a través de residuos Aspartilo, otras uniones a histidilos. Lipke y col. (310, 313) concluyen también que la quitina está unida a aminoácidos no aromáticos por enlaces covalentes.

Es de hacer notar que se detectó por primera vez la Doliquil-GlcNAc transferasa de insectos en experimentos "in vitro" diseñados para obtener síntesis de quitina (164, 180).

En la incubaciones de Dol-P-P-GlcNAc con enzimas de insecto se ha obtenido transferencia del GlcNAc a una proteína con el resto oligosacarídico β -eliminable. Esto hace suponer que se trata de una glicoproteína con un enlace del tipo O-glicosídico (ver Figura 12, página 35), que no tendría que ver con la quitina (425).

Por otra parte, varios autores han estudiado en hongos la posible participación de lípidos intermediarios en la síntesis de quitina, sin obtener ningún dato concreto (423, 424). Sólo McMurrough y Bartnicki-García observaron un aumento en la biosíntesis de quitina en Mucor, suplementando el medio de cultivo con extractos lipídicos del mismo hongo (358). En cualquier caso, la "quitina" de hongos - que es el residuo insoluble en álcali caliente - está relacionada con otros componentes de la pared celular de manera totalmente distinta a como se estructura la poli GlcNAc en la cutícula de insectos (308).

En este trabajo de Tesis, se ha detectado la incorporación de $[^{14}\text{C}]$ GalNAc a glicolípidos, a partir del derivado de UDP. Analizados, los glicolípidos formados se comportaron como doliquil-azúcares y liberaron por hidrólisis ácida suave $[^{14}\text{C}]$ GalNAc y $[^{14}\text{C}]$ GlcNAc. Aparentemente, se trata de la primera vez que se ha detectado un

aparente poliprenil-GalNAc. La formación de este glicolípido se obtuvo en diferentes experimentos, con diferentes preparaciones enzimáticas. El hecho de que se obtenga también la biosíntesis del doliquil-P-P-GlcNAc implica que durante la incubación actuó una epimerasa bien a nivel de nucleótidos azúcar (391), o bien a nivel de lípidos. Esta cuestión y el eventual papel que cumpla la presunta lípido-GalNAc transferasa requiere mayores estudios. Se puede pensar que la enzima biosintetizante del Doliquil-GalNAc sea la misma GlcNAc-transferasa que posea inespecificidad con respecto a la hexosamina. Sin embargo se debe tener presente que se acepta que el UDP-GalNAc es el nucleótido azúcar más abundante en tejidos de insecto (411) sin que se sepa a dónde son transferidos los restos GalNAc .

En preparaciones realizadas con larvas de Ceratitis de 6 días (justo antes de que entren en apolisis) se logró obtener un aparente lípido-diacetilquitobiosa. Este lipo-oligosacárido se logró elongar con manosas a partir de GDP-Man.

La naturaleza de los productos obtenidos se discute más adelante.

Sería interesante, sin embargo, obtener cantidades suficientes de lípido-diacetilquitobiosa de insecto para estudiar la posibilidad de que el disacárido sea transferido directamente a proteína, como se ha comunicado sucede en hongos (158). Datos previos (ver Tabla 65 , página 201) indicarían una posible formación de la misma glicoproteína β -eliminable que se formó a partir del lípido-GlcNAc.

Los experimentos expuestos en el capítulo 3.4. demuestran la formación " in vitro " en insectos de poliprenil-oligosacáridos conteniendo manosa. Estos parecen ser sintetizados a partir del lípido difosfato diacetilquitobiosa. Las evidencias surgen del análisis del resto sacarídico del lípido-trisacárido, de los experimentos de competencia (página 179) y elongación (página 184) y del comportamiento de los lipo-oligosacáridos sometidos a diferentes ensayos. El manosilo para la formación del lípido-trisacárido proviene del GDP-Man. Se descartó la posibilidad de que los productos de degradación de este nucleótido-azúcar o el Dol-P-Man fueran los dadores. Los datos para los insectos coinciden con lo descrito por Levy y col. (201): los microsomas de oviducto de gallina transfieren la Man del GDP-Man al Dol-P-P-diacetilquitobiosa agregado exógenamente. Estos datos del grupo de Leloir han sido confirmados por otros autores, en diferentes sistemas (43)

Los lipo-oligosacáridos de insecto radiomarcados en manosa y de tamaño aparente mayor que el lípido-trisacárido, parecen formarse por sucesivas adiciones de manosas a este último. Los experimentos de incorporación de radiomarca (página 174 y siguientes) y el análisis de los restos oligosacarídicos manosilados indicarían también que los lipo-oligosacáridos de insecto forman parte de una " serie " cuya " cabeza " sería el lípido-trisacárido al cual se ensamblarían, secuencialmente, las manosas (Figura 86, página 172). Y esto parece confirmarse por el hecho que los lipo-oligosacáridos radiomarcados con (^{14}C) GlcNAc, obtenidos por elongación del lípido-P-P-(GlcNAc)₂ mediante la adición de GDP-Man en la incubación, son indistinguibles de los radiomarcados en la manosa.

En nuestro sistema, se obtuvo una relativamente mayor síntesis endógena de lípido-trisacárido y lípido-" tetrasacárido " que en otros sistemas eucarióticos. En hígado (114), aorta (128) y plantas (102) es mayor la proporción de lípido-oligosacáridos

de tamaño aparente mayor. Esto puede ser atribuido a la presencia, en insectos, de más aceptores endógenos de menor tamaño. A este respecto, resulta interesante el hecho de que la adición exógena de extractos lipídicos de hígado a la mezcla de incubación con enzimas de insecto, estimuló la síntesis en forma diferente a como lo hicieron los extractos de insecto (Figura 80, página 165): Las enzimas de insecto sintetizaron un espectro de lipo-oligosacáridos típico de las incubaciones con enzimas de hígado. Esto indica que los aceptores presentes en la incubación fueron determinantes; confirmando, de paso, la aparente inespecificidad - destacada por otros autores (43,45,46) - de las poliprenil transferasas.

Por incubación de Dol-P-Man o de lípido-trisacárido con enzimas de insecto se obtuvo la formación de un lípido-oligosacárido cuyo resto sacarídico se comportó como un malto-oligosacárido de 8 - 9 unidades. Este glicolípido presenta características similares al obtenido por Brett y Leloir (62) en plantas, por elongación de un lípido-" pentasacárido." Oliver y Hemming (205) describieron también una sustancia similar cuyo resto azúcar se comportó como un malto-oligosacárido de 8 a 10 unidades. Desconocemos hasta el momento si el lipo-oligosacárido de mosca que se comenta en este capítulo y que se obtuvo " in vitro " , está relacionado con la sustancia de tamaño aparente similar obtenida en cultivo de epidermis de " vinchuca " (sustancia IV, ver página 117). En cualquier caso, tanto los datos sobre formación de sustancias " in vitro " como los obtenidos en condiciones más fisiológicas, indican que existen numerosas reacciones de transferencia de azúcares entre lípidos intermediarios y desde éstos a las proteínas, muchas de las cuales no conocemos todavía. Parece existir una compleja regulación de esas reacciones ya que hemos visto (capítulo 3.9., página 202) que la actividad aparente de las glicosiltransferasas varió con el momento del ciclo de vida. A este respecto, es de destacar que en *Artemia* se detectó

una muy temprana actividad de poliprenil fosfato glicosil transferasas con respecto al comienzo de la activación del metabolismo de las gastrulas desecadas. Durante ese proceso, y hasta pasadas 16 hs, no existe crecimiento ni duplicación celular pero sí una gran diferenciación; ello sugeriría que los poliprenil-azúcares juegan un papel primordial en este proceso de transformación celular.

El lípido-oligosacárido-glucosa de insecto obtenido " in vitro " presentó todas las características del aceptor glucosilado de hígado descrito originalmente por el grupo de Leloir (143) (ver Figura 7, página 23). La sustancia de insecto presentó la solubilidad característica del EA-Glc: es insoluble en mezclas de cloroformo/metanol y en agua y totalmente soluble en el solvente de Leloir (cloroformo/metanol/ agua 10:10:3). Si se lo lleva a seco con N_2 y se lo resuspende en 1-propanol/agua 65:35, se lo puede precipitar selectivamente duplicando la proporción de propanol. Este comportamiento es típico de la sustancia de hígado (145,146). Finalmente, ambas sustancias se comportaron igual en presencia de concanavalina A (página 191). El tamaño aparente del principal resto sacarídico de insecto parece algo menor al de hígado (Figura 102, página 94). En levadura, Parodi demostró que hay dispersión de tamaños y aisló, además de una especie de tamaño similar al oligosacárido de hígado, otra de menor tamaño (139,140).

