

## Tesis de Posgrado

# Regulación de la biosíntesis de glicoproteínas en la corteza cerebral de rata

Alperín, Daniel Mario

1984

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Alperín, Daniel Mario. (1984). Regulación de la biosíntesis de glicoproteínas en la corteza cerebral de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1858\\_Alperin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1858_Alperin.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Alperín, Daniel Mario. "Regulación de la biosíntesis de glicoproteínas en la corteza cerebral de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1858\\_Alperin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1858_Alperin.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

TEMA DE TESIS  
**REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS**  
**EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATA**

AUTOR  
**DANIEL MARIO ALPERIN**

DIRECTOR DE TESIS: VICTOR P. IDOYAGA - VARGAS  
CO - DIRECTOR: HECTOR CARMINATTI

LUGAR DE TRABAJO  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS**  
**« FUNDACION CAMPOMAR »**

PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1984

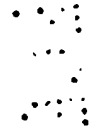
-I-

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS  
REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS  
EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATA

AUTOR  
DANIEL MARIO ALPERIN

DIRECTOR DE TESIS: VICTOR P. IDOYAGA-VARGAS  
CO-DIRECTOR: HECTOR CARMINATTI



LUGAR DE TRABAJO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS  
"FUNDACION CAMPOMAR"

PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1984

- 1858  
ej. 2

Deseo expresar mi gratitud a:

Mi familia.

Dres. Héctor Carminatti y Víctor P. Idoyaga.

Dr. Luis F. Leloir.

Dres. Carlos Cardini, Marcelo Dankert, Israel Algranati, Armando Parodi y José M. Olavarría.

Ing. Susana G. Rossi.

Sra. María D. Turró.

Lic. Norberto D. Iusem.

Sr. Alberto B. Meschini.

Dr. Alejandro A. Paladini (h).

Y a los demás profesores, compañeros y colaboradores del Instituto.

Por todos siento afecto, admiración y respeto.

-III-

Dedicada a:  
Natalia y Nicolás

CONTENIDO

	<u>Pág.</u>
Sección 1: <u>INTRODUCCION.</u>	1
Sección 2: <u>MATERIALES Y METODOS.</u>	16
2.1. Medios.	16
2.1.1. Medio de incubación.	16
2.1.2. Antibióticos.	16
2.1.3. Preparación de medios de incubación radioactivos.	17
2.2. Incubador de CO <sub>2</sub> .	17
2.3. Precursores radioactivos.	17
2.4. Compuestos radioactivos.	17
2.5. Mediciones de radioactividad.	18
2.5.1. Muestras acuosas.	18
2.5.2. Medición de manosa en el medio de incubación.	18
2.5.3. Muestras insolubles.	19
2.5.4. Radioactividad de lípido-azúcares intermediarios.	20
2.5.5. Detección de radioactividad en cromatogramas.	20
2.5.6. Detección de radioactividad en placas	

de sílica gel.	20
2.6. Mediciones enzimáticas.	20
2.6.1. Glucosa.	20
2.6.2. Determinación de la enzima dolicol-P-P-G <sub>3</sub> -oligosacárido: proteína oligosacaril trans- ferasa.	21
2.7. Solventes para cromatografía, electroforesis y otros procedimientos.	22
2.8. Determinación de proteínas.	23
2.9. Animales.	23
2.10. Obtención del encéfalo.	24
2.10.1. Obtención de la corteza cerebral.	24
2.10.2. Preparación del tejido.	24
2.10.3. Obtención del particulado de corteza cerebral.	25
2.11. Siembra e incubación del particulado de corteza cerebral.	26
2.12. Detención de la incubación y remoción del medio.	28
2.13. "Chase" de incubaciones.	30
2.14. Material portador (carrier).	32
2.15. Caracterización de productos.	32
2.15.1. Labilidad de tritio unido a	

proteína a la proteólisis.	32
2.15.2. Composición de azúcares de los oligosacáridos marcados con $^3\text{H}$ a partir de Man-2 $^3\text{H}$ .	35
2.15.3. Cromatografía de productos de proteólisis ácido lábiles.	36
2.15.4. Tratamiento con álcali suave.	36
2.15.5. Obtención de oligosacáridos a partir de lípido-oligosacáridos intermediarios.	38
2.15.6. Cromatografía de oligosacáridos.	39
2.16. Cromatografía sobre sílica gel en placa delgada (TLC).	39
2.17. Mediciones de temperatura superficial.	40
2.18. Calentamiento de placas para revelado térmico.	40
2.19. Observación de papeles y placas al UV.	40
2.20. Mediciones de fluorescencia.	41
Sección 3: <u>RESULTADOS</u>	42
3.1. Características del particulado de corteza cerebral.	42
3.2. Medición de actividad enzimática que actúa	



sobre glucosa en el medio durante la incubación.	45
3.3. Evaporación del medio de incubación.	46
3.4. Concentración de glucosa en el medio durante la incubación.	47
3.5. Concentración de manosa en el medio durante la incubación.	52
3.6. Utilización de manosa-2 <sup>3</sup> H en presencia de glucosa.	54
3.7. Oferta de manosa-2 <sup>3</sup> H en presencia de una concentración muy baja de glucosa.	56
3.8. Desaparición de azúcares con oferta de concentraciones iguales de glucosa y manosa.	58
3.9. Optimización de la incorporación de tritio a la proteína a partir de Man-2 <sup>3</sup> H en función de la cantidad de proteína incubada.	60
3.10. Incorporación de tritio a proteína a partir de Leu-4,5 <sup>3</sup> H.	62
3.11. Evaluación de la actividad específica de precursores.	64
3.11.1. Aumento de la incorporación de tritio en proteínas como función	

de la oferta de Man-2 <sup>3</sup> H en presencia de glucosa.	64
3.11.2. Variación de la incorporación de tritio en proteínas como función de la oferta de Man-2 <sup>3</sup> H de diferente actividad específica en ausencia de glucosa.	65
3.11.3. Incorporación de manosa- <sup>14</sup> C a glicoproteínas en presencia de glucosa.	69
3.12. Cinética de incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2 <sup>3</sup> H en función de la oferta de azúcares en el medio de incubación.	70
3.13. Experimentos de "pulso" de marcación y "chase" a partir de Man-2 <sup>3</sup> H.	74
3.14. Caracterización de productos.	75
3.15. Cinética de la glicosilación de proteínas durante el desarrollo de la corteza cerebral de la rata.	77
3.16. Parámetros cuantitativos de la vía de marcación de glicoproteínas a partir de Man-2 <sup>3</sup> H en presencia de concentración fisiológica de glucosa.	81

3.17. Efecto de la estreptomicina sobre la cinética de incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2 <sup>3</sup> H en la corteza cerebral de rata inmadura.	83
3.18. Utilización de glucosa y Man-2 <sup>3</sup> H del medio de incubación durante los ensayos del efecto de la estreptomicina.	85
3.19. Efecto de la estreptomicina sobre la incorporación de Leu-4,5 <sup>3</sup> H a proteína en la corteza cerebral de rata de 5 días.	87
3.20. Medición de lípido-azúcares intermediarios del camino del dolicol, durante la incubación de corteza cerebral de rata de 5 días con estreptomicina.	89
3.21. Efecto de la Sm sobre la actividad de la enzima dolicol-P-P-G <sub>3</sub> -oligosacárido: proteína oligosacaril transferasa.	91
3.22. Detección de algunos compuestos orgánicos por tratamiento térmico en papel.	94
3.23. Sensibilidad de detección sobre papel.	96
3.24. Recuperación de compuestos de cromatogramas en papel.	98
3.25. El rol del adsorbente en la generación de compuestos fluorescentes.	101

3.26. Detección diferencial de azúcares en TLC.	103
3.27. Sensibilidad de detección para carbohidratos en TLC.	107
3.28. Recuperación de glucosamina- <sup>3</sup> H y de manosa- <sup>14</sup> C luego de la detección térmica-UV en TLC.	107
3.29. Desarrollo de colores fluorescentes luego del tratamiento térmico.	108
3.30. Solubilización del material fluorescente.	110
3.31. Estabilidad de los compuestos fluorescentes.	111
3.32. Espectro de emisión de fluorescencia.	113
Sección 4: <u>DISCUSION</u>	116
4.1. Requerimientos generales del tejido nervioso central.	116
4.2. Intercambio de metabolitos.	117
4.3. Sobrevida del tejido.	121
4.4. Necesidad de azúcares.	122
4.5. Cantidad de proteína incubada.	124
4.6. Utilización de precursores.	124
4.7. Caracterización de productos.	128
4.8. Efecto de variaciones en la oferta de	

azúcares en el medio.	129
4.9. Permanencia de la marca en el producto.	132
4.10. Cuantificación de la biosíntesis de glicoproteínas en estado estacionario de marcación.	133
4.11. Comparación con otros procedimientos.	138
4.12. Efecto de la estreptomicina.	139
4.13. El método de detección térmico-UV.	141
4.14. Recuperación de compuestos detectados.	142
4.15. Detección diferencial de carbohidratos.	144
4.16. Sensibilidad en TLC.	145
4.17. Derivados fluorescentes solubles.	147
Sección 5: <u>REFERENCIAS</u>	149
Sección 6: <u>ABREVIATURAS</u>	160

## 1. INTRODUCCION

Durante la última década se han incrementado los estudios destinados a esclarecer el rol de las cadenas de oligosacáridos de las glicoproteínas (GP) y la regulación de su biosíntesis (1).

El sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos posee dos tipos de GP, las O-glicosídicas y, mayoritariamente, las N-glicosídicas. Alrededor del 95% de las GP del SNC son del tipo N-Asp, lo que convierte al tejido nervioso central en un buen modelo experimental para estudiar esa clase de GP a diferencia de otros tejidos (2).

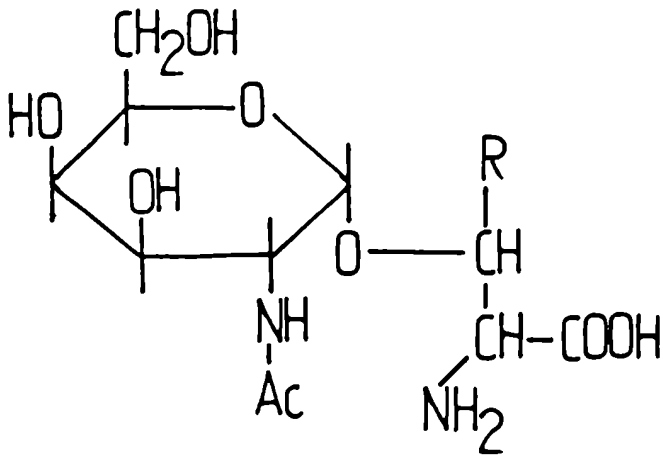
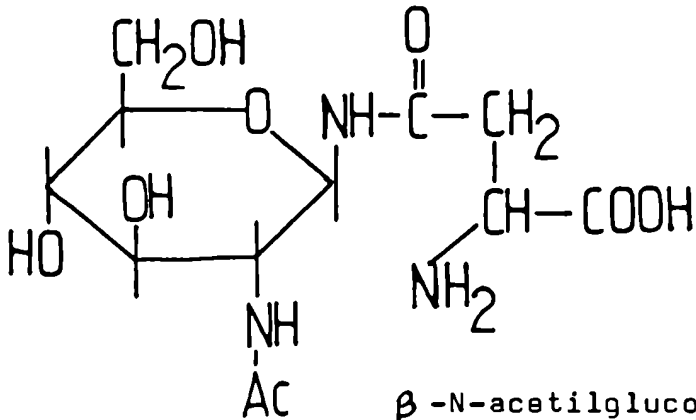
Los grupos mencionados de GP difieren en el tipo de unión azúcar-aminoácido, la clase de aminoácido, la secuencia de los azúcares y las vías biosintéticas (3). En la figura 1 se indican las estructuras básicas de las GP mencionadas.

La biosíntesis de GP está catalizada por glicosiltransferasas, enzimas que tienen la propiedad de transferir azúcares a partir de los nucleótidos respectivos (ej.: UDP-Glu) a los aceptores apropiados (4).

La biosíntesis de las GP de tipo O-glicosídicas parece ser un proceso más sencillo que las de tipo N-glicosídicas,

Figura 1 : principales características de las glicoproteínas de tipo N y O glicosídicas.

N-glicosídicas.

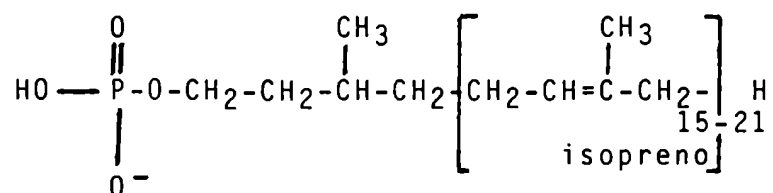


O-glicosídicas.

$\alpha$ -N-acetilgalactosaminil-serina/treonina.

ya que tendría lugar para las primeras por la adición directa y secuencial de monosacáridos (a partir de los respectivos nucleótidos) a los polipéptidos nacientes (5).

La biosíntesis de GP de tipo N-Asp es más compleja. La primera etapa tiene lugar por transferencia a partir del nucleótido respectivo de N-acetilglucosamina a un lípido aceptor, el dolicol monofosfato (1,6):

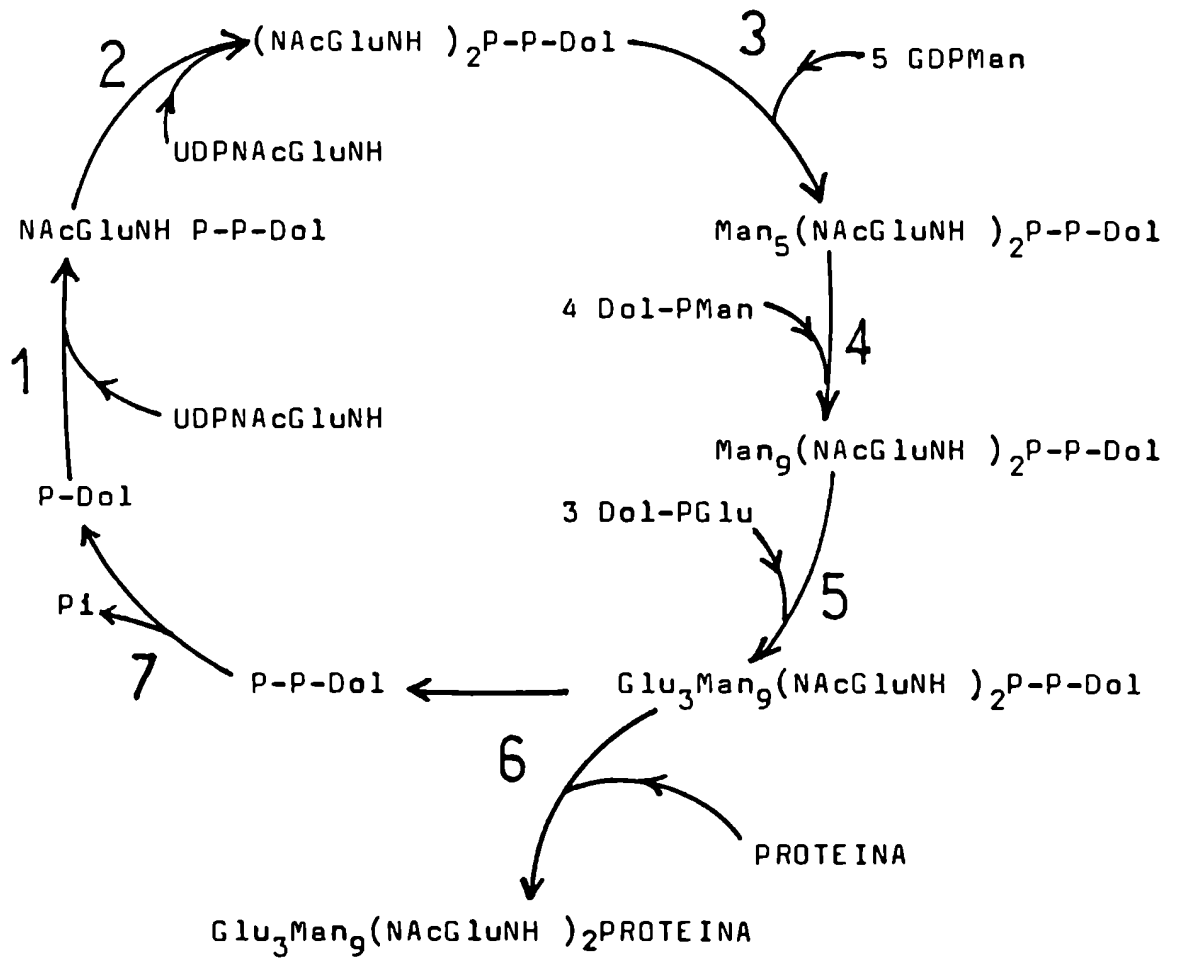


Sobre este lípido tienen lugar las sucesivas adiciones de azúcares y el proceso es común para la síntesis de todas las GP de tipo N-Asp. Cada paso se encuentra catalizado por una transferasa específica (7) como se indica en la figura 2.

Al camino metabólico indicado en la figura 2 se lo conoce como el ciclo del dolicol, a pesar de que no existe evidencia directa de que el Dol-P-P liberado en el paso 6 (Fig. 2) sea reutilizado en la etapa 1 del mismo ciclo (7). La transferencia del oligosacárido a la proteína "en bloque"



Figura 2: el camino metabólico del dolicol.



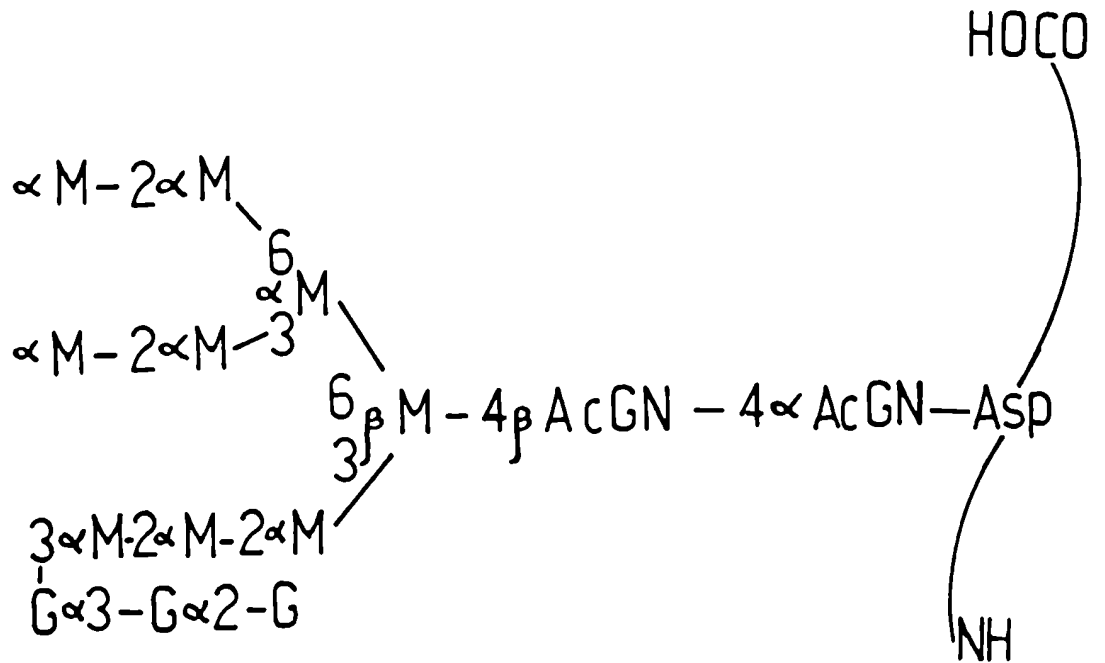
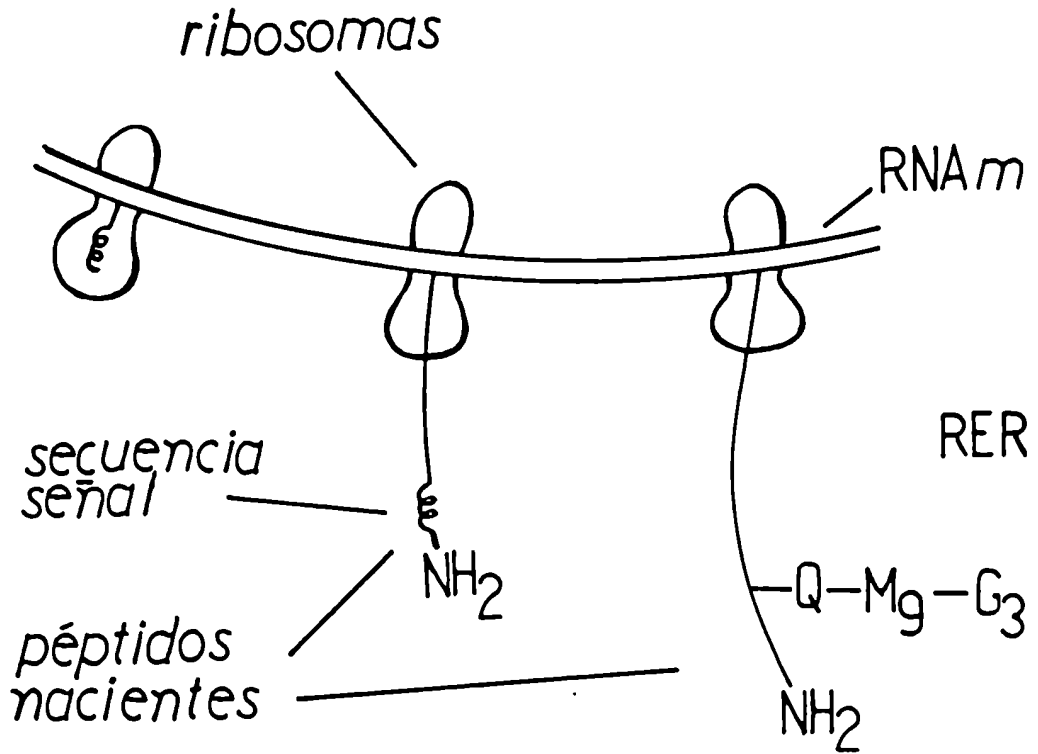
Los números identifican etapas del ciclo. Ver texto para más detalles.

(paso 6, Fig. 2) tiene lugar cotraduccionalmente en el retículo endoplásmico rugoso (RER, Fig. 3), (8).

Al completarse la proteína-oligosacárido:  $\text{Glu}_3\text{-Man}_9\text{-(NACgluNH)}_2\text{-Asp}$ , la glicoproteína prosigue al retículo endoplásmico liso y luego al complejo de Golgi, donde tienen lugar el corte y adición de azúcares que finalmente constituirían los dos grupos de GP de tipo N-Asp, las de alta manosa y las complejas (9). Las diferencias biosintéticas y estructurales pueden apreciarse en la figura 4a. Finalmente, las glicoproteínas terminadas pueden permanecer en regiones citoplasmáticas definidas, secretarse o formar parte de la membrana celular (1). Esta última situación se ilustra en la figura 4b.

En un intento para resumir los hallazgos referidos al camino del dolicol puede decirse:

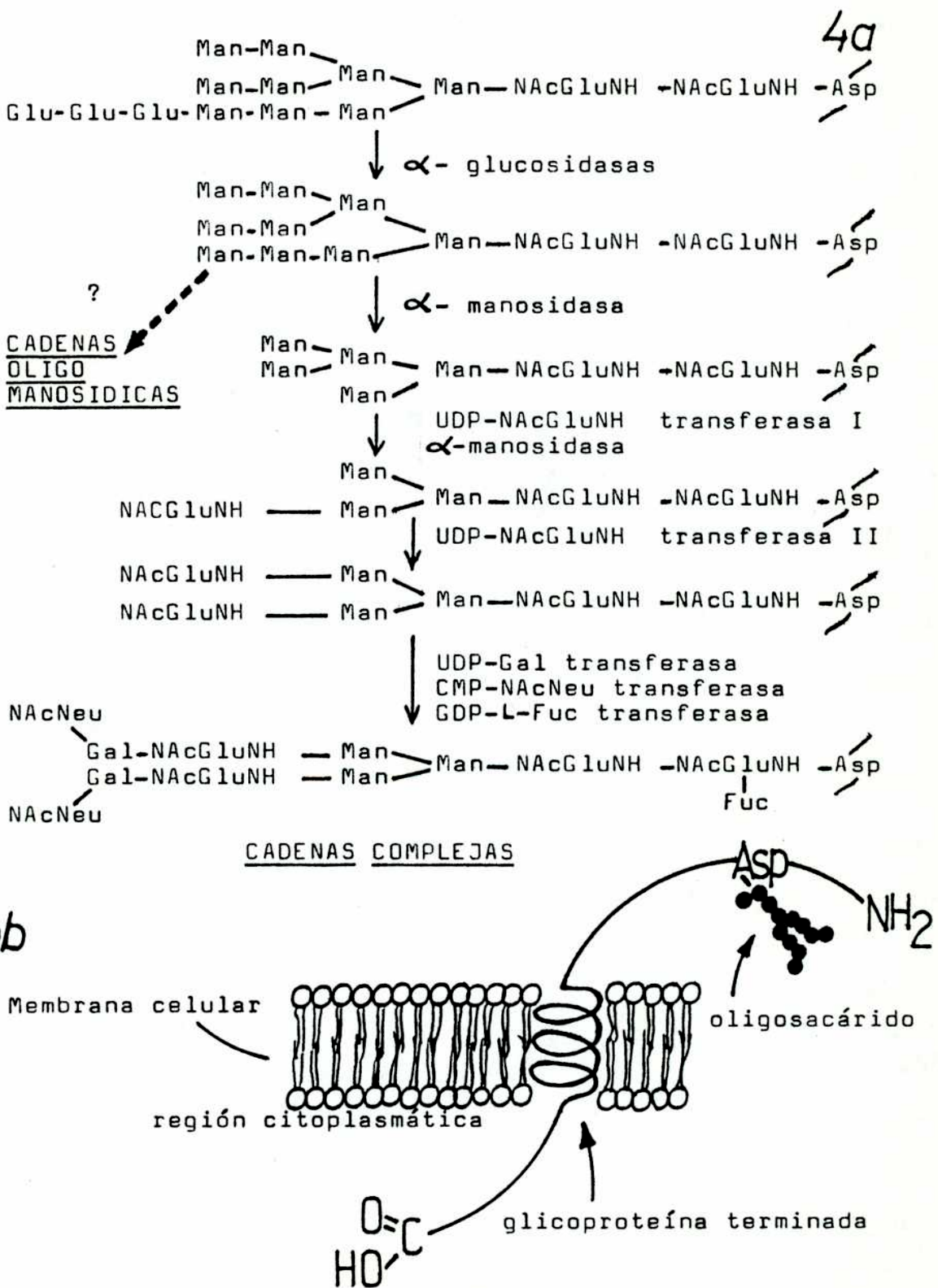
1. Las principales secciones de las estructuras oligomanosídicas y lactosaminídicas están altamente conservadas.
2. La N-glicosilación de una proteína es un fenómeno cotraducciona l o un evento precoz post-traducciona l (7).
3. Con la N-glicosilación el oligosacárido complejo que configura el "core" está disponible para la proteína, sea para cumplir una función inmediata o para ser modificado rápidamente y resultar funcional.