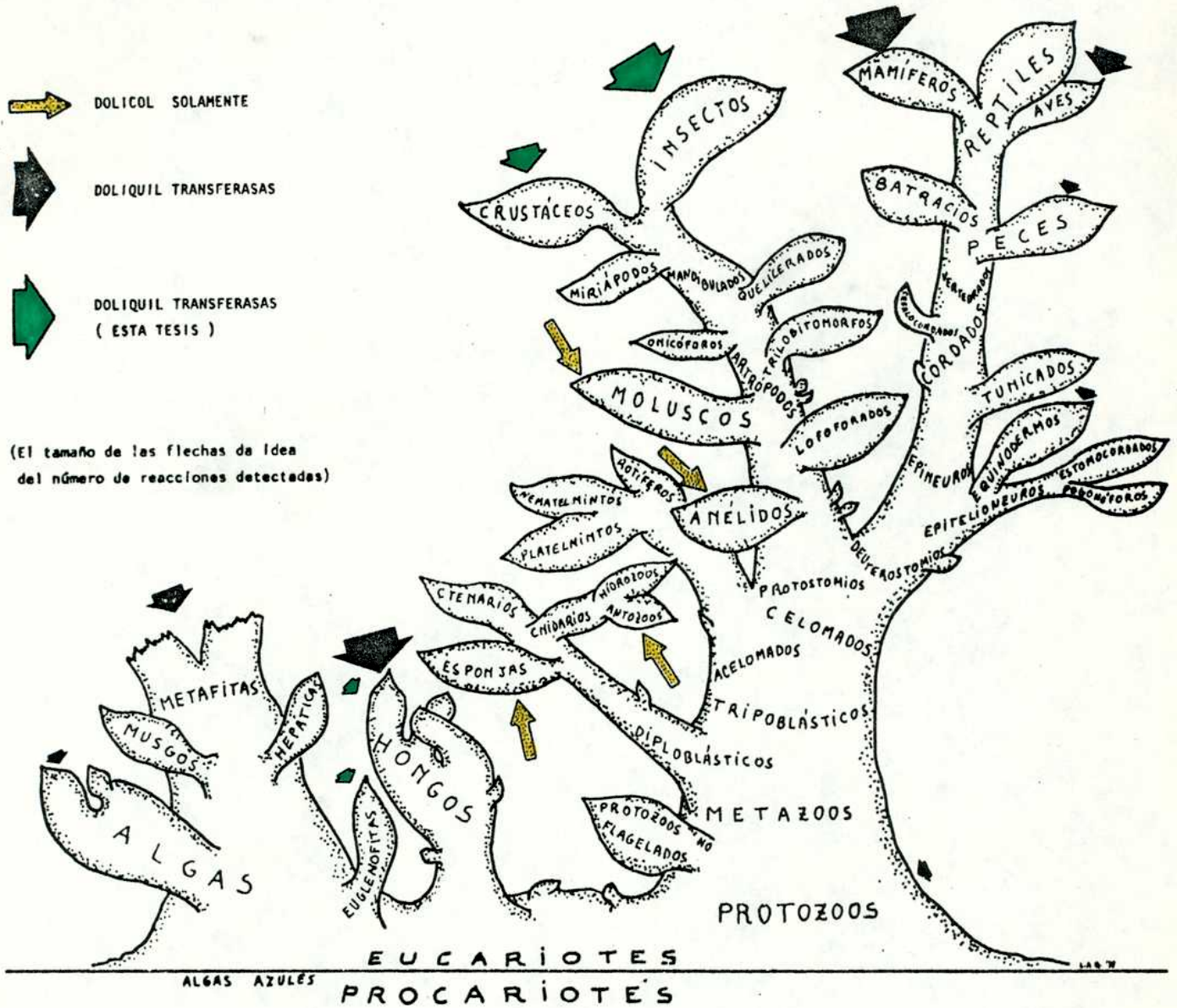
Es llamativo el hecho de haberse encontrado formación del lípido-oligosacárido conteniendo glucosa en todos los sistemas eucarióticos debidamente estudiados (43,45). Esta sustancia parece ser el último intermediario en la glicosilación de proteínas. En éstas, habitualmente, no se encuentran glucosas (comparar Figura 7, página 26, con la Figura 11, página 34). Esto ha hecho pensar que las glucosas jueguen un papel clave en la regulación de la transferencia del glicolípido a la proteína, siendo eliminadas posteriormente (195,427).

Significativamente, Ugalde y col., han encontrado en hígado una glucosilasa que actúa específicamente sobre el EA-Glc y sobre el oligosacárido unido a proteína (321). También otros autores han detectado enzimas similares (320,426).

En incubaciones de homogenatos de insecto se obtuvo la glucosilación de proteínas endógenas a partir del EA-Glc (de hígado) agregado exógenamente. Este tipo de ensayo " in vitro " puede en algunos casos carecer de significado fisiológico, debido a la presencia de detergentes que distorsionan las estructuras de las membranas. De todas maneras, el hecho de que, a su vez, las enzimas de hígado reconocen los lipo-oligosacáridos de insecto, transfiriendo el resto azúcar a proteínas endógenas, abona la idea de que, en los artrópodos, la formación de poliprenil-oligosacáridos forma parte de un mecanismo de glicosilación de proteínas común a todos los eucariotes. Este razonamiento se impone cuando se confecciona un diagrama esquematizando la evolución de los eucariotes (Figura 115) (ver página siguiente) .

Los artrópodos presentan similitudes notorias, en lo tocante al metabolismo de los poliprenil-azúcares, con aves y mamíferos. Es decir, que en ramas evolutivamente tan diferentes como los protostomiados y los deuterostomiados, parece haberse mantenido idéntico el mecanismo de síntesis de glicoproteínas. Como quiera que también hay similitud con grupos filogenéticamente muy lejanos como hongos y plantas, todo parece indicar que dicho mecanismo fué tempranamente adquirido en la evolución y sería característico de toda célula eucariótica actual. Hipotéticos mecanismos alternativos y/o modificaciones en el ciclo de los doliquil-derivados deberían, entonces, haber sido eliminados a lo largo de los procesos evolutivos. Una excepción podría ser la glicosilación del retinol-P, si éste tuviera participación en la glicosilación de proteínas. (429).

FIGURA 115 : Esquema de las relaciones filogenéticas entre grupos de eucariotes



Estimamos que los estudios presentados aquí apuntalan la idea de que el papel de los doliquil intermediarios en esos procesos se estableció tempranamente en la evolución de los eucariotes. Nuestros datos en Euglena y los estudios de Keenan y col. (55,133) en Tetrahymena son, a ese respecto, sumamente sugestivos.

Cuando aumente el número de organismos estudiados se podrá saber si, realmente, en todas las células nucleadas el dolicol es el principal transportador de azúcares. De ser así se reforzaría la idea de un origen monofilético para todos los eucariotes. Por tanto, es de sumo interés investigar grupos de protozoarios y algas eucarióticas primitivas con objeto de constatar si todos ellos sintetizan dolicol y doliquil derivados. También resulta necesario conocer si las cianofíceas (algas azules) poseen lípidos intermediarios del tipo bacteriano o del tipo eucariótico. Por otra parte, no se puede descartar que en algún grupo eucariote (especialmente en talófitas) exista formación de sustancias del tipo poliprenol -azúcar- péptido, como persistencia de características del hipotético ancestro procariótico.

Llama la atención el hecho de que, químicamente no existen grandes diferencias entre los lípidos intermediarios bacterianos y los eucarióticos: los primeros son de cadena corta (10 u 11 isoprenos), e insaturados en el isopreno α , mientras que los segundos son largos (entre 17 y 22 isoprenos) y saturados. Aunque en plantas existen, además, en gran cantidad, poliprenoles cortas (6 a 13 isoprenos), como Pont Lezica y col. (58) han sugerido, éstos no estarían involucrados en el transporte de azúcares. Permanece abierto el interrogante de Romero (197) sobre cuál sería su función.

En esta Tesis, comprobando lo encontrado anteriormente en otros sistemas (58, 197) se vió que las enzimas de insecto pueden utilizar undecaprenil monofosfato como sustrato en lugar de Dol-P. El grupo de Dankert ha observado - a su vez - que algunas enzimas bacterianas son capaces de utilizar el Dol-P (58, 197 y comunicaciones personales). Estos y otros autores (14, 42, 43) han destacado la aparente inespecificidad de las poliprenil-fosfato transferasas eucarióticas; sin embargo, y como se indicó más arriba, el principal aceptor de glicosilos en todos los eucariotes estudiados parece ser el

dolicol fosfato.

Es decir que, a pesar de su similitud química y de una notoria inespecificidad de los sistemas enzimáticos, es un hecho que los poliprenoles cortos y alílicos están asociados a un tipo de proceso (formación de peptidoglucano bacteriano) y que los largos y saturados están involucrados en otros (glicosilación de proteínas) . Nuevamente bajo una óptica de evolución bioquímica se podría postular que se han producido tres eventos para originar los intermediarios eucarióticos : la selección de una cadena larga, la saturación del isopreno terminal y la especialización para la glicosilación de proteínas. Lo que nos lleva otra vez a una discusión filogenética como la realizada más arriba.

5. CONCLUSIONES

- 1 - Se detectó, por primera vez en invertebrados pluricelulares, la formación " in vivo " e " in vitro " de derivados de poliprenoles.
- 2 - El aceptor de glicosilos en los insectos y crustáceos resultó indistinguible del dolicol fosfato de mamíferos.
- 3 - Se extrajo por primera vez dolicol de tejidos de insecto; parece estar constituido por 17 a 18 isoprenos.
- 4 - Se estudió la formación, en Ceratitis capitata y otros insectos, del Dol-P-Man y Dol-P-Glc que, por los criterios usados, resultaron indistinguibles de los homólogos de vertebrados.
- 5 - Se comprobó la formación de Lípido-P-P-GlcNAc en Ceratitis, Triatoma y otros insectos - " in vivo " e " in vitro " - .
- 6 - Por primera vez se ha detectado la formación de diacetil-quitobiosa, unida a lípido, en artrópodos. Este disacárido es la unidad repetitiva en la quitina, poli-Nacetilglucosamina, principal componente del exoesqueleto cuticular en dicho phylum.
- 7 - El poliprenil-P-P-trisacárido de insecto parece idéntico al de otros eucariotes: Dolicol-P-P- (GlcNAc)₂ - Man . Se comprobó que se forma por elongación del

Dol-P-P- (GlcNAc)₂ con la manosa procedente del GDP-Man.

- 8 - Se estudiaron los lípido-oligosacáridos de insecto radiomarcados en manosa, que parecen formarse por elongación del lípido-trisacárido con manosas procedentes del Dol-P-Man y del GDP-Man. La cinética y condiciones de formación " in vitro " son similares a las de otros eucariotes. Algunos de estos lipo-oligosacáridos se han detectado " in vivo " en insectos y en Artemia salina.
- 9 - A partir de Dol-P-Man y Dol-P-P- (GlcNAc)₂ Man se obtuvo " in vitro " la formación de una sustancia que se comportó como un poliprenil-azúcar con el resto sacarídico de un tamaño aparente de 8 - 10 monosacáridos. Esta sustancia podría ser relacionada con una de similares características que se obtuvo cultivando epidermis de vinchuca con [14C] Glc.
- 10 - Se obtuvieron fracciones purificadas de insecto que estimularon la biosíntesis " in vitro " de los poliprenil-oligosacáridos y se demostró que contienen derivados de dolicol.
- 11 - En insectos, como en todos los eucariotes debidamente investigados, se formó un poliprenil-oligosacárido largo, conteniendo Glc, de características idénticas al aceptor endógeno glucosilado descubierto por el grupo de Leloir en hígado. Esta sustancia parece ser el último intermediario en la glicosilación de proteínas.
- 12 - El Dol-P-P- (oligosacárido) Glc de hígado fue reconocido como sustrato por las enzimas de insecto, que transfirieron el resto oligosacarídico a un aceptor endógeno. Inversamente, los microsomas de hígado catalizaron la transferencia del resto sacarídico del

lipo-oligosacárido de insecto.

- 13 - Se obtuvo, por primera vez en los eucariotes, la fosforilación del dolicol por una presunta poliprenil quinasa. Este resultado abre interesantes perspectivas de estudio, ya que se trata de una posible enzima clave para la regulación de la biosíntesis de glicoproteínas.
- 14 - Muchos de los resultados obtenidos en Triatoma y en Ceratitis han sido comprobados en otras especies de insectos y en Artemia salina. En este último organismo se ha demostrado que la formación de poli prenil-azúcares es un evento muy temprano en la reiniciación de la diferenciación de la gástrula desecada.
- 15 - La actividad de cada poliprenil transferasa sufre variaciones a lo largo del ciclo de vida del insecto. En la apolisis de Ceratitis y en la intermuda del V° estadio de Triatoma algunas enzimas fueron indetectables.
- 16 - Los datos obtenidos en artrópodos y los estudios preliminares en Euglena y Neurospora han aportado solidez a lo postulado por otros autores que sugirieron la extensión de los resultados obtenidos en mamíferos, levaduras y plantas, a todos los eucariotes.
- 17 - Se han discutido los resultados de la presente Tesis bajo la óptica de la bioquímica evolutiva, y se ha sugerido que:
 - éstos apuntalan la idea de que el papel del dolicol, como aceptor de azúcares e intermediario en la glicosilación de proteínas, se estableció tempranamente en la evolución eucariótica.
 - se deben realizar estudios en grupos clave, por ejemplo, en las algas azul verdosas,

para conocer qué tipo de lípido-intermediario poseen (pro- u eucariótico) y en protista y algas unicelulares para ratificar que el dolicol es el principal intermediario en eucariotes. Se propone que si esto fuera cierto se reforzaría la idea de un origen monofiletico para toda célula eucariótica.

Abreviaturas de los títulos de las revistas

Se utiliza la nomenclatura aceptada internacionalmente salvo para los títulos de revistas citadas numerosas veces que se abrevian como se indica a continuación, de acuerdo al criterio adoptado por Thomas E. Barman en el Enzyme handbook, Tomos I y II (1969) y Suplemento (1974). Springer Verlag. (Berlin).

<u>ABB</u>	Archives of Biochemistry & Biophysics
<u>ANN. REV. BIOCHEM.</u>	Annual Review of Biochemistry
<u>BBA</u>	Biochimica & Biophysica Acta
<u>BBRC</u>	Biochemical & Biophysical Research Communications
<u>BJ</u>	Biochemical Journal
<u>EJB</u>	European Journal of Biochemistry
<u>FEBS Lett.</u>	The Federation of European Biochemical Societies Letters
<u>JB</u>	Journal of Biochemistry
<u>JBC</u>	Journal of Biological Chemistry
<u>JMB</u>	Journal of Molecular Biology
<u>PNAS</u>	Proceedings of the National Academy of Sciences (US.)

Distribución de las referencias por revista

	<u>N°citas</u>	<u>% del total</u>
. ABB	14	3,2
. BBA	30	6,9
. BBRC	30	6,9
. Biochemistry	9	2,1
. BJ	34	8,0
. Comp. Biochem & Bio.	9	2,1
. EJB	16	3,7
. FEBS Lett.	25	5,8
. Insect Biochem.	9	2,1
. JBC	63	14,6
. Nature	9	2,1
. PNAS	15	3,4
. Restantes	166	39,0 (c/u menos de 2%)
. Total	429	100,0

BIBLIOGRAFIA

- (1) Cardini, C.E.; Caputto, R.; Paladini, A.C. y Leloir, L.F. (1950) *Nature* 165: 191-193
- (2) Caputto, R.; Leloir, L.F.; Cardini, C.E. y Paladini, A.C. (1950) *JBC* 184: 333-350
- (3) Leloir, L.F. (1970) *Nobel Lecture* 11/XII/70
- (4) Sharon, N. *Complex Carbohydrates* (1975) Addison-Wesley P. (N.York)
- (5) Gottschalk, A. (1972) in *Glycoproteins*, 24-30, Gottschalk, A. Ed. Elsevier Pub. Co. Amsterdam
- (6) Behrens, N.H. y Leloir, L.F. (1970) *PNAS* 66: 153-159
- (7) Rothfield, L. and Horecker, B.L. (1964) *PNAS* 52: 939-942
- (8) Anderson, J.S.; Matsushashi, M.; Haskin, M.A. y Strominger, J.L. (1965) *PNAS* 53: 881-889
- (9) Weiner, I.M.; Higuchi, J.; Rothfield, L.; Salmarsh Andrew, M.; Osborn, M.J. and Horecker, B.L. (1965) *PNAS* 54: 228-235
- (10) Wright, A.; Dankert, M. y Robbins, P.W. (1965) *PNAS* 54: 235-241
- (11) Wright, A.; Dankert, M. ; Fennesey, P. y Robbins. P.W. (1967) *PNAS* 57: 1798-1803
- (12) Higashi, Y.; Strominger, J.L. y Sweeley, C.C (1967) *PNAS* 57: 1878-1884
- (13) Robbins, P.W.; Bray, D.; Dankert, M. y Wright, A. (1967) *Science* 158: 1536-1542
- (14) Hemming, F.W. (1974) in *Biochemistry Ser. One*. 39-97, Goodwin Ed. Butterworths (London)
- (15) Osborn, M.J. (1969) *Ann.Rev.Biochem.* 38 : 501-538
- (16) Heath, E.C. (1971) *Ann.Rev.Biochem.* 40 : 29-56
- (17) Wright, A.; Kanesagaki, S. (1971) *Physiol.Rev.* 51: 748-784
- (18) Lennarz. W.J. (1970) *Ann.Rev.Biochem.* 39 : 359-388

- (19) Beytia , E.D. y Porter, J.W. (1976) *Ann.Rev.Biochem.* 45 : 113-142
- (20) Dankert, M.A. y Behrens, N.H. (1971) *Anales Soc.C.Arg.* (N°Especial) 145-163
- (21) Stone, J.J.; Butterworth, P.A.W. y Hemming, F.W. (1967) *B.J.* 102 : 443-455
- (22) Gaylor, J.L. (1971) in *Biochemistry Series ONE/Vol.4/ 1-38*, Ed. T.W. Goodwin - Butterworths (London)
- (23) Barr, R.M. y Hemming, F.W. *BJ* (1972) 126 : 1193-1202
- (24) Dunphy, P.J.; Kerr, J.B.; Pennock, J.F.; Whittle, K. J. y Feeney, J. (1967) *BBA* 136 : 136-147
- (25) Walton, J. y Pennock, J.F. (1971) *BJ* 121 : 471-479
- (26) Sasak, W. y Chojnacki, T. (1973) *Acta Biochem.Pol.* 20 : 343-350
- (27) Rowland, R.L.; Latimer, P.H. y Giles, J.A. (1956) *J.A.,.Chem.Soc.* 78: 4680-4683
- (28) Beedle, A.S.; Walton, M.J.; Goodwin, T.W. (1975) *Insect Biochem.* 5 : 465-472
- (29) Gough, D.P. y Hemming, F. . (1970) *BJ* 118 : 163-166
- (30) Breckenridge, W.C.; Wolfe, L.S. y Ng. Ying Kin, N.M.K. (1973) *J. Neurochem.* 21: 1311-1318
- (31) Burgos, J. ; Hemming, F.W.; Pennock, J.F. y Morton , R.A. (1963) *Biochem.J.* 88 : 470-482
- (32) Higashi, Y.; Siewert. G. y Strominger, J.L. (1970) *JBC* 245 : 3683-3690
- (33) Tanner, W. (1969) *BBRC* 35 : 144-150
- (34) Villemez, C.L. y Clarck , A.F. (1969) *BBRC* 36 : 57-63
- (35) Kauss, H. (1969) *FEBS Lett.* 5 : 81-84
- (36) Zatz, M. y Barondes, S.H. (1969) *BBRC* 36 : 511-517
- (37) Caccam, J.F.; Jackson, J.J. ; Eylar, E.H. (1969) *BBRC* 35: 505-511
- (38) Barr, R.M. y De Luca, L. (1974) *BBRC* 60 : 355-360
- (39) Connor, M.; Johnson, B. y Valkovich, G. (1972) *BBRC* 48 : 1437-1443

- (40) Behrens, N.H. (1974) in *Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces* (Lee, E. & Smith, E. Eds.) Vol.7 , 159-178, Academic Press, N.Y.
- (41) Leloir, L.F. (1974) in *Biology and Chemistry of Eucaryotic Cell Surfaces* (Lee, E. & Smith, E. Eds.) Vol.7 , 1-20, Academic Press, N.Y.
- (42) Waechter, C.J. y Lennarz, W.J. (1976) *Annual Rev.Biochem.* 45: 95-112
- (43) Lucas J.J. y Waechter, C.J.(1976) *Mol.Cell.Biochem.* 11:67-78
- (44) Forsee, W.T. y Elbein, I.D. (1976) in *Glycolipid Methodology* (L.A.Wittin y Ed.) 369-393, *Am.O.J.Chemists Soc.* (Champaign)
- (45) Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1976) *TRENDS Biochem. Sci.* 1 : 58-59
- (46) Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1978) *BBA* en prensa
- (47) Channon, H.J. y Marrian, G.F. (1926) *B.J* 20 : 409-416
- (48) Channon, H.J.; Devine, J. y Loreh. S.V. (1934) *BJ* 28 : 2012-2025
- (49) Dimter, A. (1941) *Hoppe-Seyl.Z.* 271 : 293-315
- (50) Pennock, J.F.; Hemming. F.W. y Morton, R.A. (1960) *Nature* 186: 470-472
- (51) Burgos, J. y Morton, R.A. (1962) *BJ* 82: 454-456
- (52) Butterworth, P.H.N.; Draper. H.H.; Hemming, F.W.; Pennock, J.K. y Morton, R.A. (1963) *BJ* 89: 32 p
- (53) Clayton. R.B. (1960) *JBC* 235 : 3421-3425
- (54) Butterworth, P.H.W. y Hemming, F.W. (1968) *A.B.B.* 128 : 503-508
- (55) Keenan, R.W.; Kruczek, M.E. y Fischer, J.B. *BBA* 486 : 1-9 (1977)
- (56) Dallner, G.; Behrens, N.H.; Parodi, A.J. y Leloir. L.F. (1972) *FEBS Lett.* 24: 315-317
- (57) Jung, P. y Tanner, W. (1973) *EJB* 37 : 1-6
- (58) Pont Lezica, R.; Brett, C.T.; Romero Martínez, P. y Dankert, M.A. (1975) *BBRC* 66 : 980-987
- (59) Wedgwood, J.F.; Strominger, J.L. y Warren, C.D. (1974) ^{/JBC} 249 : 6316-6324