**Figura 3:** transferencia cotraduccional del oligosacárido a la proteína.

M: manosa. G: glucosa y AcGN: N-acetil glucosamina.  
Q: N,N'-diacetil quitobiosa.  
RER: retículo endoplásmico rugoso.

Figura 4: corte y adición de azúcares luego de la transferencia del oligosacárido a la proteína.



Una de las grandes dificultades para estudiar in vivo la biosíntesis de las GP en el SNC es marcar eficientemente con precursores radioactivos apropiados a las GP (10). Por esta razón, y principalmente con fines cualitativos, muchos experimentadores debieron emplear el animal entero, con las consiguientes dificultades en el mantenimiento de niveles constantes de radioactividad, altas dosis requeridas y transformación metabólica sistémica de los precursores administrados (11).

Tanto en general como para el SNC en particular, las características cinéticas de la glicosilación de proteínas han sido poco estudiadas hasta ahora. Para desarrollar estos estudios en explantos de tejido incubados in vitro, deben establecerse condiciones más estrictas que las empleadas usualmente para la marcación de GP destinadas al análisis estructural. Estas condiciones se irán exponiendo en detalle durante el desarrollo del tema, pero puede adelantarse que, en el SNC, deben satisfacerse requerimientos esenciales para la actividad biosintética del tejido y el correcto intercambio de metabolitos. Simultáneamente, debe lograrse un estado estacionario de marcación a partir de un precursor radioactivo con gran especificidad para las GP cuya cinética de biosíntesis se quiere determinar, y con una eficiencia en la marcación suficientemente alta como para permitir un gran

número de mediciones sin emplear cantidades extremadamente altas del precursor radioactivo (por ejemplo: 10 mCi por determinación), para lo cual resulta necesario el empleo de micrométodos de incubación. Finalmente, la integridad del tejido desde el punto de vista de las relaciones anatómicas entre células de la glía y neuronas, debería estar preservada. Estas condiciones han sido, hasta ahora, limitantes para el estudio de biosíntesis de GP del SNC, y por esta razón la mayor parte de los datos de los que se dispone, especialmente para GP de tipo N-glicosídicas, provienen del análisis de productos fríos acumulados (10).

Aquí se presenta un micrométodo de incubación de partículas de corteza cerebral de rata que resuelve muchas de las limitaciones encontradas anteriormente. Básicamente, se ha logrado incorporar  $^3\text{H}$  a partir de Man-2  $^3\text{H}$  a proteínas en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa. Para lograrlo se emplearon pequeñas cantidades del precursor radioactivo (5-10 uCi) junto con unas 700 veces más (en masa) de glucosa no marcada.

Con la metodología desarrollada puede obtenerse un estado estacionario de marcación con niveles adecuados de oferta del precursor radioactivo, provisión de energía, funcionalidad del tejido por lo menos por 3 horas, fuente de C no limitante y muy alta reproducibilidad de resultados. Asi-

mismo pudieron establecerse los parámetros cuantitativos de la vía metabólica por la cual pequeñas cantidades de manosa del medio pueden ingresar a GP aún en presencia de altas concentraciones de glucosa y el posible rol de la hexoquinasa I en la utilización de glucosa y manosa.

Debe destacarse que al emplear sólo el precursor radioactivo Man-2  $^3\text{H}$  y piruvato para suplir la demanda de energía, subsiste aún la posibilidad de ayuno de azúcares (12, 13, 14). En el caso del SNC in situ, la situación es mucho más compleja porque solamente glucosa o manosa pueden ser directamente utilizados como fuente de energía y de C (15). En esta tesis pudo demostrarse la necesidad absoluta de niveles fisiológicos de glucosa y de una apropiada relación proteína incubada/volumen de medio, para la obtención de cinéticas de incorporación lineales de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de Man-2  $^3\text{H}$ .

La gran semejanza de las partículas obtenidas y el pequeño tamaño ( $d_{\text{min}} = 50 \text{ um}$ ) contribuyen a obtener datos representativos del tejido y a la gran reproducibilidad de resultados. Adicionalmente, la influencia del fenómeno de difusión de nutrientes en cortes de SNC (16) se ha podido superar en base a la reducción del tamaño del particulado. El rápido procedimiento de obtención de tejido nervioso descrito en esta tesis, permitiría reducir a un mínimo sino

eliminar los efectos deletereos de la falta de O<sub>2</sub> y glucosa (17).

Los resultados obtenidos permiten evaluar características básicas de la glicosilación de proteínas en el SNC tales como: tipo y proporción de glicoproteínas que se biosintetizan, composición en algunos azúcares, influencia del procesamiento y recambio sobre el producto acumulado. Estos mismos parámetros pueden observarse en función de la edad y de alteraciones inducidas, por ejemplo, por ausencia de nutrientes y antibióticos. La necesidad de satisfacer las condiciones establecidas para la incubación de corteza cerebral es analizada en relación con los procedimientos corrientes para otros tejidos. Con la metodología desarrollada en esta tesis sería posible estimar la velocidad absoluta de biosíntesis de GP.

La regulación del ciclo del dolicol ha sido estudiada en los últimos años actuando sobre él a través de diversos compuestos. Por lo general estos estudios se han efectuado inhibiendo el camino del dolicol en forma directa e indirecta. En el primer caso, prácticamente la tunicamicina ha sido la única herramienta efectiva (18). Este antibiótico derivado de una línea de Streptomyces lysosuperficus, tiene la propiedad de inhibir la primera reacción del camino del dolicol (Fig. 2, etapa 1).



Esta inhibición se produce tanto in vivo como in vitro (19,20). La incorporación de aminoácidos a proteínas cuando la síntesis de oligosacáridos se encuentra bloqueada por la tunicamicina puede estar inalterada o muy afectada, de acuerdo con la dosis y con el organismo estudiado (21), y en algunos casos se produce inhibición del transporte de nucleótido-azúcar (22).

Una de las formas indirectas de modular el camino del dolicol se basa en frenar la síntesis de aceptor proteico, por ejemplo con cicloheximida o actinomicina D (23) y estudiar los cambios en algunos de los lípido-oligosacáridos del ciclo del dolicol. Las observaciones parecen señalar una gran dependencia entre la disponibilidad de aceptor proteico y utilización de los intermediarios, así como una detención en la reiniciación del ciclo cuando no hay aceptor proteico disponible, aún en presencia de DMP (24).

Otras formas indirectas de interferir el ciclo del dolicol consisten en la administración de metabolitos como la 2-deoxiglucosa y 2-F-deoximanosa, cuya finalidad es producir los respectivos nucleótido-azúcares y lípido-oligosacáridos que en algún momento no son bien reconocidos por las transferasas específicas (25). Las grandes dosis necesarias para conseguir estos efectos (semejantes en concentración a las de los nutrientes normales), y la toxicidad de estos com-

puestos restan valor a su empleo.

Adicionalmente se han intentado: ayuno de azúcares (26) e inclusión de desacopladores de la fosforilación oxidativa (27).

En los estudios realizados para la presente tesis se ha podido establecer el efecto de la estreptomicina, sobre la cinética de biosíntesis de GP de tipo asparragina en el SNC inmaduro. La estreptomicina es bien tolerada por los mamíferos en las condiciones habituales, con excepción de daños al nervio auditivo y óptico (28). La estreptomicina tiene un extenso uso en química humana, pero se desconoce el mecanismo de toxicidad para el tejido nervioso, que parece ser el único afectado por la droga (29).

A diferencia de los inhibidores de glicosilación descritos más arriba, se encontró que la estreptomicina bloquea la transferencia del oligosacárido a la proteína en la etapa final del ciclo del dolicol (Fig. 2, paso 6). Esto tendría lugar con escasa interferencia de la síntesis proteica en correspondencia con la particularidad de que la estreptomicina no se une a polirribosomas de eucariotes (30), razón por la que resulta poco tóxica para los mamíferos.

Por otro lado, para los estudios de composición de las glicoproteínas descritas en esta tesis, se ha desarrollado

un método de detección de compuestos orgánicos en cromatogramas que combina inducción de fluorescencia por calentamiento y visualización en el ultravioleta (366 nm). Las ventajas de este procedimiento, que se enumeran a continuación, dieron lugar a un estudio más completo de la técnica utilizada.

La mayoría de los métodos empleados para detectar compuestos sobre papel después de cromatografía o electroforesis implican tratar el papel con diferentes soluciones. En estos casos, se logra una coloración como resultado de propiedades específicas de estas sustancias. Un aspecto importante de los métodos antes mencionados que no estaba resuelto es el de la recuperación cuantitativa de sustancias radioactivas y la preservación de las propiedades químicas después de la detección.

La combinación de detección térmica-ultravioleta tiene una sensibilidad del orden de nanomoles para el caso de muchas sustancias. Los altos grados de recuperación de compuestos radioactivos y la preservación de las propiedades químicas y cromatográficas de los mismos después de la cromatografía y de la detección térmica ultravioleta son resultados importantes en relación con el análisis de una gran cantidad de sustancias orgánicas (31).

En adición a la detección y recuperación de compuestos,

ha podido obtenerse un patrón característico de temperaturas de detección para distintos carbohidratos, así como colores fluorescentes diferentes que acompañan pequeños cambios estructurales (32). En relación con esto último, se ha logrado solubilizar los compuestos fluorescentes derivados de glucosa y glucosamina, y se han obtenido espectros muy definidos de emisión de fluorescencia para estas sustancias (33).

Finalmente, se discute el mecanismo de producción de esta nueva familia de compuestos fluorescentes, sus propiedades y aplicaciones.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Medios.

Para los diversos procedimientos relacionados con las incubaciones se empleó medio mínimo esencial de Eagle - MEM - (Cat. #410-1100 - Gibco Co.) suplementado con 2,2 g/l de  $\text{NaHCO}_3$  (para lograr un pH de 7,4 en atmósfera de aire con 5%  $\text{CO}_2$  a 37°C), 5% de suero fetal bovino (Gibco Co.) y glutamina para una concentración final de 2 mM.

#### 2.1.1. Medio de incubación.

En todos los casos el medio empleado se expuso al menos por 2 horas antes del uso a 37°C en un incubador de  $\text{CO}_2$ . En algunos casos se le adicionaron o quitaron precursores y compuestos, lo que será indicado cuando corresponda.

#### 2.1.2. Antibióticos.

En algunos casos se empleó sulfato de estreptomicina (Lepetit S.A.) a diferentes concentraciones. La droga se disolvió en agua en el momento de uso y una alícuota de 50-100  $\mu\text{l}$  se agregó a 10 ml del medio de incubación para lograr una concentración final de 50 ó 100  $\mu\text{g/ml}$ . Este medio se empleó en todos los pasos relacionados con los experimentos en que se utiliza el antibiótico.

### 2.1.3. Preparación de medios de incubación radioactivos.

Puesto que la mayoría de los precursores radioactivos son provistos en solución etanólica, la cantidad necesaria de éstos fue evaporada en tubos cónicos, con aire a 37°C. A continuación se agregó el medio de incubación, se agitó intensamente y se colocó en el incubador de CO<sub>2</sub> hasta el momento del uso.

### 2.2. Incubador de CO<sub>2</sub>.

Se empleó un equipo Forma Sci., a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado para evitar la evaporación de los líquidos de incubación.

### 2.3. Precursores radioactivos.

Se emplearon (2-<sup>3</sup>H)Man (24 Ci/mmol); (U-<sup>14</sup>C)Glu (285 Ci/mol); (4,5-<sup>3</sup>H)Leu (40 Ci/mmol); (U-<sup>14</sup>C)Lis (300 Ci/mol), (6-<sup>3</sup>H)glucosamina (10 Ci/mmol) y (U-<sup>14</sup>C)Man (214 Ci/mol) de New England Nuclear.

### 2.4. Compuestos radioactivos.

De nuestro laboratorio se utilizaron oligosacáridos: (NAcGluNH)<sub>2</sub>ManGlu\*<sub>1-2-3</sub> con glucosa-<sup>14</sup>C, obtenidos enzimáticamente in vitro (34).

## 2.5. Mediciones de radioactividad.

### 2.5.1. Muestras acuosas.

Las muestras provenientes del medio de incubación, con excepción de las que contienen Man-2  $^3\text{H}$ , diluciones del producto radioactivo original, eluciones, etc., se colocaron en un vial para centelleo líquido, se agregó luego 1 ml de agua, se agitó y finalmente se añadieron 9 ml de líquido centellador de Bray (35). En todos los casos el conteo de radioactividad por centelleo líquido se efectuó en un espectrómetro Beckman modelo 8100. Las conversiones cpm a dpm se efectuaron con estándares apropiados (New England Nuclear).

### 2.5.2. Medición de manosa en el medio de incubación.

Cuando se incubaba tejido nervioso con manosa, la medición de la desaparición de manosa del medio de incubación se determinó por la desaparición de la radioactividad de Man-2  $^3\text{H}$ . A los tiempos que corresponde se retiró una alícuota del medio y se procesó para medir radioactividad. En este caso la medición se efectuó adicionando a la alícuota a medir 0,5 ml de HCl 2 N y secando bajo corriente de aire caliente. Luego se prosigue como se indicó para muestras acuosas. Este procedimiento se efectuó así para eliminar el  $^3\text{H}_2\text{O}$  y  $^3\text{HCO}_3^-$  generados por la metabolización de la Man-2  $^3\text{H}$ . La

disminución de radioactividad se relacionó con la desaparición de la manosa no marcada empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Manosa consumida} = M - \frac{\text{cuentas recuperadas} \times M}{\text{cuentas iniciales}}$$

siendo M la masa de manosa presente inicialmente en el medio.