- (60) Quesada Allue, L.A.; Belocopitow, E. y Maréchal, L.R. (1975) BBRC 66 : 121-1208
- (61) Daleo, G.R. y Pont Lezica, R. (1977) FEBS Lett. 74 : 247-250
- (62) Brett, C.T. y Leloir, L.F. (1977) BJ 161 : 93-101
- (63) Daleo, G.; Hopp, E.; Romero, P.A. y Pont Lezica, R. (1977) FEBS Lett. 81 : 411-414
- (64) Grange, D.K. y Adair, W.L. (1977) BBRC 79 : 734-740
- (65) Evans, P.J. y Hemming, F.W. (1973) FEBS Lett. 31 : 335-338
- (66) Baynes, J.W.; Hsu, A.F. y Heath, E.C. (1973) JBC 248 : 5693-5704
- (67) Richards, J.B.; Evans, P.J. y Hemming, F.W. (1971) BJ 124 : 957-959
- (68) Tckaz, J.S. y Hersovics, A. (1975) BBRC 64 : 1009-1017
- (69) Hersovics, A.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.W.; Wedgwood, J.F.; Liu, I. y Strominger, J.L. (1974) FEBS Lett. 45 : 312-317
- (70) Warren, C.D. y Jeanloz, I.R.W. (1973) Biochem. 11 : 5038-5045
- (71) Warren, C.D. y Jeanloz, I.R.W. (1975) JBC 250 : 8069-8078
- (72) Warren, C.D. y Jeanloz, I.R.W. (1973) FEBS Lett. 31 : 332-334
- (73) Warren, C.D. y Jeanloz, I.R.W. (1974) Carb.Res. 37 : 252-260
- (74) Sentandreu, R. y Lampen, J.O. (1971) FEBS Lett. 14 : 109-113
- (75) Tanner, W.; Jung, P. y Behrens, N.H. (1971) FEBS Lett. 16 : 245-248
- (76) Sentandreu, R. y Lampen, J.O. (1972) FEBS Lett. 27 : 331-334
- (77) Bretthauer, R.K.; Wu, S. e Irwin, W.E. (1973) BBA 304 : 736-747
- (78) Babczinski, P. y Tanner, W. (1973) BBRC 54 : 1119-1124
- (79) Palamarczyk, G. y Chojnacki, T. (1973) FEBS Lett. 34 : 201-203
- (80) Lehle, L. y Tanner, W. (1974) BBA 350 : 225-235
- (81) Sharma, C.B.; Babczinski, P.; Lehle, L. y Tanner, W. (1974) EJB 46 : 35-41

- (82) Bretthauer, R.K. y Wu, S. (1975) *ABB* 167 : 151-160
- (83) Villanueva, J.R. y Sentandreu, R. (1976) *FEBS Lett.* 71 : 316-320
- (84) Palamarczyk, G. y Janczuka, E. (1977) *FEBS Lett.* 77 : 169-172
- (85) Gold, M.H. y Hahn, H.J. (1976) *Biochem.* 15 : 1808-1814
- (86) Barr, R.M. y Hemming, F.W. (1972) *BJ* 126 : 1203-1208
- (87) Letoublon, R.C.; Comte, J. y Got, R. (1973) *EJB* 40 : 95-101
- (88) Letoublon, R.C. y Got, R. (1974) *FEBS Lett.* 46 : 214-217
- (89) Letoublon, R.C. (1977) Tesis de Doctorado, Univ. Claude Bernard, Lyon, F. N° 7704
- (90) Letoublon, R. y Got, R. (1977) *FEBS Lett.* 80 : 343-347
- (91) Crean, E.V. Y Rossomando, E.F. (1977) *BBA* 498 : 439-441
- (92) Alam, S.S. y Hemming, F.W. (1973) *Phytochem.* 12 : 1641-1649
- (93) Villemez, C.L. (1970) *BBRC* 40 : 636-641
- (94) Alam, S.S. y Hemming, F.W. (1971) *FEBS Lett.* 19 : 60-62
- (95) Storm, D.L. y Hassid, W.Z. (1972) *Plant Physiol.* 50 : 473-476
- (96) Clarck, A.F. y Villemez, C.L. (1973) *FEBS Lett.* 32 : 84-86
- (97) Lehle, L.; Fartaczek, F.; Tanner, W. y Kauss, H. (1976) *ABB* 175 : 419-426
- (98) Ericson, M.C. y Delmer, D. (1977) *Plant Physiol.* 59 : 341-347
- (99) Hinman, M.B. y Villemez, C.L. (1975) *Plant Physiol.* 56 : 608-612
- (100) Pont Lezica, R.; Romero, P.A. y Dankert, M.A. (1976) *Plant Physiol.* 58 : 675-680
- (101) Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1973) *JBC* 248 : 2858-2867
- (102) Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1975) *JBC* 250 : 9283-9293
- (103) Smith, M.M.; Axelos, M. y Péaud-Lenoel (1976) *Biochimie* 58 : 1195-1211
- (104) Behrens, N.H.; Parodi, A.J.; Leloir, L.F. y Krisman, C.R. (1971) *ABB* 143 : 375-383

- (105) Breckenridge, W.C. y Wolfe, L.S. (1973) FEBS Lett. 29 : 66-68
- (106) Wolfe, L.S.; Breckenridge, W.C. y Shelton, P.P. (1974) J.Neurochem. 23 : 175-185
- (107) Waechter, C.J.; Kennedy, J.L. y Harford, J.B. (1976) ABB 174 : 726-737
- (108) Harford, J.B.; Waechter, C.J. y Earl, F.L. (1977) BBRC 76 : 1036-1043
- (109) Tetas, M.; Chao, H. y Molnar, J. (1970) ABB 138 : 135-146
- (110) Hersovics, A.; Golovtchenko, A. M; Warren, C.D.; Bugge, B. y Jeanloz, R.W. (1977) JBC 252 : 224-234
- (111) Richards, J.B. y Hemming, F.W. (1972) BJ 130 : 77-93
- (112) Hemming, F.W.; Morton, R.A. y Pennock, J.F. (1963) Proc. Roy. Soc. London. Ser. B 158:291-310
- (113) Jeanloz, R.W. y Warren, C.D. (1973) FEBS Lett. 31 : 332-334
- (114) Behrens, N.H., Carminatti, H.; Staneloni, R.J.; Leloir, L.F. y Cantarella, A.I. (1973) PNAS 70 : 3390-3394
- (115) Martin, H.G. y Thorne, K.J.I. (1974) BJ 138 : 281-289
- (116) Vessey, D.A. y Zakim, D. (1975) EJB 53 : 409-504
- (117) Zatta, P. (1976) Experientia 32 : 693-694
- (118) Vessey, D.A.; Lysenko, N. y Zakim, D. (1976) BBA 428 : 138-145
- (119) Mankowski, T.; Sasak, W.; Janczura, E. y Chojnacki, T. (1977) ABB 181 : 393-401
- (120) Berthillier, G.; Letoublon, R. y Got, R. (1977) Comp. Biochem. Physiol. 58 B : 201-203
- (121) Tkacz, J.S.; Herscovics, A.; Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) JBC 249 : 6372-6381
- (122) Hersovics, A.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.W.; Wedgwood, J.F.; Liu, I. Y. y Strominger, J.L. (1974) FEBS Lett. 45 : 312-317
- (123) Herscovics, A.; Warren, C. y Jeanloz, R.W. (1975) JBC 250 : 8079-8084
- (124) Waechter, C.J.; Lucas, J.J. y Lennarz, W.J. (1973) JBC 248 : 7570-7579

- (125) Adamany, A.M. y Spiro, R.G. (1975) JBC 250: 2835-2841
- (126) Ronin, C. y Bouchilloux, S. (1976) BBA 428: 445-455
- (127) White, D.A. y Waechter, C.J. (1975) BJ 146: 645-651
- (128) Chambers, J. y Elbein, A.D. (1975) JBC 250 : 6904-6915
- (129) Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1976) PNAS 73: 2574 - 2578
- (130) Chen, W.W.; Lennarz, W. J.; Tarentino, A.L. y Maley, F. (1975) JBC 250: 7006-7013
- (131) Lucas, J.J.; Waechter, C.J. y Lennarz, W. J. (1975) JBC 250 : 1992-2002
- (132) Kean, E. J. (1977) JBC 252 : 5619-5621
- (133) Keenan, R.W.; Kruczek, M. y Fusinato, L. (1975) ABB 167 : 697-705
- (134) Schneider, E.G. y Lennarz, W. J. (1976) Dev. Biol. 53 : 10-20
- (135) Quesada, L.A.; Maréchal, L.R. y Belocopitow, E. (1976) FEBS Lett. 67: 243-247
- (136) Belocopitow, E.; Maréchal, L.R. y Quesada Allue, L.A. (1977) Mol. Cell. Biochem. 16: 127-134
- (137) Pont Lezica, R.; Romero, P.A. y Hopp, H.E. (1978) Planta 140 : 177-183
- (138) Leloir, L.F. (1977) en Function and Biosynthesis of Lipids. (Bazán ed.) pp.9-19 .Plenum, N.Y.
- (139) Parodi, A.J. (1976) FEBS Lett. 71 : 283-286
- (140) Parodi, A.J. (1977) EJB 75 : 171-180
- (141) Keenan, R.W.; Matula, J.M. y Holloman, L. (1973) BBA 326: 84-92
- (142) Mankowski, T. y Chojnacki, T. (1972) BBA 260 : 93-97
- (143) Behrens, N.H.; Parodi, A.J. y Leloir, L.F. (1971) PNAS 68 : 2857-2860
- (144) Pucci, P.R.; Parodi, A.J. y Behrens, N.H. (1972) Anales Asoc.Q. Arg. 60 : 203-212
- (145) Parodi, A.J.; Behrens, N.H.; Leloir, L.F. y Dankert, M. (1972) BBA 270 : 529-536

- (146) Parodi, A. J.; Behrens, N.H.; Leloir, L.F. y Carminatti, H. (1972) PNAS 69: 3268-3277
- (147) Mankowski, T.; Sasak, W. y Chojnacki, T. (1975) BBRC 65: 1292 - 1297
- (148) Herscovics, A.; Bugge, B. y Jeanloz, R.W. (1977) JBC 252 : 2271-2278
- (149) Robbins, P.W.; Krag, S.S. y Liu, T. (1977) JBC 252: 1780-1785
- (150) Parodi, A. J. y Martín-Barrientos, J. (1977) BBA : 500: 80-88
- (151) Martín-Barrientos, J. y Parodi, A. J. (1977) Mol. Cell. Biochem. 16 : 111-117
- (152) Waechter, C. J.; Lucas, J. J. y Lennarz, W. J. (1974) BBRC 56 : 343-350
- (153) Zatta, P.; Zakim, D. y Vessey, D.A. (1975) BBA 392 : 361-365
- (154) McEvoy; Shall, S.; Ellis, D.E. (1977) BJ 164: 273-275
- (155) Hopwood, J.P. y Dorfman, A. (1977) BBRC 75: 472-479
- (156) Turco, S. J. y Heath, E.D. (1977) JBC 252 : 2918-2928
- (157) Lehle, L. y Tanner, W. (1975) BBA 399 : 364-374
- (158) Nakayama, K; Araki, Y. y Ito, E. (1976) FEBS Lett. 72 : 287-290
- (159) Reuvers, F.; Habets-Willems, C.; Reinking, A. y Boer, P. (1977) BBA 486: 541-552
- (160) Lehle, L. y Tanner, W. (1978) EJB 83 : 563-570
- (161) Reuvers, F. ; Boer, P. y Hemming, F.W. (1978) BJ 169 : 505-508
- (162) Forsee, W.T.; Valkovich, G. y Elbein, A.D. (1976) ABB 174: 469-479
- (163) Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1977) JBC 252 : 2444-2446
- (164) Quesada Allue, L.A. (1973) Trabajo de Licenciatura , Fac.Ccias,Exactas y Naturales U B A
- (165) Molnar, J.; Chao, H. e Ikehara, Y. (1971) BBA 239 : 401-410
- (166) Mookajla, S.; Cole, D.E.C.; Chow, A. y Letts, P. (1972) Can.J.Biochem. 50 : 1094-1108

- (167) Leloir, L.F.; Staneloni, R.J.; Carminatti, H. y Behrens, N.H. (1973) BBRC 52 : 1285-1292
- (168) Palamarczyk, G. y Hemming, F.W. (1975) BJ 148 : 245-251
- (169) Zatta, P.; Zakim, D.; Vessey, D.A. (1976) BBRC 70 : 1014-1019
- (170) Godelaine, D.; Beaufay, A.; Wibo, M. (1977) PNAS 74 : 1095-1099
- (171) Ghalambor, M.A.; Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) BBRC 56 : 407-414
- (172) Herscovics, A.; Warren, C.; Bugge, B. y Jeanloz, R. (1978) JBC 253 : 160-165
- (173) Chen , W.W. y Lennarz, W.J. (1976) JBC 251 : 7802-7809
- (174) Chen, W.W. y Lennarz, W.J. (1977) JBC 252 : 3473-3479
- (175) Waechter, C.J. y Harford, J.B. (1977) ABB 181 : 185-198
- (176) Patt, L.M. y Grimes, W.J. (1974) JBC 249 : 4157-4165
- (177) Arnold, D.; Hommel, E. y Risse, H.J. (1976) Mol.Cell.B. 10 : 81-95
- (178) Patt, L.M. y Grimes, W.J. (1976) BBA 444 : 97-107
- (179) Struck, D.K. y Lennarz, W.J. (1976) JBC 251 : 2511-2519
- (180) Quesada Allue, L.A.; Maréchal, L.R. y Belocopitow, E. (1976) Acta Physiol. Latinoam. 26 : 349-363
- (181) Cooper, J.R. y Hemming, F.M. (1977) EJB 78 : 89-94
- (182) Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1974) Biochemistry 12 : 5038-5045
- (183) Warren, C.D. y Jeanloz, R.W. (1975) Biochemistry 14 : 412-419
- (184) Warren, C.D.; Konami, Y. y Jeanloz, R.W. (1973) Carb.Res. 30 : 257-279
- (185) Warren, C.D. y Jeanloz, R. W. (1973) Biochemistry 12 : 5031-5037
- (186) Warren, C. D. y Jeanloz, R.W. (1973) Biochemistry 11 : 2565-2572
- (187) Tabora, E. (1976) Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires
- (188) Parodi, A.J.; Staneloni, R.; Cantarella, A.I.; Leloir, L.F.; Behrens, N.H.; Carminatti, H. y Levy, J.A. (1973) Carb.Res. 26 : 393-400

- (189) Zatta, P. ; Zakim, D.; Vessey, B.A. (1976) BBA 441 : 103-114
- (190) Tábora, E. y Behrens, N.H. (1977) Moll.Cell.B. 16 : 193-196
- (191) Ydoyaga, V. y Carminatti, H. (1977) Mol. Cell. B. 16 : 171-176
- (192) Spiro, M.J.; Spiro, R.G.; Bhoyroo, V.D. (1976) JBC 251 : 6400-6408
- (193) Spiro, R.G.; Spiro, M.J. y Bhoyroo , V.D. (1976) JBC 251 : 6409-6419
- (194) Spiro, M.J.; Spiro, R.G. y Bhoyroo, V.D. (1976) JBC 251 : 6420-6425
- (195) Scher, M.; Jochen, A. y Waechter, C.J. (1977) Biochem. 16: 5037-5044
- (196) Wedgwood, J.F.; Warren, C.D.; Jeanloz, R.W. y Strominger, J.L. (1974) PNAS 71 : 5022-5026
- (197) Romero Martínez, P.A. (1977) Tesis de Doctorado. Universidad de Bs, Aires.
- (198) Lipke, H.; Graves, B. ; y Leto, S. (1965) JBC 240 601 - 608
- (199) Hsu, A.I.; Baynes, J.N. y Heath, E.C. (1974) PNAS 71 : 2391-2395
- (200) Pless, D.D. y Lennarz, W.J. (1975) JBC 250 : 7014-7019
- (201) Levy, J.A.; Carminatti, H.; Cantarella, A.I.; Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Tábora, E. (1974) BBRC 60 : 118-125
- (202) Heifetz, A. y Elbein, A.D. (1977) BBRC 75 : 20-28
- (203) Quesada Allue, L.A. y Belocopitow, E. (1978) EJB 88: 529-541
- (204) Oliver, G.J.A.; Harrison, J. y Hemming, F. (1975) EJB 58 : 223- 229
- (205) Oliver, G.J.A ; y Hemming, F. (1975) BJ 152 : 191-199
- (206) Pless, D.D. y Lennarz, W.J. (1977) PNAS 74 : 134-138
- (207) Krag, S.; Cifone, M.; Robbins, P.W. y Baker, R. (1977) JBC 252 : 3561-3564
- (208) Lucas, J.J. y Levin, E. (1977) JBC 252 : 4330-4336
- (209) Tucker, P. y Petska, S. (1977) JBC 252 : 4474-4486

- (210) Municio, A.M.; Odriozola, J.M. ; Piñeiro, A. y Ribera, A. (1971) BBA 248: 212 - 225
- (211) Turco, S.J.; Stetson, B. y Robbins, P.W. (1977) PNAS 74 : 4411-4414
- (212) Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. (1978) PNAS 75 :(3) : 1162-1166
- (213) Forsee, W.T.; Griffin, J.A. y Schutzbach, J.S. (1977) BBRC 75: 799-805
- (214) Chambers, J.; Forsee, W.T. y Elbein, A.D. (1977) JBC 252: 2498-2506
- (215) Stacewicz, N.; Hui-Hsin, C.W. y Gawienowski, A.M. (1975) BBA 380 : 264-269
- (216) De Luca, L.; Silverman Jones, C.S. y Barr, R.M. (1975) BBA 409 : 342-359
- (217) Rosso, G.C.; De Luca, L. ; Warren, C.D. y Wolf, G. (1975) J.Lipid Res. 16: 235-243
- (218) Jochen, A.; Scher, M.G. y Waechter, C.J. (1977) Trans.Am.Soc.Neurochem. 8 : 189
- (219) Struck, D.K. y Lennarz, W.J. (1977) JBC 252 : 1007-1013
- (220) Arnold, D.; Hommel, E. y Risse, H.J. (1976) Mol.Cell.Biochem. 11: 137-147
- (221) Merritt, W.D.; Morre, D.J.; Franke, W.W. y Keenan, T.W. (1977) BBA 497: 820-824
- (222) Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1976) Ann.Rev.Biochem. 45: 217-237
- (223) Pigman, W. (1977) en *The Glycoconjugates Vol. I* , 1-11, Horowitz & Pigman Ed., Academic Press, London
- (224) Rodén, L. y Schwartz, N.B. (1975) en *Biochemistry of Carbohydrates* , 95 a 152, Whelan Ed., Butterworths, London
- (225) Hunt, S. (1970) *Polysaccharide-Protein Complexes in Invertebrates* , 329 pp. , Academic Press, London
- (226) Lee, Y.C. y Scoocca, J.R. (1972) JBC 247 : 5753-5758
- (227) Huang, C.C.; Mayer, H.E. y Montgomery, R. (1970) Carb.Res. 13 : 127-137
- (228) Roseman, S. (1970) Chem.Phys.Lipids 5 : 270-297
- (229) Schachter, H. (1974) Biochem.Soc.Symp. 40 : 57-71