### 2.5.3. Muestras insolubles.

La proteína incubada lavada se disolvió con NCS (Amersham Co.) 0,2 ml a 60°C y agitación intermitente durante 1 hora. El digerido se transfirió cuantitativamente con líquido centellador en base a tolueno-PP0 (2,5 difeniloxazol) a un vial de centelleo líquido y se neutralizó el álcali del solubilizador de tejidos (NCS) con 15 ul de ácido acético glacial (Merck). Las muestras se leyeron a los 30 min y el conteo se verificó luego de 12 horas en la oscuridad a 4°C.

La radioactividad de compuestos en papeles de cromatografía se midió por centelleo líquido en tolueno-PP0.



#### 2.5.4. Radioactividad de lípido-azúcares intermediarios.

Ya sea en solución o en cromatogramas, los lipido-azúcares se llevaron a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> a 37°C en un vial para centelleo líquido, se agregó tolueno-PP0, y se midió la radioactividad.

#### 2.5.5. Detección de radioactividad en cromatogramas.

Luego de una cromatografía de productos marcados con <sup>14</sup>C, las tiras de papel se analizaron para radioactividad con un medidor-registrador de barrido Packard modelo 7200.

#### 2.5.6. Detección de radioactividad en placas de sílica gel.

Cuando se realizaron corridas cromatográficas en sílica gel, las zonas que contienen radioactividad se rasparon sobre laminado de aluminio y se transfirieron a viales de vidrio. Con muestras hidrosolubles se agitó con 1 ml de agua y 9 ml de líquido de Bray. En los demás casos se empleó 10 ml de tolueno-PP0.

### 2.6. Mediciones enzimáticas.

#### 2.6.1. Glucosa.

La glucosa de los medios de incubación se determinó colocando alícuotas de 5-20 ul del medio de incubación homogeneizado previamente con aire, en un tubo al que se agregó un reactivo comercial en base a glucosa-oxidasa (Boehringer Mannheim, GmbH). Como blanco se empleó medio de incubación

libre de glucosa y de suero fetal bovino (FCS); y como estándares, diluciones de un medio de incubación de concentración original 1 g/l de glucosa, verificada con un estándar acuoso de igual concentración. Los medios de incubación no generaron turbidez ni precipitados con el reactivo empleado.

La discriminación de manosa a 1 g/l es total en las condiciones ensayadas, ya que no se produjo color apreciable con este azúcar.

#### 2.6.2. Determinación de la enzima dolicol-P-P-G<sub>3</sub>-oligosacárido: proteína oligosacaril transferasa.

Como fuente de enzima se utilizó la fracción microsomal (100.000 x g) de corteza cerebral de rata de 5 días, como se describe en la literatura (36). El material sedimentado se diluyó a una concentración final de proteínas de 27 mg/ml en sacarosa 0,25 M, y así se empleó en las incubaciones.

Como sustrato se utilizó G<sub>3</sub>-oligosacárido-P-P-Dol obtenido de incubaciones previas de UDP-Glu-<sup>14</sup>C con microsomas de hígado de rata (37). La radioactividad del sustrato corresponde al 50% de la recuperada en la fracción soluble a cloroformo/metanol/agua (1:1:0,3), lo que se determinó luego de hidrólisis y cromatografía empleando técnicas establecidas (9).

Cada tubo de reacción contenía los siguientes compuestos: 5 umoles de buffer Tris-maleato, pH 7,8; 5 umoles de mercaptoetanol; 0,5 umoles de  $MnCl_2$ ; 0,3 a 1,2 mg de Tritón X-100; 1,5 mg de proteína microsomal, 3.000 cpm de substrato ( $G_3$ -oligosacárido-PP-Dol) y agua para un volumen final de 80 ul.

En los casos en los que se empleó sulfato de estreptomina (Sm), el antibiótico se agregó para una concentración de 50 ug/mg de proteína incubada en el mismo volumen final. Las incubaciones se efectuaron a 30°C y se detuvieron por agregado de TCA al 10%, que se calentó a 90°C durante 15 minutos. La proteína se lavó como se indica en el Esquema I y se procesó para contar radioactividad. Un blanco fue realizado en cada caso y restado de las demás determinaciones.

#### 2.7. Solventes para cromatografía, electroforesis y otros procedimientos.

En las diferentes cromatografías, electroforesis y otros procedimientos se emplearon los siguientes sistemas de solventes:

A: n-butanol-piridina-agua (6:4:3).

B: n-butanol-piridina-agua (4:3:4).

C: isopropanol-ácido acético-agua (27:4:9).

- D: 95% etanol-1 M acetato de amonio/buffer ácido (pH 3.8) (7,5:3).
- E: 5% ácido fórmico.
- F: piridina-n-butanol-ácido acético-agua (105:70:21:84).
- G: 1-propanol-nitrometano-agua (5:2:4).
- H: cloroformo-metanol-agua (1:1:0,3).

### 2.8. Determinación de proteínas.

Las determinaciones de proteínas se efectuaron por el método de Lowry et al. (38), empleando como estándar una solución de 1 mg/ml de albúmina bovina cristalizada y liofilizada (Sigma Chem. Co.).

### 2.9. Animales.

Ratas Wistar de ambos sexos con edades comprendidas entre -3 y 30 días fueron obtenidas del Instituto de Biología y Medicina Experimental (Buenos Aires). Los animales fueron criados con dietas comerciales y agua ad libitum, a una temperatura promedio de 22°C y con un ciclo de luz entre las 8.00 y 18.00 horas.

Al comienzo de un experimento los animales fueron sacrificados dentro de las dos horas de haber sido retirados del criadero. En el caso de embriones, la edad fue estimada de acuerdo con criterios morfológicos previamente descriptos

(39).

#### 2.10. Obtención del encéfalo.

Se practicó una decapitación rápida por medio de tijera para los animales de menor edad y de guillotina para los mayores.

El encéfalo fue removido del calvarium sin lesionar el tejido, se retrajeron las meninges, se lavó con medio de incubación, y el cerebro se depositó sobre papel de filtro embebido en el mismo medio. Con práctica, el material se encuentra listo para la disección de la corteza cerebral en unos 30 segundos.

##### 2.10.1. Obtención de la corteza cerebral.

Una vez colocado el encéfalo sobre papel de filtro se procedió a descartar la región hipotalámica, tronco encefálico, cerebelo, bulbos olfatorios y pedúnculos olfatorios. De esta manera se obtuvo la corteza cerebral delimitada como se menciona en la literatura (40,41).

##### 2.10.2. Preparación del tejido.

La corteza cerebral embebida en medio de incubación se cortó rápidamente en pequeños trozos (0,5-1 mm) con ayuda de una hoja de afeitar. El tejido disgregado se transfirió de inmediato a un tubo cónico de 10 ml (Falcon Plastics Inc.) que contenía ese volumen del medio mencionado. Hasta

el final de esta etapa transcurrió alrededor de 1 min desde la decapitación del animal.

### 2.10.3. Obtención del particulado de corteza cerebral.

El material obtenido en el paso anterior fue aspirado y expelido con rapidez empleando una pipeta Pasteur de 1 mm di. El procedimiento se repitió unas 10 veces para cortezas cerebrales de 15 días y hasta 20 veces para las de mayor edad. Esto se efectuó así debido a la disminución de laxitud del tejido al aumentar la edad.

El material particulado se dejó sedimentar durante 30 segundos y el sobrenadante se descartó.

El material sedimentado se sembró de inmediato en microcavidades para incubación, (Nunc, Dinamarca, 7 mm di x 12 mm h). El tiempo transcurrido desde la decapitación fue aproximadamente de 3 minutos.

En las preparaciones de partículas destinadas a una medición exacta de la desaparición de azúcares, el medio utilizado en todos los pasos de preparación fue de igual composición que el empleado en la incubación. En el caso de alta cantidad de Man-2 <sup>3</sup>H (10 uCi/50 ul), al finalizar la preparación de partículas el material sedimentado se lavó en un pequeño volumen del medio de incubación durante 30 segundos, se volvió a sedimentar a 1 x g y se siguió con el procedimiento habitual. Estos recaudos minimizan las

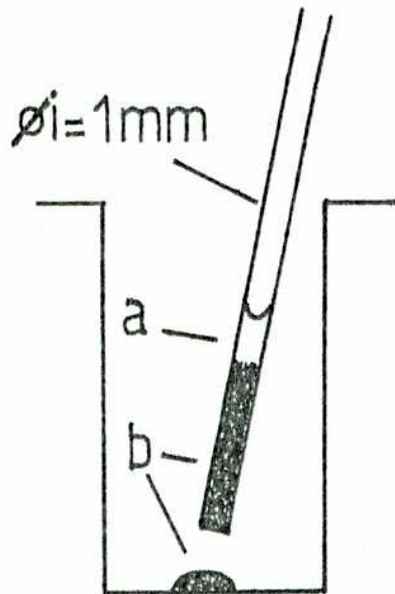
diferencias entre el espacio intersticial del tejido y el medio de incubación, evitando la dilución de este último cuando se incuban cantidades muy grandes de proteína (por ejemplo: 600 ug/cavidad).

#### 2.11. Siembra e incubación del particulado de corteza cerebral.

A continuación de la obtención del particulado se procedió a sembrar, con una pipeta Pasteur, unos 5 ul (150 ug de proteína) de partículas en el centro de una microcavidad, precalentada a 37°C. Esto se ilustra en la figura 5. A continuación se agregaron 50 ul del medio de incubación que corresponde y se resuspendieron las partículas con una suave vibración de la placa. Las partículas, que pueden apreciarse amplificadas en la figura 6, se distribuyen regularmente sobre el fondo de la cavidad, quedando cubiertas por el medio. Hasta ese momento transcurrieron alrededor de 3,5 min desde la decapitación. A partir del agregado del medio se cronometró el tiempo de incubación.

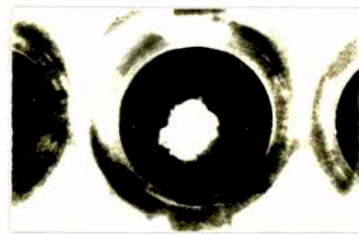
La placa se colocó de inmediato en el incubador de CO<sub>2</sub> y se retiró cada 15 min para agitación y/o a los tiempos que corresponde para detener la incubación.

Figura 5: procedimiento de siembra del particulado de corteza cerebral de rata.



El material particulado previamente sedimentado a 1 x g, se resedimenta en la pipeta de siembra para reducir el volumen del medio de incubación (a) que embebe a las partículas (b). Izquierda: vista lateral de una microcavidad a escala.

La fotografía muestra una vista superior de una microcavidad con el particulado sembrado en el centro (x3).







2.12. Detención de la incubación y remoción del medio.

a) Las incubaciones destinadas a obtener la proteína se detuvieron por el agregado de 2 ml de solución salina de fosfatos (PBS) a pH 7.4 enfriada a 0°C. Los tiempos cero de incubación se obtuvieron de igual manera, pero a partir de material incubado sin la marca y agregando luego el compuesto radioactivo al PBS. El material se resuspendió, se transfirió a un tubo apropiado y se centrifugó a 3500 rpm por 30 segundos. El sobrenadante que contenía la mayor parte del medio de incubación se descartó y el pellet se sonicó a 20 W con 1 ml de agua a 0°C en baño de hielo por 30 segundos (Branson Sonic). Una alícuota fue entonces obtenida para la determinación de proteínas. Al resto del sonicado se le agregó ácido tricloroacético (TCA) para lograr una concentración final del 10%. Se añadieron 50 ul de portador inactivado (10 mg P/ml) y se sonicó nuevamente. Los tubos se calentaron a 90°C por 15 min en baño de agua para lograr la hidrólisis de lípidos intermediarios y acrecentar la coagulación. A continuación se procedió al lavado del material como se indica en el esquema I. En el paso de sonicación con agua se incluyó al principio fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMFS, Sigma Chem. Co.) para una concentración final de 0,5 mM. Este compuesto fue excluído posteriormente debido a que

Esquema I: Lavado de la proteína incubada.

Material TCA (10%) caliente (90°C-15 min)

insoluble

3.500 rpm      sobrenadante\*    \*Se descartan  
15 min  
pellet

Sonicado con TCA 5%, 2 ml

3.500 rpm      sobrenadante\*  
15 min  
pellet



Sonicado con agua, 1 ml  
y luego con 1 ml de TCA 10%


3.500 rpm      sobrenadante\*  
15 min  
pellet

Sonicado con etanol-éter (2:1), 2 ml

3.500 rpm      sobrenadante\*  
15 min  
pellet

Sonicado con metanol, 2 ml  
2 veces

3.500 rpm      sobrenadantes\*  
15 min

pellet     secado con aire a 37°C  
(proteína incubada lavada)

no se observaron variaciones en la actividad específica de  $^3\text{H}$  incorporado a proteínas a partir de Man-2  $^3\text{H}$ , con o sin el inhibidor de proteasas para cortezas cerebrales de 5 y 30 días.

b) En el caso de la obtención de lípidos intermediarios, el freno de la incubación se efectuó transfiriendo el material desde la cavidad con 1 ml de metanol a 0°C, a un tubo conteniendo 1,5 ml de cloroformo en baño de hielo y sonicando por 30 segundos a 30 W. Se agregaron 50 ul de portador inactivado (Sección 2.14.) y se sonicó nuevamente. La mezcla se completó con  $\text{MgCl}_2$  4 mM para lograr una partición de Folch (42). Luego de sonicar y centrifugar se separó la interfase proteica, que contiene lípidos-oligosacáridos, se lavó como se indica en el esquema II y se extrajeron con el sistema de solventes H.