- (230) Spiro, R.G.; Spiro, M.J. y Adamany, A.M. (1974) *Biochem.Soc.Symp.* 40 : 37-55
- (231) Yamazaki, H. (1955) *Bull.Nagano-Ken Sericult.Exp.St.* 10: 249 (Citado por 225).
- (232) Nishizawa, K.; Yamaguchi, T.; Handa, N.; Maeda, M. y Yamazaki, H. (1963) *JB* 54 : 419- 426
- (233) Strout, V.; Lipke, H. y Geoghegan, T. (1976) in *The insect integument* pp.43-61 (Hepburn, Ed.) Elsevier (Amsterdam).
- (234) Defretin, R. (1951) *C.R. Acad.Sci (Paris)* 233 : 403-404
- (235) Marshall, A.T. (1966) *J.Insect Physiol.* 12 : 635-641
- (236) Marshall, A.T. (1966) *J.Insect Physiol.* 12: 925-929
- (237) Rudall, K.M. (1963) *Adv.Insect Physiol.* 1: 257-263
- (238) Rudall, K.M. (1962) en *Comparative Biochemistry* (Florkin y Mason Ed.) Vol. 4. p.397, Academic Press, N.York
- (239) Hackman, R.H. (1960) *Aust.J.Biol.Sci.* 13 : 568-576
- (240) Hackman, R.H. (1962) *Aust.J.Biol.Sci.* 15 : 526-533
- (241) Attwood, M.M. y Zola, H. (1967) *Comp.Biochem.Physiol.* 20 : 993-1002
- (242) Krishnan , G.; Ramachandran, G.N. y Santanam, G.S. (1955) *Nature* 176 : 557
- (243) Kent, N.H. y Macheboeuf, M. (1947) *C.R.Acad.Sci.* 225 : 602 - 605
- (244) Kent, N.H. (1947) *Bull.Soc.Neuchatel Sci.Nat.* 70 : 85 (citado en 225)
- (245) Kent, N.H. (1949) *Schweiz.Z.Path.Bakt.* 12 : 81-90
- (246) Kent, N.H. (1957) *Expl.Parasit.* 6 : 351-367 y *Expl.Parasit.* 6 : 486-495
- (247) Lindh, N.O. (1967) *Comp.Biochem.Physiol.* 20 : 209-216
- (248) Pan, M.L.; Bell, W.J. y Telfer, W.H. (1969) *Science* 165 : 393-394
- (249) Chino, H.; Yamagata, M. y Sato, S. (1977) *Insect Biochem.* 7 : 125-131
- (250) Chen, T.T.; Strahindorf, P.W. y Wyatt, G.R. (1978) *JBC* (en prensa, citado por 268)

- (251) Yamasaki, K. (1975) *Insect Biochem.* 4: 411-422
- (252) Dejmál, R.K. y Brookes, V.J. (1972) *JBC* 247: 869-874
- (253) Kunkel, J.G. y Pan, M.L. (1976) *J. Insect Physiol.* 22: 809-818
- (254) Oie, M.; Takahashi, S.Y. e Ishizaki, H. (1975) *Dev. Growth and Diff.* 17: 237-246
- (255) Engelmann, F. y Friedel, T. (1974) *Life Sci.* 14: 587-594
- (256) Engelmann, F.; Friedel, T. y Ladduwahetty, M. (1976) *Insect Biochem.* 6: 211-220
- (257) Koeppe, J. y Ofengand, J. (1976) *ABB* 173: 100-113
- (258) Gellissen, G.; Wate, E.; Cohen, E.; Emmerich, H.; Applebaum, S.W. y Flossdorf, J. (1976) *J. Comp. Physiol (B)* 108: 287-301
- (259) Thomas, K.K. y Gilbert, L.I. (1968) *ABB* 127: 512-521
- (260) Chino, H.; Murakami, S. y Harashima, K. (1969) *BBA* 176: 1-26
- (261) Chino, H.; Yamagata, M.; Takahashi, K. (1970) *BBA* 441: 349-353
- (262) Munn, E.A. y Greville, G.D. (1967) *J. Insect. Physiol.* 15: 1601-1605
- (263) Munn, E.A.; Feinstein, A.; Greville, G. (1971) *BJ* 124: 367-374
- (264) Tojo, S. citado en Wyatt & Pan (268).
- (265) Sekeris, C.E.; Perassi, R.; Arnemann, I; Ullrich, A.; Scheller, K. (1971) *Insect Biochem.* 7: 5-10
- (266) Roberts, D.B. (1971) *Nature* 233: 394-397
- (267) Wolfe, J.; Akam, M.E.; Roberts, D.B. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79: 47-53
- (268) Wyatt, G.R. y Pan, M.L. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 779-817
- (269) Siakotos, A.N. (1960) *J. Gen. Physiol.* 43: 999-1013, citado por (225)
- (270) Carey, E.G. y Wyatt, G.R. (1960) *BBA* 41: 178-179
- (271) Lipke, H.; Grainger, M.M. y Siakotos, A.N. (1965) *JBC* 240: 594-600
- (272) Perkowska, E. (1963) *Exp. Cell. Res.* 32: 259-267

- (273) Kodami, M. (1948) PNAS 34 : 131-135
- (274) Kato, K. I.; Perkowska, E. y Sirlin, J. L. (1963) J.Histochem.Cytochem. 11: 485-488
- (275) Wilson, B. R. (1960) Ann.Ent.Soc.Am. 53: 170- 179
- (276) Wilson, B. R. (1960) Ann.Ent.Soc.Am. 53: 732 -744
- (277) Riley, R. C. y Forgasa, A. J. (1967) J.Insect Physiol. 13: 509- 521
- (278) Mc.Farlane, J. E. (1962) Can. J. Zool. 40 : 553 - 557
- (279) Anderson, J. M. (1950) Biol.Bull.Mar.Biol.Lab. Woods Hole 99: 49-54
- (280) Sissakian, H. y Veinora, M. (1958) Biokhimiya 23: 52-? , citado por (225)
- (281) Spiro, R. G. (1970) Ann.Rev.Biochem. 39: 599-638
- (282) Marshall, R. D. (1974) Biochem.Soc.Symp. 40 : 17-26
- (283) Neuberger, A.; Gottschalk, A.; Marshall, R. D. y Spiro, R. G. (1972) en Glycoproteins (Gottschalk Ed.) Tomo A, 450-490, Elsevier - Amsterdam
- (284) Lindahl, U. y Rodén, L. (1972) en Glycoproteins, Tomo A (Gottschalk Ed.) 491-517, Elsevier - Amsterdam
- (285) Adams, J. B. (1965) BJ 94 : 368-377 y BJ 97 : 345-352
- (286) Lampion, D. T. A.; Katona, L. y Roerig, S. (1973) BJ 133 : 125-131
- (287) Fincher, G. B.; Sawyer, W. H. y Stone, B. A. (1973) Proc.Aust.Biochem.Soc. 6 : 71 (citado en 282)
- (288) Ballou, C. E. (1974) Adv.Enzymol. 40: 239-270
- (289) Nakajima, T. y Ballou, C. E. (1975) PNAS 72: 3912-3916
- (290) Pennock, J. F. (1977) in Biochemistry of Lipids II, Int.Rev. of Biochem. 14 : 153-214, Goodwin, T. W. Ed., Univ.Park Press, Baltimore
- (291) Parodi, A. J. (1978) EJB 83 : 253-259
- (292) Pewsar, G. y Mannus, K. (1974) Phytochem. 13 : 2563-2566

- (293) Zinkel, D.F. y Evans, B.B. (1972) *Phytochem.* 11 : 3387-3390
- (294) Sasak, W.; Mankowski, T.; Chojnacki, T. y Daniewski, W.M. (1976) *FEBS Lett.* 64: 55-61
- (295) Bianchi, A.G. de y Terra, W.R. (1975) *J.Insect.Physiol.* 21: 643-657
- (296) Santelli, R.V.; Penoni, J.S.; Bonaldo, M.F. y Lara, F.J.S. (1976) *Insect Biochem.* 6: 221-226
- (297) Prince, G.M. (1973) *Biol.Rev.* 48: 333-375
- (298) Locke, M. Collins, J.V. (1968) *J.Cell.Biol.* 36: 453-483
- (299) Collins, J.V. (1974) *Can.J.Zool.* 52: 639-642 y (1975) *Can.J.Zool.* 53: 480-489
- (300) Ashwell, G. y Morell, A.G. (1974) *Adv.Enzymol.* 41: 99-128
- (301) Collins, J.V. y Vining, L.C. (1977) *Comp.Biochem.Physiol.* 58 B: 135-140
- (302) Leloir, L.F.; Parodi, A.J. y Behrens, N.H. (1971) *Revta.Soc.Argent.Biol.* 47: 108-116
- (303) Wright, A. y Robbins, P.W. (1965) *BBA* 104: 594-596
- (304) Glynn, I.M. y Chappell, J.B. (1964) *BJ* 90: 147-149
- (305) Belocopitow, E. y Maréchal, L.R. (1970) *BBA* 198: 151-154
- (306) Cabib, E. y Bowers, B. (1971) *JBC* 246: 152-159
- (307) Li, E.; Tabas, I. y Kornfeld, S. (1978) *JBC* 253: 7762-7770
- (308) Neville, A.C. (1975) *Biology of the Arthropod Cuticle*, pp.488, Springer-Verlag, Berlin
- (309) Foster, A. y Weber, J.M. (1960) *Adv.Carb.Chem.* 15: 371-393
- (310) Lipke, H. y Geoghegan, T. (1971) *BJ* 125: 703-716
- (311) Lipke, H. y Strout, V. (1972) *Israel J.Entomol.* 7: 117-128
- (312) Kimura, S. ; Strout, H.V. y Lipke, H. (1976) *Insect Biochem.* 6: 65 - 77

- (313) Lipke, H. y Geoghegan, T. (1971) *J. Insect Physiol.* 17: 415- 421
- (314) Locke, M. (1974) en *The Physiology of Insecta*, Vol. VI, 123-213, (Rockstein, M. Ed.) Academic Press, N. York
- (315) Hackman, R. H. (1974) en *The Physiology of Insecta*, Vol. VI, 215-270, (Rockstein, M. Ed.), Academic Press, N. York
- (316) Krisman, C.R. (19 3) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210 : 81-89
- (317) Reynolds, S.I. (1973) pH D.Thesis, Univ. of Cambridge, citado por 308
- (318) Hunt, L.A.; Etchinson, J.R. y Summers, D.F. (1978) *PNAS* 75 : (2) : 754-758
- (319) Robbins, P.W.; Hubbard, S.C.; Turco, S.J. y Wirth, D.F. (1977) *Cell* 12: 893-900
- (320) Tabas, I.; Schlesinger, S. y Kornfeld, S. (1978) *JBC* 253 : 716-722
- (321) Ugalde, R.A.; Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. (1978) *FEBS Lett.* 91 : 209 - 212
- (322) Schwarz, R.T.; Schmidt, M. y Lehle, L. (1978) *EJB* 85: 163-172
- (323) Ronin, C.; Granier, C.; Van Rietschoten, J. y Bouchilloux, S. (1978) *BBRC* 81 : 772-778
- (324) Hopp, H.E.; Romero, P.A.; Daleo, G.R. y Pont Lezica, R. (1978) *EJB* 84 : 561-571
- (325) Sefton, B. (1977) *Cell* 10 : 659-668
- (326) Takatsuki, A.; Arima, K. y Tamura, G. (1971) *J. Antibiotics* 24: 215-233
- (327) Kuo, S.C. y Lampen, J.O. (1974) *BBRC* 58 : 287-295
- (328) Tkacz, J.S. y Lampen, J.O. (1975) *BBRC* 65 : 248-257
- (329) Takatsuki, A.; Kohno, K. y Tamura, G. (1975) *Agr. Biol. Chem* 39 : 2089-2091
- (330) Hickman, S.; Kulczycki, A.; Lynch, R.G. y Kornfeld, S. (1977) *JBC* 252 : 4402-4408
- (331) Hart, G.W. y Lennarz, W.J. (1978) *JBC* 253 : 5795-5801
- (332) Kang, M.S.; Spencer, J.A. y Elbein, A.D. (1978) *BBRC* 82 : 568-574

- (333) Reuvers, F.; Boer, P. y Steyn-Parvé, E. (1978) BBRC 82 : 800-804
- (334) Siewert, G. y Strominger, J.L. (1967) PNAS 57 : 767-773
- (335) Takatsuki, A. y Tamura, G. (1971) J.Antibiotics 24 : 185- 194
- (336) Takatsuki, A.; Shimizu, K. y Tamura, G. (1972) J.Antibiotics 25 : 75-85
- (337) Lehle, L. y Tanner, W. (1976) FEBS Lett. 71 : 167-170
- (338) Lehle, L. y Schwartz, R. (1976) EJB 67 : 239-245
- (339) Kuo, K.C. y Lampen, J.O. (1976) Arch.Biochem.B. 172 : 574-581
- (340) Lloyd, K.; Kabat, E.A. y Licerio, E. (1968) Biochemistry 7 : 2977-2990
- (341) Duksin, D. y Bornstein, P. (1977) JBC 252 : 955-962
- (342) Garoff, H. y Schwartz, R.T. (1978) Nature 274 : 487-489
- (343) Leavitt, R.; Schlessinger, S. y Kornfeld, S. (1977) JBC 252 : 9018-9023
- (344) Schneider, G.; Nguyen, H. y Lennarz, W. (1978) JBC 253 : 2348-2355
- (345) Frisch, A.; Lekowitz, H. y Loyter, A. (1976) BBRC 72 : 138-145
- (346) Ericson, M.C.; Gafford, J.T. y Elbein, A.D. (1977) JBC 252 : 7431-7435
- (347) Sinohara, H. (1977) Insect Biochem. 7 : 3-4
- (348) Sinohara, H.; Asano, Y. y Fukui, A. (1971) BBA 237 : 273-279
- (349) Pratt, R.M. y Pastan, I. (1978) Nature 272 : 67-69
- (350) Myers, F. L. y Northcote, D.H. (1959) BJ 71 : 749-756
- (351) Popják, G.; Cornforth, J.W. ; Cornforth, R.H.; Ryhage, R. y Goodman, D.S. (1962) JBC 237 : 56- 61
- (352) Moulé, Y. ; Chaveau, J. y Rouiller, C. (1960) J.Biophys.Biochem.Cytol. 7: 547-562
- (353) Porter, C. y Jaworski, E. (1965) J.Insect Physiol. 11: 1151-1160
- (354) Dallner, G. y Nilsson, R. (1966) J.Cell.Biol. 31 : 181-193

- (355) Folch, J.; Lees, M. y Sloane, S.G. (1957) JBC 226 : 497-509
- (356) Bray, G.A. (1960) Anal.Biochem. 1 : 279-285
- (357) Keller, T.A. y Cabib, E. (1971) JBC 246 : 160 - 166
- (358) McMurrough, I. y Bartnicki-García, S. (1971) JBC 246: 4008-4016
- (359) García, R.C.; Recondo, E. y Dankert, M. (1974) EJB 43: 93-105
- (360) Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) JBC 66 : 375-400
- (361) Chen, P.S.; Toribara, T.Y. y Warner, H. (1956) Anal.Chem. 28 : 1756-1758
- (362) Chalvardjian, A. y Rudnicki, E. (1970) Anal.Biochem. 36 : 225-226
- (363) Warburg, O. y Christian, W. (1941) Biochem.Zeits. 310 : 384-421
- (364) Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) JBC 193 : 265-275
- (365) Somogyi, M. y Nelson, N. (1945) JBC 160 : 61-72
- (366) Winzler, R.J. (1963) in Microdosage des Glucides, p. 78, Montreuil Ed., citado por Letoublon, R. , Tesis de Doctorado, Univ. Lyon
- (367) Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. y Smith, F. (1956) Anal. Chem. 28 : 350-356
- (368) Elson, L.A. y Morgan, W.T. (1933) BJ 27 : 1824-1828
- (369) Reissig, J.L. y Leloir, L.F. (1966) Methods in Enzymol. 8 : 175- 178
- (370) Reissig, J.L.; Strominger, J.L. y Leloir, L.F. (1955) JBC 217 : 959-966
- (371) Zweig, G y Sherma, J. (1972) Handbook of Chromatography Vol I. (CRC Press)Cleveland
- (372) Krisman, C. (1962) Anal.Biochem. 4 : 17-23
- (373) Lohr, G.N.; Walker, H.D. y Bergmeyer, H.V. (1965) en Methods in Enzymatic Analysis, 744-751, Academic Press, N.York
- (374) Bahl, O.M.P. y Agrawal, K.M.L. (1968) JBC 243 : 98-102
- (375) Porath, J. y Flodin, P. (1951) Nature 168 : 202-203

- (376) Data for Biochemical Research (1972) 2da. Edición (Dawson y col. Ed.), Oxford Univ.Press, London
- (377) McSeeney^W, G.P. (1965) J.Chromatog. 17 : 183-185
- (378) Morgan, W.T.J. y Elson, L.A. (1934) BJ 28: 988- 995
- (379) Trevelyan, W.F.; Procter, D.P. y Harrison, J.S. (1950) Nature 166: 444 - 445
- (380) Burrows, S.; Grylls, F.S.M. y Harrison, J.S. (1952) Nature 170 : 800- 801
- (381) Toennies, G. y Kolb, J. (1951) Anal.Chem. 23: 823 -826
- (382) De Ferrari, J.O.; Muchnik de L., R.; Matsuhira, B. y Sproviero, J.F. (1962) J.Chromatog. 9: ~~283-290~~ 283-290
- (383) Jeanes, A.; Wise, D.S. y Dimler, R.J. (1951) Anal.Chem. 23 : 415-420
- (384) Aminoff, D.; Morgan, W.T. y Watkins, W. M. (1952) BJ 51 : 379- 389
- (385) Mes, J. y Kamm, L. (1968) J.Chrom38: 120-125
- (386) Tung, K.K. y Nordin, J.H. (1968) BBA 158 : 154-156
- (387) Paladini, A.C. y Leloir, L.F. (1952) BJ 51: 426-430
- (388) Leloir, L. F. (1951) ABB 33 : 186-190
- (389) Davies, D.A.L. (1957) BJ 67 : 253-256
- (390) Cabib, E.; Leloir, L.F. y Cardini, C.E. (1953) JBC 203 : 1055 - 1070
- (391) Cardini, C.E. y Leloir, L.F. (1957) JBC 225 : 317-324
- (392) Steiner, S. y Lester, R. L. (1972) J.Bacteriol. 109 : 81-88
- (393) Adamany, A.N. y Spiro, R.G. (1974) JBC 250 : 2842-2854
- (394) Markham, R. y Smith, J.D. (1952) BJ 52 : 552- 557
- (395) Kates, M. (1972) Techniques of Lipidology, pp. 610, (Work y Work Ed.), North-Holland, Londres
- (396) Stone, K.J.; Wellburn, A.R.; Hemming, F.W. y Pennock, J.F. (1967) BJ 102 : 325-330

- (397) Rouser, G.; Kritchevsky, G. y Yamamoto, A. (1967) en Lipid Chromatographic analysis pp.99-162. Marinetti Ed.(M. Dekker)N.Y.
- (398) Hoyle, G. (1953) J. Exp. Biol. 30: 121-135
- (399) Chen, D. (1968) in Experiments in Physiology and Biochemistry, 201-208, Kerkurt Ed., Academic Press, N.York
- (400) Maddrell, H.P. (1968) in Experiments in Physiology and Biochemistry, 209-219, Kerkurt Ed., Academic Press, N.York
- (401) Grace, T.C.C. (1962) Nature 195: 788-789
- (402) Muir, H. y Hardingham, T.E. (1975) in Biochemistry Series One, Vol. 5, 153-222, Whelan Ed., Butterworth & Co. Ltd.
- (403) Susheela, C. y Kunthara, J. (1976) Differentiation 5: 29-33
- (404) Hentschel, C.C. y Tata, J.R. (1976) TIBS May: 97-100
- (405) Clegg, J.S. (1976) Comp.B. Physiol 53 (A): 83-93
- (406) Clark, A.J. y Bloch, K. (1959) JBC 234: 2578- 2589
- (407) Clayton, R.B. (1971) in Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry (Goodwin, T.W. Ed.), Academic Press, London , citado por (25)
- (408) Lipke, H. y Fraenkel, G. (1956) Ann. Rev. Entomol. 1: 17-32
- (409) Van Den Oord , A. (1964) Comp. Biochem. Physiol. 13: 461-472
- (410) Zandee, D.I. (1967) C.B.P. 20: 811-822
- (411) Pan, S.C.; Laskin, A.I. y Principe, P. (1962) J. Chromatog. 8: 32 -36
- (412) Lundt, M.R. Y Kent, P.W. (1961) BJ 78: 128-134
- (413) Huber, C. N.; Scobell, H. D.; Tai, H.; y Fischer, E. E. (1968) Anal. Chem. 40: 207 - 209
- (414) Fairbanks, G. ; Steck, T. L. ; y Wallach, D. F. H. (1971) Biochemistry 10: 2606 - 2617
- (415) Miller, J. N. B. (1967) Adv. Carb. Chem. 22: 25 - 37
- (416) Butler, N. y Wolf, G. (1976) BBRC 68: 704 - 711
- (417) Hassid, W. Z. (1972) in Biochemistry of the Glycosidic linkage (Piras, R. y Pontis, H. Eds.) pp.315- 335 Academic Press , N.Y.