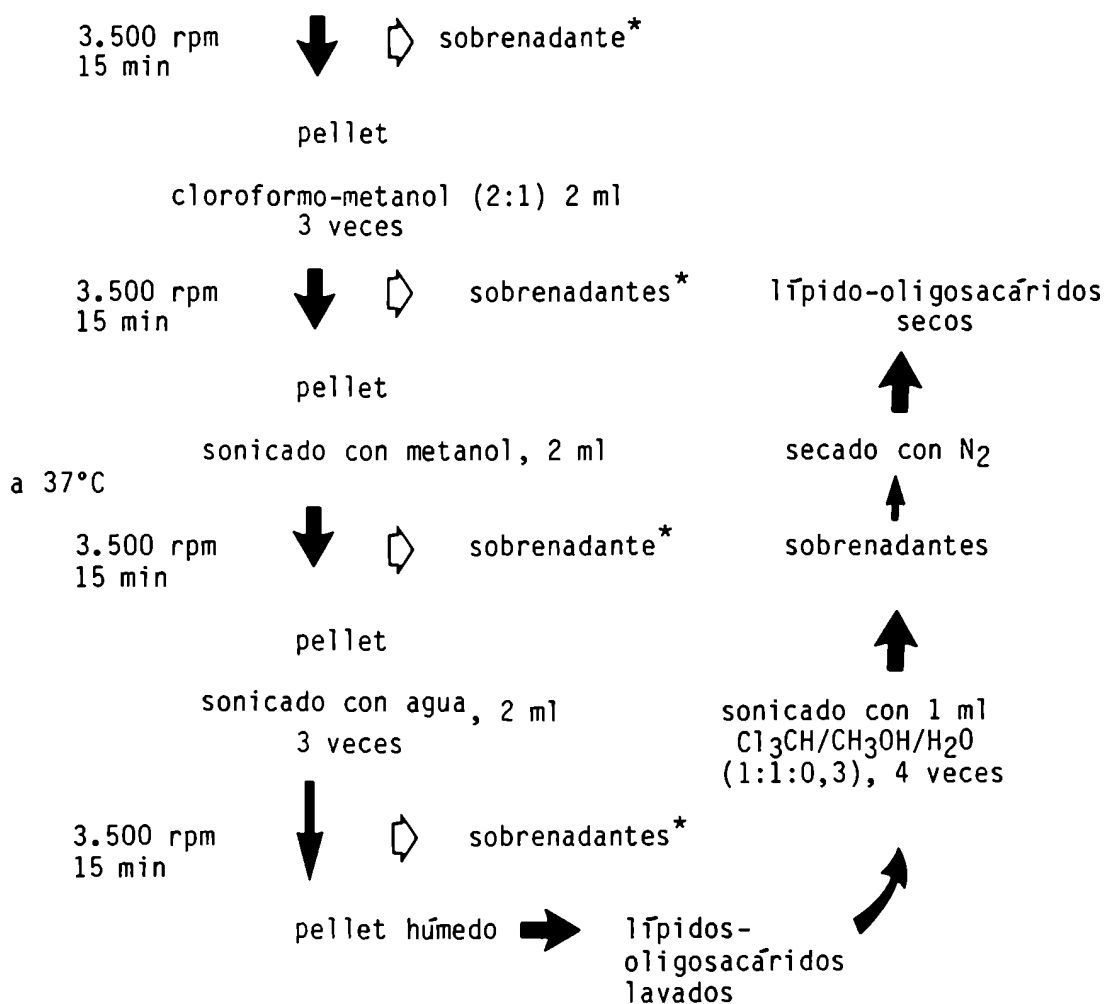
### 2.13. "Chase" de incubaciones.

Luego de un pulso de marcación de 1 hora con Man-2  $^3\text{H}$  la caja de microcavidades se retiró del incubador y se procedió a lavar el material incubado dentro de la cavidad con un volumen final de 3 ml de medio de incubación, en presencia o ausencia de 1 mM de Man. Al finalizar el último lavado se agregaron 50 ul/cav. del mismo medio y se repuso la caja de inmediato en el incubador de  $\text{CO}_2$ .

Esquema II: Lavado de lípidos-oligosacáridos intermediarios.

Interfase proteica de Folch

sonicado con metanol, 2 ml



\*Los sobrenadantes se descartan.

Especial cuidado se destinó a mantener la caja y el medio de incubación a 37°C durante el lavado del medio radioactivo. Esto se logró con una llama, en una campana de atmósfera controlada y flujo laminar (Baker Co. Inc.). Asimismo con la finalidad de reducir el tiempo de operaciones fuera del incubador de CO<sub>2</sub> se sembraron no más de 12 cavidades por vez. El tiempo total de operaciones fue de 5 min. Como un control de la eficiencia del lavado, se tomaron alícuotas de cavidades que contenían medio de incubación al finalizar el procedimiento de "chase". Pudo observarse que la radioactividad remanente fue menor del 1% de la original.

#### 2.14. Material portador (carrier).

Se preparó sonicando corteza cerebral de rata de 5 días en agua, se inactivó a 100°C por 5 min, se sonicó nuevamente (20 W) y una alícuota se empleó para determinar proteínas. La concentración usual es de 10 mg/ml de proteína y se emplearon alrededor de 50 ul por tubo.

#### 2.15. Caracterización de productos.

##### 2.15.1. Labilidad de <sup>3</sup>H unido a proteína a la proteólisis.

La proteína lavada y seca proveniente de la incubación con Man-2 <sup>3</sup>H se incubó con 500 ul de buffer Tris-HCl pH 7.8; 0.1 M, 6 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,2 mg de proteasa tipo VIII de

Sigma Chem Co. La digestión se efectuó a 37°C en atmósfera de tolueno durante 3 días, con 2 agregados diarios de alícuotas de enzima y un agregado a los dos días de 0.5 ml de buffer. Al final del tercer día se procedió a la separación de productos siguiendo el esquema III.

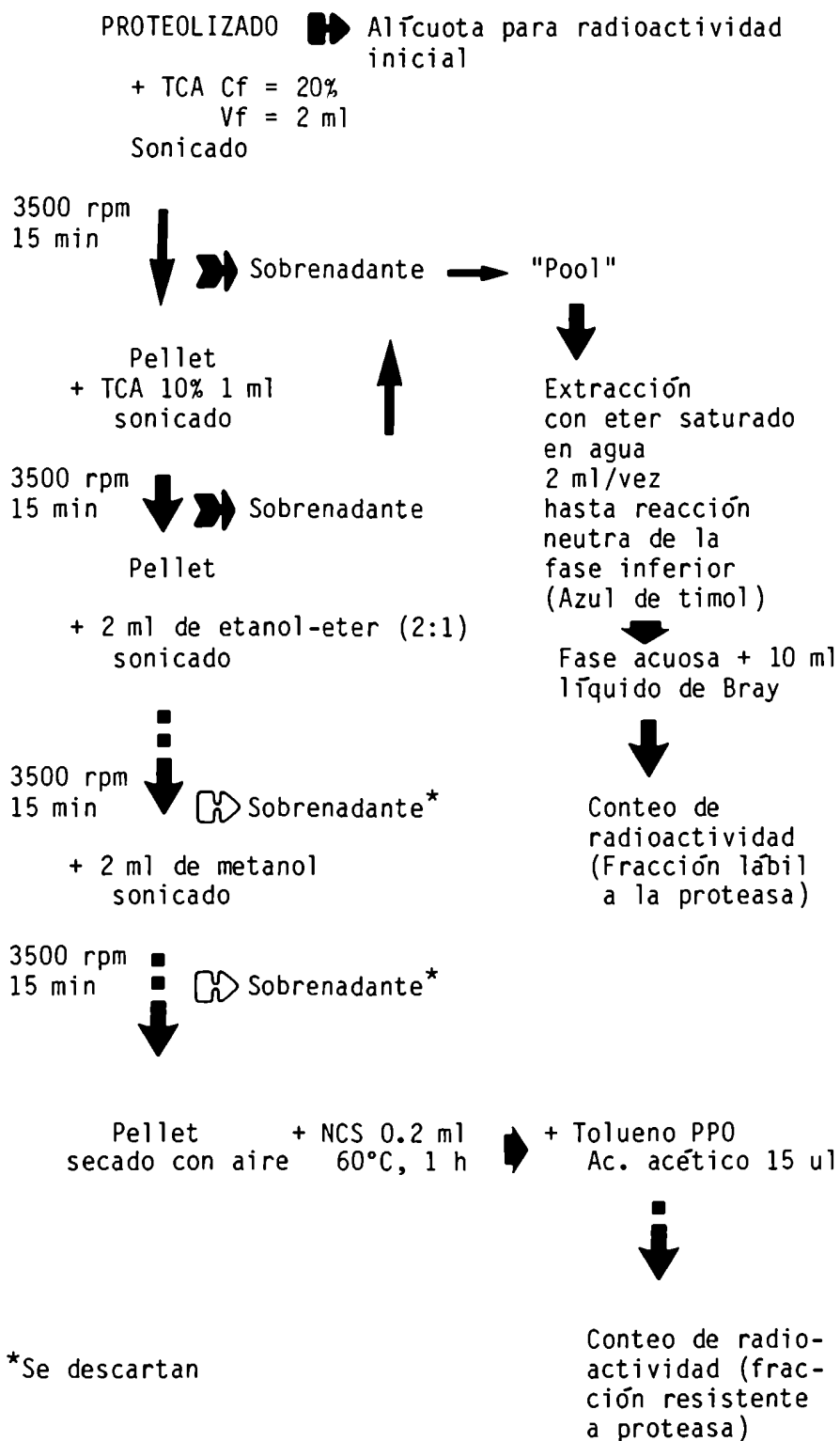
Una alícuota de la proteína lavada inicial se contó para radioactividad (100%). Los valores sumados de radioactividad lábil y resistente a proteasa restados del valor inicial se consideraron como recuperación.

En pruebas paralelas, Man-2 <sup>3</sup>H en solución de TCA al 20% se sometió a varias extracciones con éter saturado en agua. Toda la radioactividad permaneció en la fase acuosa inferior después de eliminado el TCA (pH neutro del azul de timol).

La proteasa tipo VIII de Sigma se ensayó en iguales condiciones a las descritas más arriba para verificar la actividad hidrolítica sobre los oligosacáridos:

(NAcGluNH)<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glu\*<sub>3</sub> y (NAcGluNH)<sub>2</sub>Man\*<sub>9</sub>. Luego de la prueba y cromatografía en el sistema de solventes G, los productos se recuperaron sin cambios de movilidad.

Esquema III: Separación de productos de proteólisis.



2.15.2. Composición de azúcares de los oligosacáridos marcados con  $^3\text{H}$  a partir de Man-2  $^3\text{H}$ .

La fase acuosa del proteolizado lavado con éter (libre de TCA) obtenido como se indica en el esquema III se redujo a un volumen de 0,2 ml con aire a 60°C y se procedió a acidificar con HCl para una concentración final de 1,5 N en 0,5 ml de volumen final en una ampolla de vidrio que finalmente se selló. Se calentó en baño de agua a 100°C durante 4 horas, con lo cual se consigue la hidrólisis de los oligosacáridos. Igual procedimiento se siguió a partir del material insoluble en TCA caliente proveniente de partículas de corteza cerebral de rata de 5 días incubadas con 100 uCi de Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa (1 g/l) durante 2 horas.

Al final del tratamiento ácido, la ampolla se enfrió y el ácido clorhídrico se eliminó empleando alguno de los procedimientos siguientes: A) pasando el contenido a través de una columna de 0,5 cm di x 10 cm h que contenía Dowex AGX-1 en la forma acetato (43), B) por evaporación del HCl a 56°C con aire hasta reacción neutra y posterior vacío durante 1 hora. En ambos casos, el material seco quedó disponible para la cromatografía en papel.



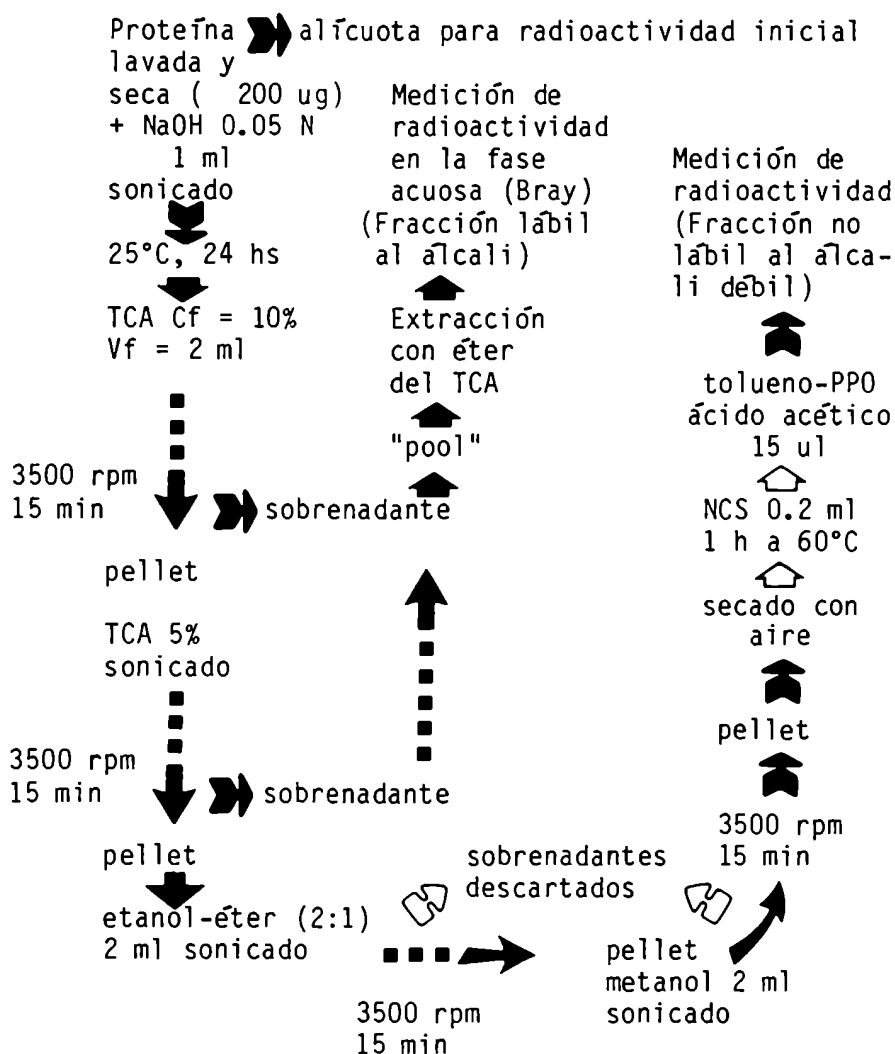
### 2.15.3. Cromatografía de productos de proteólisis ácido lábiles.

El material obtenido como se indica arriba se redisolvió en alícuotas de 0,2 ml de agua y, en algunos casos, se agregaron 1 umol de manosa y 1 umol de fucosa. La nueva solución se sembró sobre papel Whatman N°1. Asimismo, en otros carriles se sembraron manosa y fucosa juntas y separadas en cantidad de 1 umol para cada azúcar. La tira de papel se cromatografió durante 27 horas en el sistema de solventes A. Luego del secado, el cromatograma se reveló por el método térmico-UV y posteriormente se marcaron las bandas bajo luz UV, se cortó la tira proveniente de la muestra hidrolizada en secciones de 1 cm, que se midieron para radioactividad empleando tolueno-PP0.

### 2.15.4. Tratamiento con álcali suave.

Para estimar la cantidad de glicoproteínas marcadas con  $^3\text{H}$  a partir de Man-2  $^3\text{H}$  con uniones O-glicosídicas de azúcares unidos a hidroxiaminoácidos como serina o treonina, se procedió a efectuar una  $\beta$ -eliminación. Puesto que se requiere que los grupos amino y carboxilo del hidroxiaminoácido estén sustituidos (9) se sometió al tratamiento la proteína entera lavada y seca según el esquema IV. El mismo esquema se repitió, pero disolviendo la proteína en NaOH, 1 N durante 2 hs a 25°C.

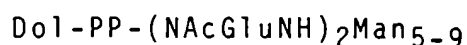
Esquema IV: Tratamiento con álcali suave de la proteína marcada con  $^3\text{H}$   
a partir de Man-2  $^3\text{H}$ .



La radioactividad inicial (100%) menos la suma de la radioactividad de las fracciones lábil y no lábil al álcali es la recuperación.

2.15.5. Obtención de oligosacáridos a partir de lípido-oligosacáridos intermediarios.

Para el estudio de los lípido-oligosacáridos intermediarios, la marcación se efectuó con Glu-<sup>14</sup>C, en cantidad de 50 ug/cavidad empleando originalmente medio de incubación sin glucosa. Se obtuvo la interfase proteica lavada como se indica en el Esquema II, que se extrajo cuatro veces con 1 ml del sistema de solventes H, sonicando (20 W) y centrifugando a 3500 rpm por 5 min cada vez. Los sobrenadantes se juntaron y secaron con N<sub>2</sub> a 37°C. El sistema de solventes empleado (H) permite la extracción de los lípidos intermediarios siguientes (44):

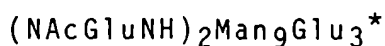
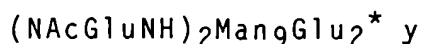


Los lípidos secados se acidificaron con 0,5 ml de HCl 0,015 N y se calentó en un baño de agua a 100°C durante 15 min con la finalidad de producir la hidrólisis de la unión pirofosfato-azúcar (47). Como indicador de la acidez del medio se empleó azul de timol durante el calentamiento (25 ug/tubo). Una vez finalizada la hidrólisis se procedió a efectuar una partición de Folch (42), con la finalidad de separar las moléculas lipídicas. La fase clorofórmica se lavó con 1 ml por vez de fase superior teórica (4 mM MgCl<sub>2</sub>-metanol-cloroformo; 16:16:1) hasta total eliminación

del colorante y una vez adicional. Las fases acuosas se juntaron y secaron bajo corriente de aire en baño de agua a 60°C y el material se retomó con alícuotas de 0,2 ml de metanol-agua (1:1) que se sembraron en papel Whatman N°1.

#### 2.15.6. Cromatografía de oligosacáridos.

En el mismo papel indicado más arriba pero en un carril separado se sembraron alrededor de 2.000 cpm de estándares de:



marcados con  $^{14}\text{C}$  (\*) y se cromatografió durante 5,5 días en el sistema de solventes G.

Al finalizar la corrida cromatográfica, la tira que contenía los estándares se cortó y se detectó la radioactividad por barrido. La tira que contenía los oligosacáridos provenientes de la incubación se cortó en secciones de 1 cm y se midió la radioactividad por centelleo líquido. Los resultados se graficaron y los Rf se compararon con el registro de radioactividad de los estándares.

#### 2.16. Cromatografía sobre sílica gel en placa delgada (TLC).

Se emplearon placas de sílica gel 60 (20 x 20 ó 5 x 20 cm, 0,25 mm de espesor) de Merck (Darmstad, G.F.R.). Las placas se lavaron durante una noche con metanol:agua (1:1).

2.17. Mediciones de temperatura superficial.

La plancha empleada para el revelado térmico de papeles se reguló a la temperatura deseada con ayuda de un sensor de contacto Fluke modelo 80T 152, acoplado a un multímetro Fluke modelo 8020 A.

2.18. Calentamiento de placas para revelado térmico.

Para un preciso calentamiento de las placas se empleó el compartimento de columnas de un cromatógrafo de gases Packard modelo 804 controlado por un regulador Packard modelo 873. Con este equipo la temperatura deseada se obtuvo en alrededor de 30 segundos en todos los casos. Usualmente, la temperatura inicial de cada paso fue 10°C menor que la deseada.

2.19. Observación de papeles y placas al ultravioleta.

La observación visual al UV de placas y papeles se efectuó en todos los casos en el rango de longitudes de onda largas (366 nm).

## 2.20. Mediciones de fluorescencia.

Se utilizó un espectrofluorómetro SLM modelo 4800 acoplado a una computadora Hewlett-Packard modelo 9825. Los espectros de emisión se obtuvieron a temperatura ambiente. La excitación de la fluorescencia fue efectuada a 320 nm para glucosamina y a 336 nm para glucosa. Estas longitudes de onda fueron seleccionadas para obtener la máxima emisión de fluorescencia de cada componente.

La resolución en los monocromadores fue fijada en 4 nm en todas las mediciones.

Un blanco se determinó al final de cada experimento y se substrajo del espectro de emisión. Todos los espectros fueron corregidos para la respuesta del instrumento usando una serie de factores suministrados por el fabricante.

La intensidad de la luz de excitación fue continuamente monitoreada con un tubo fotomultiplicador.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características del particulado de corteza cerebral.

Con el objeto de evaluar el tamaño y la regularidad de las partículas de corteza cerebral obtenidas como se indica en la sección 2.10.3., se procedió de la siguiente manera. Material particulado correspondiente a 100 ug de proteína se resuspendió en 50 ul de medio de incubación dentro de microcavidades. Se procedió entonces a fotografiar varias cavidades y una retícula marcada cada 50 um (American Optical Co.). Una vez revelados, los negativos fotográficos se proyectaron con una ampliadora sobre papel milimetrado y se marcaron los contornos. Asimismo se marcaron las dimensiones de la retícula. Luego se procedió a efectuar las mediciones que se indican más abajo para un total de 100 partículas.

Como se puede observar en la fotografía de la figura 6, las partículas son irregulares. Para indicar con un criterio funcional las dimensiones de partículas irregulares se determinaron:

- a) Distancia mínima desde el medio de incubación a la zona más desfavorable de la partícula con respecto al intercambio de metabolitos. Para calcular este valor se procedió a trazar la línea correspondiente al plano de simetría normal al área visualizada de

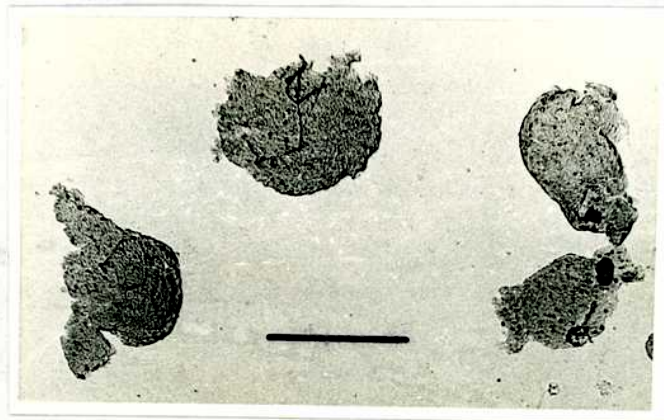
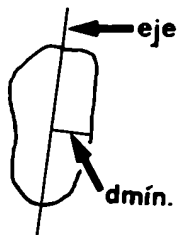


Figura 6: la microfotografía muestra el aspecto de partículas provenientes de corteza cerebral de rata de 5 días, resuspendidas en el medio de incubación. Varios preparados fueron examinados para el cálculo de las dimensiones. La barra indica 100  $\mu\text{m}$ .



la partícula en sentido longitudinal y a continuación se trazó la normal desde un punto del eje hasta el borde más alejado de la partícula. Se tuvo la precaución de que la magnitud de la normal no fuera mayor que la longitud desde la intersección de la normal al origen más próximo del eje. A continuación se ejemplifica el procedimiento de medición de  $d_{mín}$  para una partícula de la figura 6.



El valor de  $d_{mín}$  es independiente del espesor cuando el espesor es mayor o igual que  $2 d_{mín}$ .

El valor obtenido fue:

$$d_{mín} = 50 \pm 12 \text{ um (media } \pm \text{ desviación estándar).}$$

b) Superficie aparente. Es una medida que permite evaluar la reproducibilidad de las áreas expuestas al medio por uno de sus lados.

$S_{\text{aparente}} = 0,015 \pm 86 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^2$  (media  $\pm$  desviación estándar). De los valores indicados en (a) y (b) y de las respectivas desviaciones estándar puede concluirse que las partículas obtenidas son semejantes.

Debe destacarse que igual aspecto presentaron los particulados obtenidos de cortezas cerebrales entre -3 y 30 días de edad, cuando se procedió como se indica para la obtención de los mismos.

La principal consecuencia de esta estandarización del particulado es que los experimentos realizados con ellas resultan altamente reproducibles. No se han observado variaciones en ningún resultado experimental cuando las partículas se obtienen de menor tamaño, por ejemplo: empleando una pipeta Pasteur de menos de 1 mm di. Esto sugiere que las partículas descritas resultan adecuadas desde el punto de vista de su geometría para el intercambio de metabolitos y nutrientes con el medio de incubación. Se debe destacar que el empleo de partículas más pequeñas dificultó la sedimentación a 1 x g, necesaria para la siembra inmediata del material y para la rápida sedimentación en la cavidad, requerida durante los procedimientos de "chase".

### 3.2. Medición de actividad enzimática que actúa sobre glucosa en el medio durante la incubación.

Con el objeto de determinar la posible existencia de enzimas liberadas al medio de incubación, alícuotas de medio provenientes de cavidades incubadas durante 1 hora con aproximadamente 150 ug de proteína por cavidad fueron

ensayadas como sigue. Algunas de las fracciones se procesaron de inmediato para medir glucosa. Otras se colocaron en baño de agua a 37°C durante 2 horas y luego se midió la glucosa. Los valores obtenidos en los dos casos coinciden en un 98%.

Los resultados indican que no se liberan al medio enzimas capaces de transformar glucosa, al menos en 1 hora de incubación con el tejido, y a esto puede contribuir el procedimiento de preparación de las partículas que permite descartar posibles restos celulares en un volumen 50 veces mayor al del material que se emplea en la incubación.

### 3.3. Evaporación del medio de incubación.

Si bien se incuba por un período de tiempo relativamente corto y en atmósfera saturada en agua, el pequeño volumen del medio incubado (50 ul/cav.) podría concentrarse por evaporación. Para estudiar esta posibilidad, alícuotas del medio de incubación conteniendo 25.000 cpm de Glu-<sup>14</sup>C(U) se incubaron durante 3 horas, en las condiciones habituales, pero sin tejido.

En una alícuota de 20 ul de cada cavidad se midió la radioactividad de <sup>14</sup>C y los valores se compararon con los provenientes de igual volumen de medio no incubado. Los resultados difieren en  $\pm 2,5\%$  para 10 muestras ensayadas.