- (418) Sweeley, C. C. (1969) en *Methods in enzymol.* 14 : 254 - 267
- (419) Herndon, W. C. (1967) *J. Chem. Educ.* 44 : 724 - 727
- (420) French, C. S. y Milner, H. W. (1955) *Methods in enzymol.* 1 : 64 -67
- (421) Municio, A. M. ; Odriozola, J. M. y P erez -Albarsanz, M. A. (1975) *EJB* 60: 123-128
- (422) Crone, H. D. y Bridges, R. G. (1963) *BJ* 89 : 11- 21
- (423) Marks, E. P. y Sowa, B. A. (1976) en *The insect integument* pp.339-357 (H. R. Hepburn ed.) Elsevier. Amsterdam.
- (424) Endo, A. Kakiki, K. y Misato, T. (1970) *J. Bacteriol.* 104: 189 - 196
- (425) Hackman, R. H. (1976) en *The insect integument*, pp.107-120, (H. R. Hepburn Ed.), Elsevier, Amsterdam.
- (426) Tabas, I. y Kornfeld, S. (1978) *JBC* 253 : 7779 -7786
- (427) Kornfeld, S. ; Li, E. y Tabas, I. (1978) *JBC* 253 : 7771 - 7778
- (428) Finamore, F. J. y Clegg, J. S. (1969) en *The Cell cycle*, pp.249 - 278 (Padilla y col. editores) Academic Press, N. York .
- (429) Rosso, G. C.; Masushige, S.; Quill, H. y Wolf, G. (1977) *PNAS* 74: 3762 - 3766

INDICE DE PRIMEROS AUTORES

- ADAMANY, 125,393
 ADAMS, 285
 ALAM, 92,94
 AMINOFF, 384
 ANDERSON, J.S., 8
 ANDERSON, J.M. 279
 ARNOLD, 177,220
 ASHWELL, 300
 ATTWOOD, 241
- BABCZINSKI, 78
 BAHL, 374
 BALLOU, 288
 BARR, 23,38,86
 BAYNES, 66
 BEEDLE, 28
 BEHRENS, 6,40,104
 114,143
 BELOCOPITOW,136,305
 BERTHILLIER, 120
 BEYTIA, 19
 BIANCHI, 295
 BRAY, 356
 BRECKENRIDGE, 30,105
 BRETT, 62
 BRETTHAUER,77,82
 BURGOS, 31,51
 BURROWS, 380
 BUTLER, 416
 BUTTERWORTH,52,54
- CABIB, 306,390
 CACCAM, 37
 CAPUTTO, 2
 CARDINI, 1 ,391
 CAREY, 270
 CHALVARDJIAN,362
 CHAMBERS,128,214
 CHANNON, 47,48
 CHEN, P.S. , 361
 CHEN, D.H. , 399
 CHEN, T.T. , 250
 CHEN,W.W. ,173,174
 130
 CHINO, 249,260,261
 CLARCK,A.F. ,96
 CLARCK,A.J. ,406
- /
 CLAYTON,53,407
 COLLINS 299, 301
 COOPER, 181
 CONNOR, 39
 CLEGG, 405
 CREAM, 91
 CRONE, 422
- DALEO, 61,63
 DALLNER, 56, 354
 DANKERT, 20
 DATA FOR BIOCHEMI-
 CAL RESEARCH, 376
 DAVIES, 389
 DEFRETIN, 234
 DE FERRARI, 382
 DEJMAL, 252
 DE LUCA, 216
 DIMTER, 49
 DUBOIS, 367
 DUKSIN, 341
 DUNPHY, 24
- ELSON, 368
 ENDO, 424
 ENGELMANN,255,256
 ERICSON, 98, 346
 EVANS, 65
- FAIRBANKS, 414
 FINAMORE, 428
 FINCHER, 287
 FISKE, 360
 FOLCH, 355
 FORSEE, 44,101,102,
 129,162,163,213,
 FOSTER, 309
 FRENCH, 420
 FRISCH, 345
- GARCIA, 359
 GAROFF, 342
 GAYLOR, 22
 GELLISSEN, 258
 GHALAMBOR, 171
 GLYNN, 304
 GODELAINE, 170
 GOLD, 85
 GOTTSCHALK, 5
 GOUGH, 29
 GRACE, 401
 GRANGE, 64
- HACKMAN, 239,240,315,
 425
 HARFORD, 108
 HASSID, 417
 HART, 331
 HEATH, 16
 HEIFETZ, 202
 HEMMING,14,112
 HENTSCHEL, 404
 HERNDON, 419
 HERSCOVICS, 172,69,110
 122,123,148
 HICKMAN. 330
 HINMAN, 99
 HIGASHI, 12,32
 HOPP, 324
 HOPWOOD, 155
 HOYLE, 398
 HSU, 199
 HUANG, 227
 HUBER, 413
 HUNT,L.A. 318
 HUNT, S. , 225
- JEANES, 383
 JEANLOZ, 113
 JOCHEN, 218
 JUNG, 57

- KANG, 332
 KATES, 395
 KATO, 274
 KAUSS, 35
 KEAN, 132
 KEENAN, 55, 133, 141
 KELLER, 357
 KENT, 243, 244, 245,
 246
 KIMURA, 312
 KODAMI, 273
 KOEPPE, 257
 KORNFELD, 222, 427
 KRAG, 207
 KRISHNAN, 242
 KRISMAN, 316, 372
 KUNKEL, 253
 KUO, 327, 339
- LAMPORT, 286
 LEAVITT, 343
 LEE, 226
 LEHLE, 337, 338, 80,
 97, 157, 160
 LELOIR, 3, 41, 138,
 167, 388
 LENNARZ, 18
 LETOUBLON, 87, 88, 89,
 90
 LEVY, 201
 LI, 307
 LINDAHL, 284
 LINDH, 247
 LIPKE, 198, 271, 310,
 311, 313, 408
 Lloyd, 340
 LOCKE, 298, 314
 LOHR, 373
 LOWRY, 364
 LUCAS, 43, 131, 208
 LUNDT, 412
- MADDRELL, 400
 MANKOWSKI, 119, 142,
 147
 MARKHAM, 394
 MARKS, 423
 MARSHALL, A. T., 235, 236
 MARSHALL, R. D., 282
- /
 MARTIN, 115
 MARTIN-BARRIENTOS, 151
 McEVOY, 154
 McFARLANE, 278
 McMURROUGH, 358
 McSWEENEY, 377
 MES, 385
 MERRITT, 221
 MILLER, 415
 MOLNAR, 165
 MOOKJELA, 166
 MORGAN, 378
 MOULE, 352
 MUIR, 402
 MUNICIO, 210, 421
 MUNN, 263, 262
 MYERS, 350
- NAKAJIMA, 289
 NAKAYAMA, 158
 NEVILLE, 308
 NEUBERGER, 283
 NISHIZAWA, 232
- OIE, 254
 OLIVER, 204, 205
 OSBORN, 15
- PALADINI, 387
 PALAMARCZYK, 79, 84,
 168
 PAN, M. L., 248
 PAN, S. C., 411
 PARODI, 45, 46, 139,
 140, 145, 146,
 150, 188, 291
 PATT, 176, 178
 PENNOCK, 50, 290
 PERKOWSKA, 272
 PEWSAR, 292
 PIGMAN, 223
 PLESS, 200, 206
 PONT LEZICA, 58, 100,
 137
 POPJACK, 351
 PORTER, 353
 PRATT, 353
- /
 PORATH, 375
 PRICE, 297
 PUCCI, 144
- QUESADA, 60, 135, 164
 180, 203
- REISSIG, 369, 370
 REUVERS, 159, 161, 333
 REYNOLDS, 317
 RICHARDS, 67, 111
 RILEY, 277
 ROBBINS, 13, 149, 319
 ROBERTS, 266
 RODEN, 224
 ROMERO, 197
 RONIN, 126, 323
 ROSEMAN, 228
 ROSSO, 217, 429
 ROYFIELD, 7
 ROUSER, 397
 ROWLAND, 27
 RUDALL, 237, 238
- SANTELLI, 296
 SASAK, 26, 294
 SCHACHTER, 229
 SCHNEIDER, E. G., 134
 SCHNEIDER, G., 344
 SCHER, 195
 SCHWARZ, 322
 SEFTON, 325
 SEKERIS, 265
 SENTANDREU, 74, 76
 SHARMA, 81
 SHARON, 4
 SIAKOTOS, 269
 SIEWERT, 334
 SINOHARA, 347, 348
 SISSAKIAN, 280
 SMITH, 103
 SOMOGYI, 365
 SPIRO, M. J., 192, 194
 SPIRO, R. G., 193, 230
 281, 393
 STANELONI, 212
 STACEWICZ, 215

/
STEINER, 392
STONE, 21, 396
STORM, 95
STROUT, 233
STRUCK, 179, 219
SUSHEELA, 403
SWEENEY, 418

TABAS, 320, 426
TABORA, 187, 190
TAKATSUKI, 326, 329, 335,
336
TANNER, 33, 75
TERENZI, 162
TETAS, 109
THOMAS, 259
TKACZ, 68, 121, 328
TOENNIES, 381
TOJO, 264
TREVELYAN, 379
TUCKER, 209
TUNG, 386
TURCO, 156, 211

UGALDE, 321

VAN DEN OORD, 409
VESSEY, 116, 118
VILLANUEVA, 83
VILLEMEZ, 34, 93

WAECHTER, 107, 42, 124, 152,
175
WALTON, 25
WARBURG, 363
WARREN, 70, 71, 72, 73, 182,
183, 184, 185, 186
WEDGWOOD, 59, 196
WEINER, 9
WHITHE, 127
WILSON, 275, 276
WINZLER, 366
WOLFE, L.S., 106
WOLFE, J., 267
WRIGHT, 10, 11, 17, 303
WYATT, 268

YDOYAGA, 191
YAMAZAKI, H., 231
YAMASAKI, K., 251

ZANDEE, 410
ZATZ, 36
ZATTA, 117, 153, 169, 189
ZINKEL, 293
ZWEIG, 371