3.4. Concentración de glucosa en el medio durante la incubación.

La evaluación de la oferta de glucosa a los particulados de corteza cerebral tiene importancia desde varios puntos de vista:

- a) Asegurar durante el período de incubación niveles constantes de glucosa a concentraciones semejantes a las fisiológicas (1 g/l) y siempre superiores al umbral in situ (0,5 g/l).
- b) Verificar si la desaparición del azúcar es lineal durante la incubación. De ser así, podría constituir un índice de la preservación de actividad biosintética del tejido.
- c) Determinar si la desaparición de glucosa es proporcional a la cantidad de particulado sembrado y establecer si varía con la edad.

Para determinar las características mencionadas, cantidades variables de particulado de cortezas cerebrales de 5 y 30 días correspondientes a un rango de proteína entre 50 y 500 ug se incubaron individualmente en microcavidades, durante tiempos de hasta tres horas. Para cada valor de proteína incubada y para cada tiempo se empleó una microcavidad que contenía 50 ul de medio de incubación. Se retiraron 5-20

ul de medio a los tiempos que correspondían y se determinó la glucosa de inmediato. También se determinó la cantidad de proteína incubada. Las mediciones de glucosa del medio no incubado se consideraron como el 100%.

Los resultados de las mediciones efectuadas en corteza cerebral de 5 días pueden observarse en la figura 7, y en la figura 8, los obtenidos para corteza cerebral de 30 días. Estos datos demuestran que la desaparición de glucosa es proporcional a la cantidad de proteína incubada tanto para cortezas de 5 como de 30 días.

Para establecer el grado de linealidad en el tiempo y las relaciones de desaparición entre las dos edades, se calcularon las pendientes a las curvas de las figuras 7 y 8, y se graficaron en función del tiempo. Como se puede observar en la figura 9, existe una relación lineal de la desaparición de glucosa (ug Glu/ug proteína) y a los 30 días de edad los valores exceden en un 87% al de la corteza cerebral de 5 días.

Los datos obtenidos permiten establecer que cuando se desee incubar cantidades de particulado de corteza cerebral correspondientes a 50-150 ug de proteína, la disminución de glucosa del medio de incubación será del 10-20% (según la edad y la cantidad sembrada) durante las 3 horas de incubación. De esta manera, los niveles mínimos de oferta de glu-

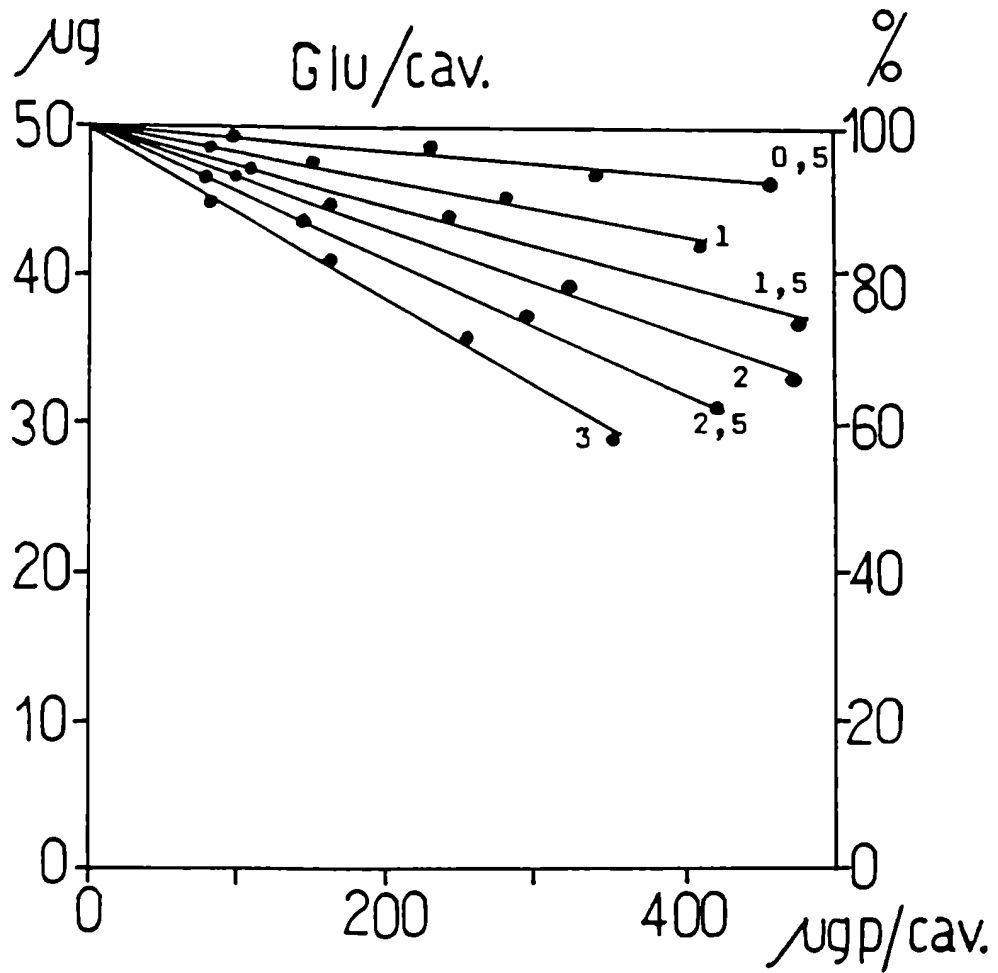


Figura 7: glucosa remanente en el medio de incubación en función de la cantidad de proteína incubada por cavidad y del tiempo de incubación. Corteza cerebral de rata de 5 días de edad. Los números al lado de cada recta indican el tiempo de incubación en horas.

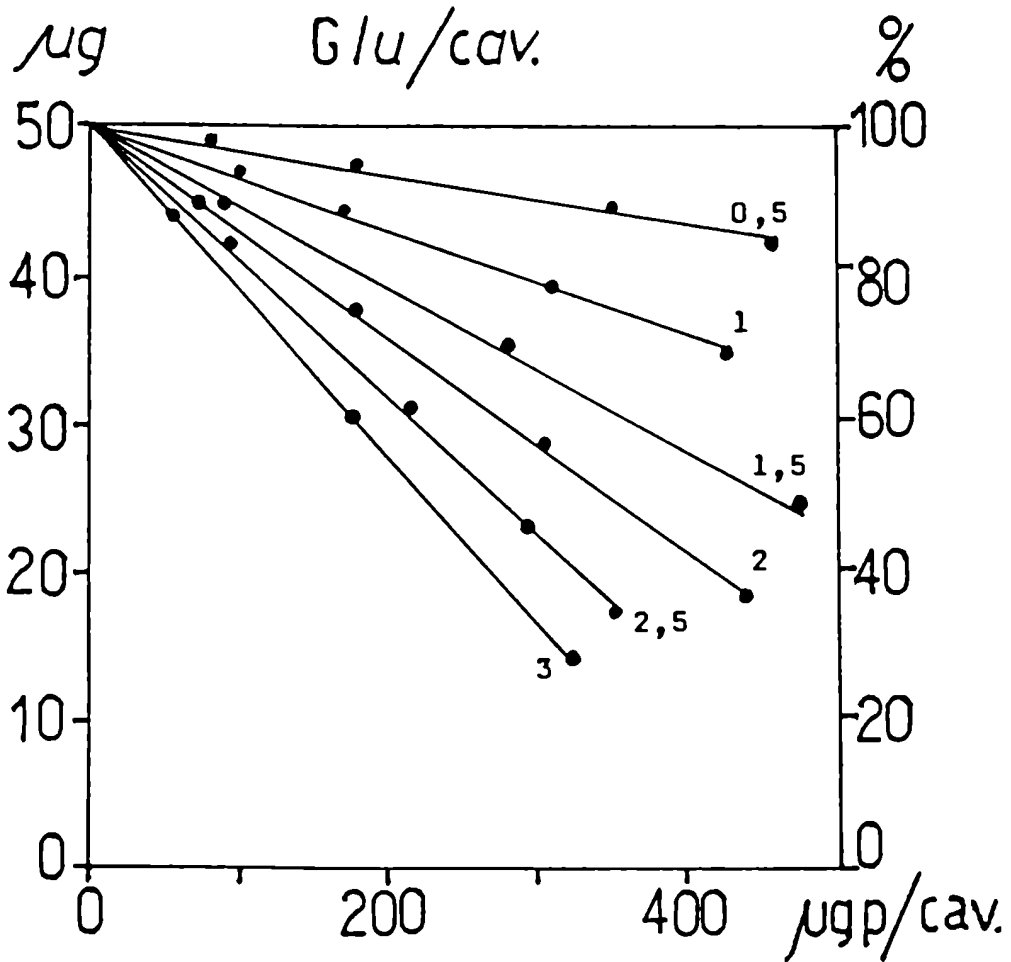


Figura 8:glucosa remanente en el medio de incubación en función de la cantidad de proteína incubada por cavidad y del tiempo de incubación. Corteza cerebral de rata de 30 días de edad. Los números al lado de cada recta indican el tiempo de incubación en horas.

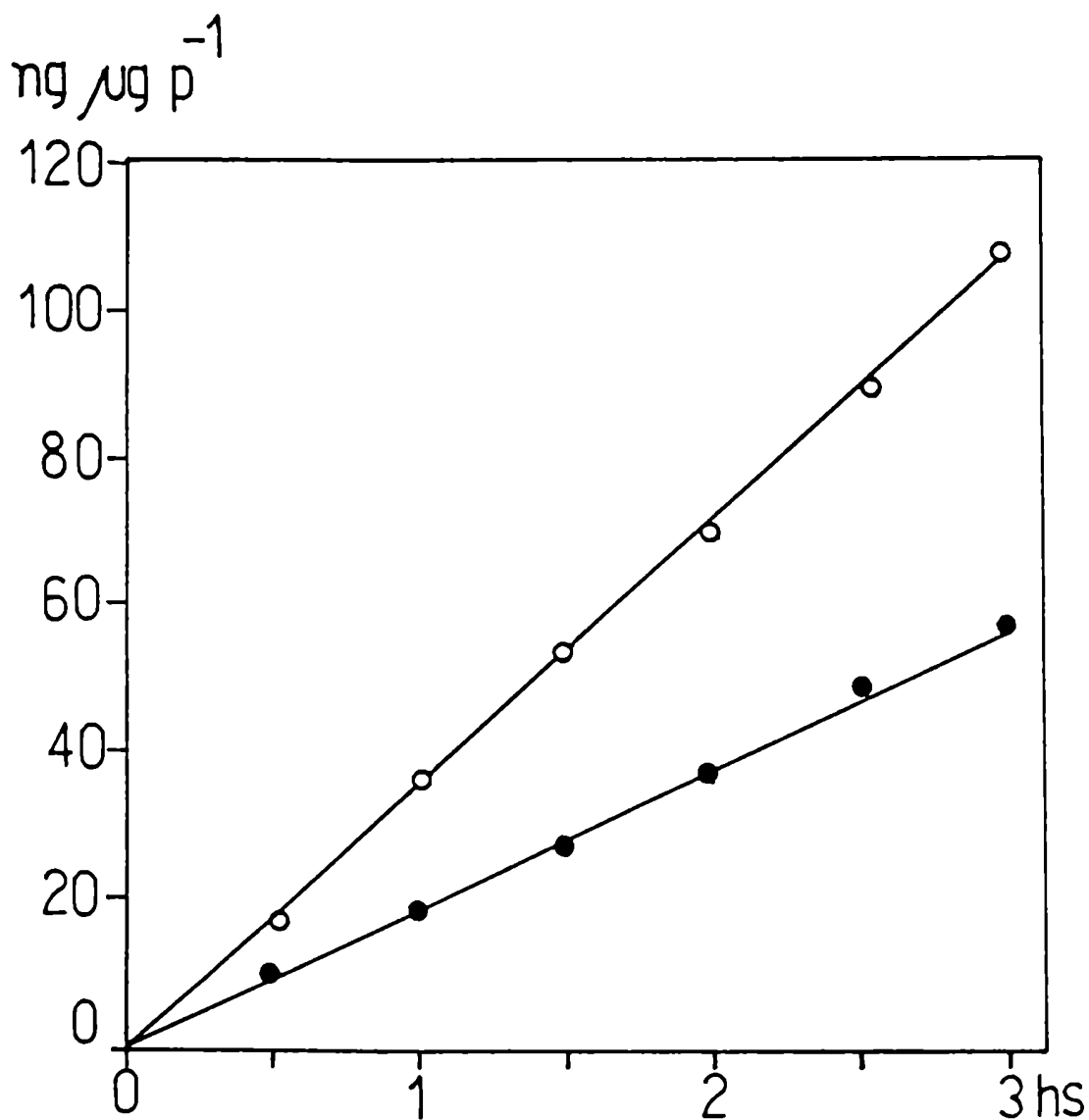


Figura 9: desaparición específica de glucosa (ordenada) del medio de incubación en función del tiempo. Las curvas se construyen en base a las pendientes calculadas para las rectas de las figuras 7 y 8. Corteza cerebral de 5 (●) y 30 (○) días. Incremento porcentual de la desaparición de Glu 30/5d = 87%.

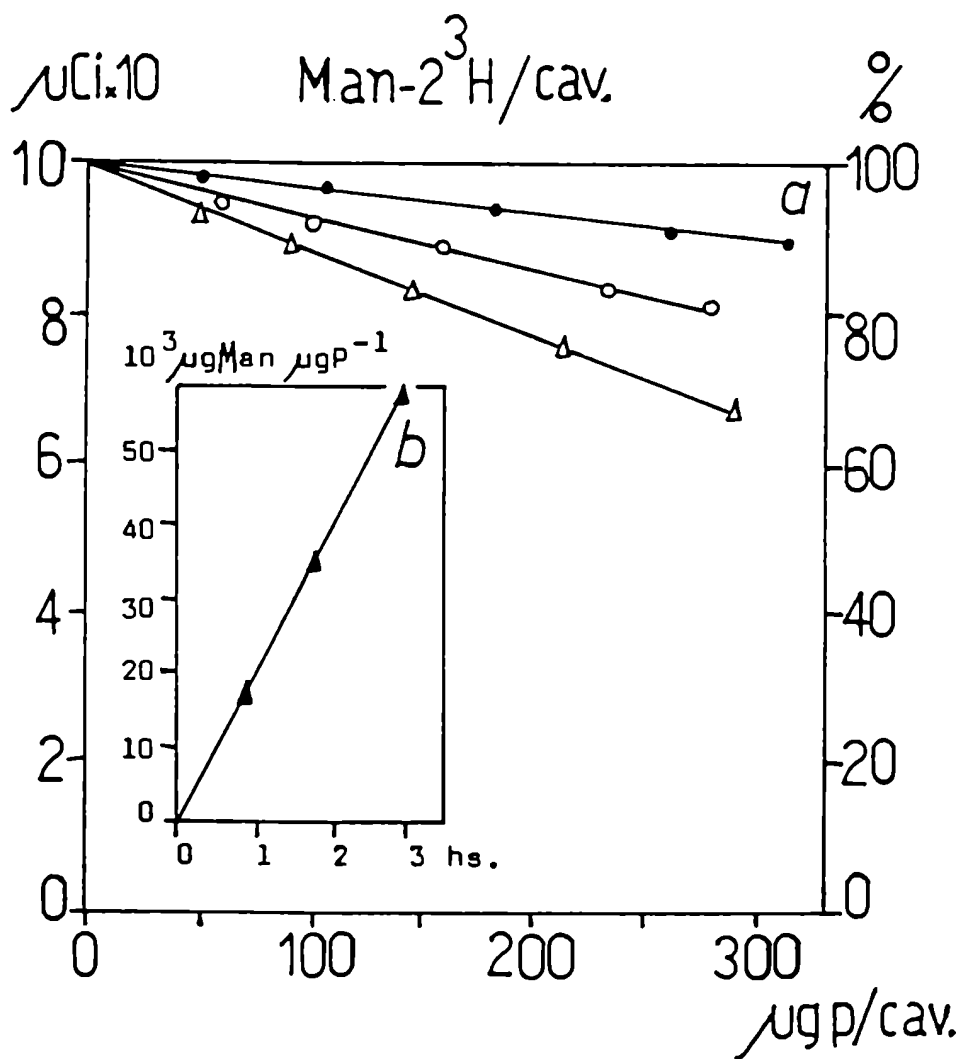


cosa superan el umbral fisiológico (32,5 ug/cavidad).

### 3.5. Concentración de manosa en el medio durante la incubación.

Para estudiar las características del sistema que permite la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteínas a partir de manosa, cuando en el medio de incubación la relación de masa glucosa/manosa- $2^3\text{H}$  es de 667, se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar se trató de establecer la velocidad de desaparición de la manosa del medio de incubación, cuando este azúcar es el único nutriente a igual concentración que la glucosa. Para estos experimentos se emplearon 50 ug de manosa/cavidad. El carbohidrato utilizado es de una baja radioactividad ( $\text{AE } ^3\text{H} = 0,02 \text{ uCi/ug}$ ) para permitir el dosaje de la masa de manosa a través de la disminución de radioactividad, como se indica en Materiales y Métodos. Se puede observar en la figura 10 (corteza cerebral de 5 días) que las características de la desaparición de manosa son semejantes a las observadas para glucosa (Figs. 7 y 9).

La desaparición neta de manosa se obtiene de la figura 10 b. Estos datos coinciden con lo observado previamente para el animal entero en cuanto a la intercambiabilidad de los azúcares considerados (15).



**Figura 10:** desaparición de la radioactividad de  $\text{Man-2}^3\text{H}$  del medio de incubación en función de la cantidad de proteína incubada por cavidad (a). Las determinaciones se efectuaron en ausencia de glucosa y con una cantidad equivalente de manosa ( $50 \mu\text{g/cav.}$ ) de  $\text{AE}=0,02 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Los datos corresponden a corteza cerebral de rata de 5 días de edad, incubadas durante 1 hora (●), 2 horas (○) y 3 horas (Δ). En la figura (b, inserto) se indica la desaparición específica de manosa en función del tiempo de incubación.

### 3.6. Utilización de manosa-2 <sup>3</sup>H en presencia de glucosa.

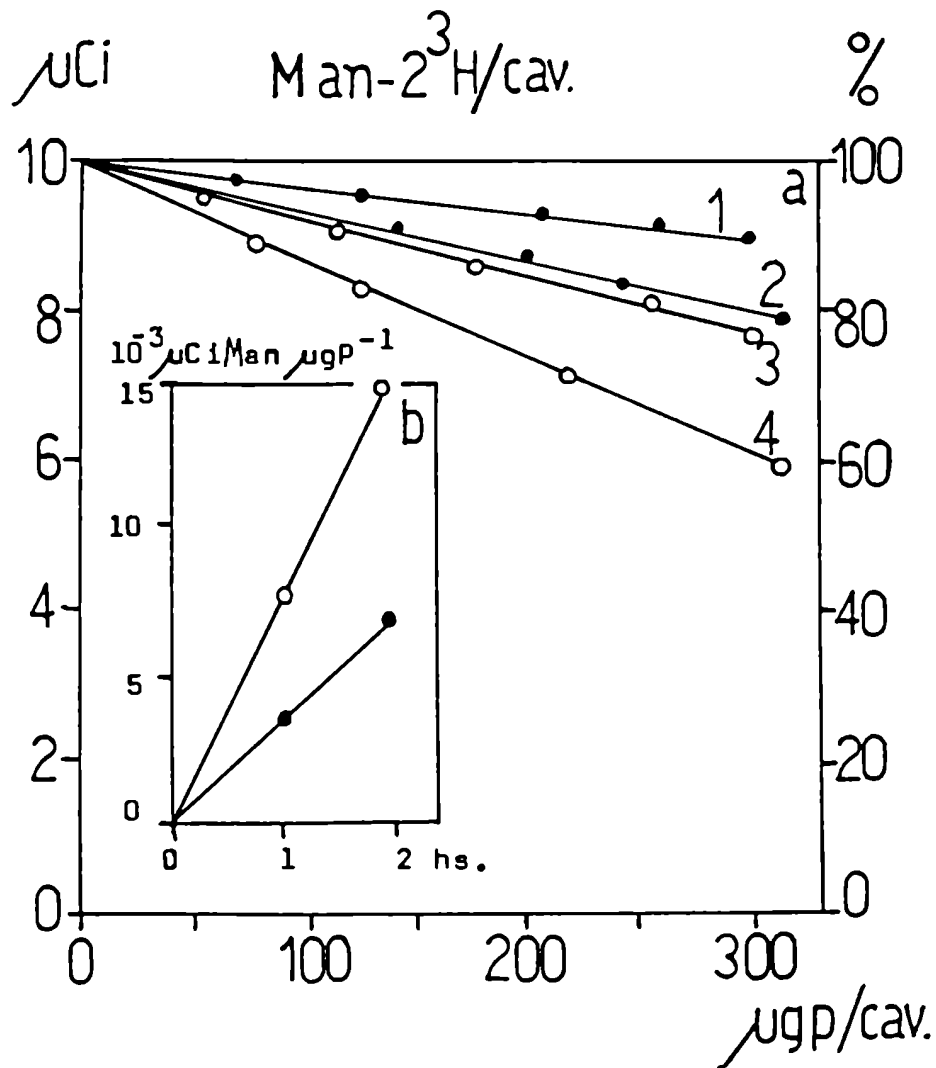
Por otro lado se quisieron establecer las características de la desaparición de manosa, en presencia de glucosa, en las condiciones de incubación destinadas a medir incorporación de <sup>3</sup>H a proteína a partir de Man-2 <sup>3</sup>H. Por lo tanto estos experimentos se realizaron con 10 uCi/cav. de Man-2 <sup>3</sup>H (AE = 133 uCi/ug) en presencia de 50 ug/cav. de glucosa, lo cual corresponde a una relación de masa glucosa/manosa = 667.

En este caso se midió también la desaparición de radioactividad del medio de incubación como se indicó más arriba, pero para cortezas cerebrales de 5 y 30 días. La linealidad de los resultados obtenidos (Fig. 11) es comparable a lo anteriormente descrito para glucosa y manosa (Figs. 9 y 10).

De la Fig. 11 b se puede obtener la desaparición neta de manosa (en uCi Man  $\text{ugp}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Si se asume que la manosa-2 <sup>3</sup>H es utilizada como si fuera glucosa, entonces la desaparición de glucosa calculada de la manera siguiente debe coincidir con la real.

ug Glu desaparecidos (calculados indirectamente) =

$$50 \text{ ug Glu} \times \frac{\text{uCi Man desaparecida}}{10 \text{ uCi Man}}$$



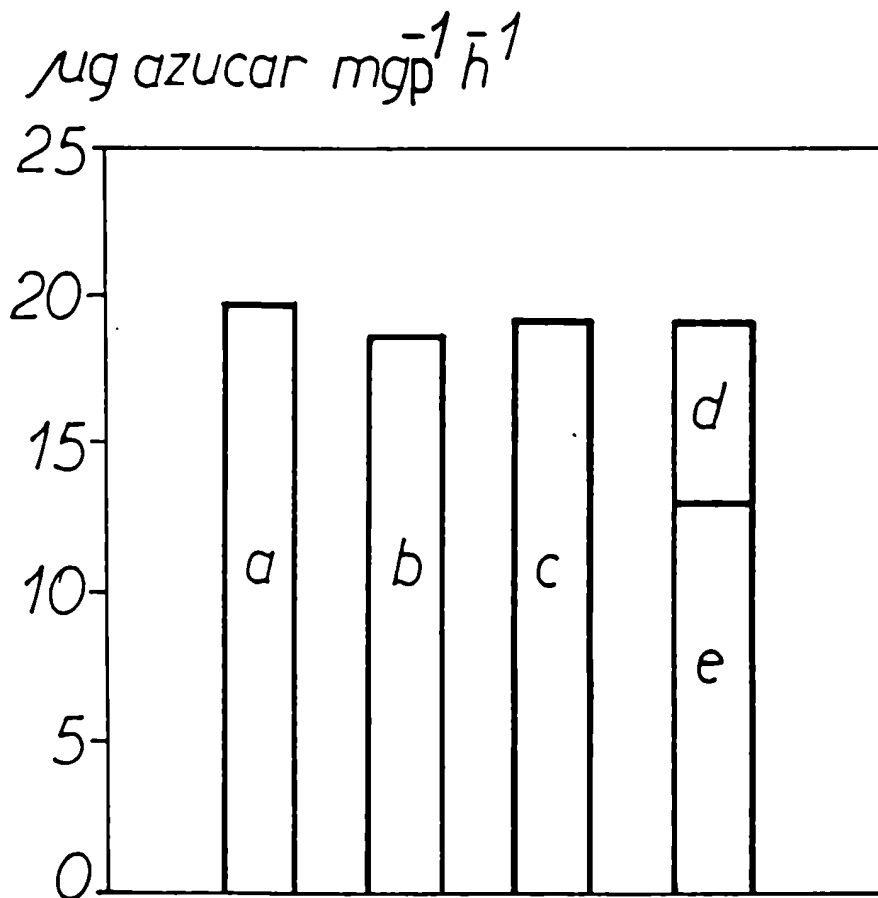
**Figura 11:** desaparición de la radioactividad de  $\text{Man-}^3\text{H}$  del medio de incubación en función de la cantidad de proteína incubada por cavidad. Las determinaciones se efectuaron en presencia de glucosa ( $50 \mu\text{g/cav.}$ ) y con manosa radioactiva de  $\text{AE}=133 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ . Corteza cerebral de rata de 5 ( $\bullet$ ) y 30 ( $\circ$ ) días de edad. Las incubaciones se efectuaron por períodos de 1 hora (a, curvas 1 y 3) y por 2 horas (a, curvas 2 y 4). En la figura (b, inserto) se indican las desapariciones específicas de manosa en función del tiempo de incubación.

Cuando se trasladan a la Fig. 12 los resultados obtenidos ( $\mu\text{g mgp}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) de glucosa (directo), glucosa (indirecto) y manosa puede observarse que hay una gran similitud en los tres casos.

De esta manera queda establecido que los dos azúcares desaparecen del medio indistintamente, ya sea cuando están por separado y juntos en las condiciones descriptas.

### 3.7. Oferta de manosa-2 $^3\text{H}$ en presencia de una concentración muy baja de glucosa.

Para establecer la influencia de la ausencia de concentraciones fisiológicas de glucosa (1 g/l) sobre el nivel de oferta de Man-2  $^3\text{H}$  (10 uCi/cav.) en el medio durante 3 hs de incubación se realizó el siguiente experimento. Cavidades conteniendo medio de incubación (0,05 g/l de glucosa), con 10 uCi/cav. de Man-2  $^3\text{H}$  y  $150 \pm 15$   $\mu\text{g}$  de proteína de particulado de corteza cerebral de 5 días, se incubaron a diferentes tiempos hasta 3 horas. A cada tiempo una alícuota de cada una de 3 cavidades fue ensayada para medir radioactividad ( $^3\text{H}$  de Man-2  $^3\text{H}$ ) como se indica en Materiales y Métodos, y el material sembrado en esas cavidades se procesó para medir proteínas. Se seleccionaron los valores de proteínas entre 135 y 165  $\mu\text{g/cav.}$  y los datos de radioactividad correspondientes se graficaron en función del tiempo de



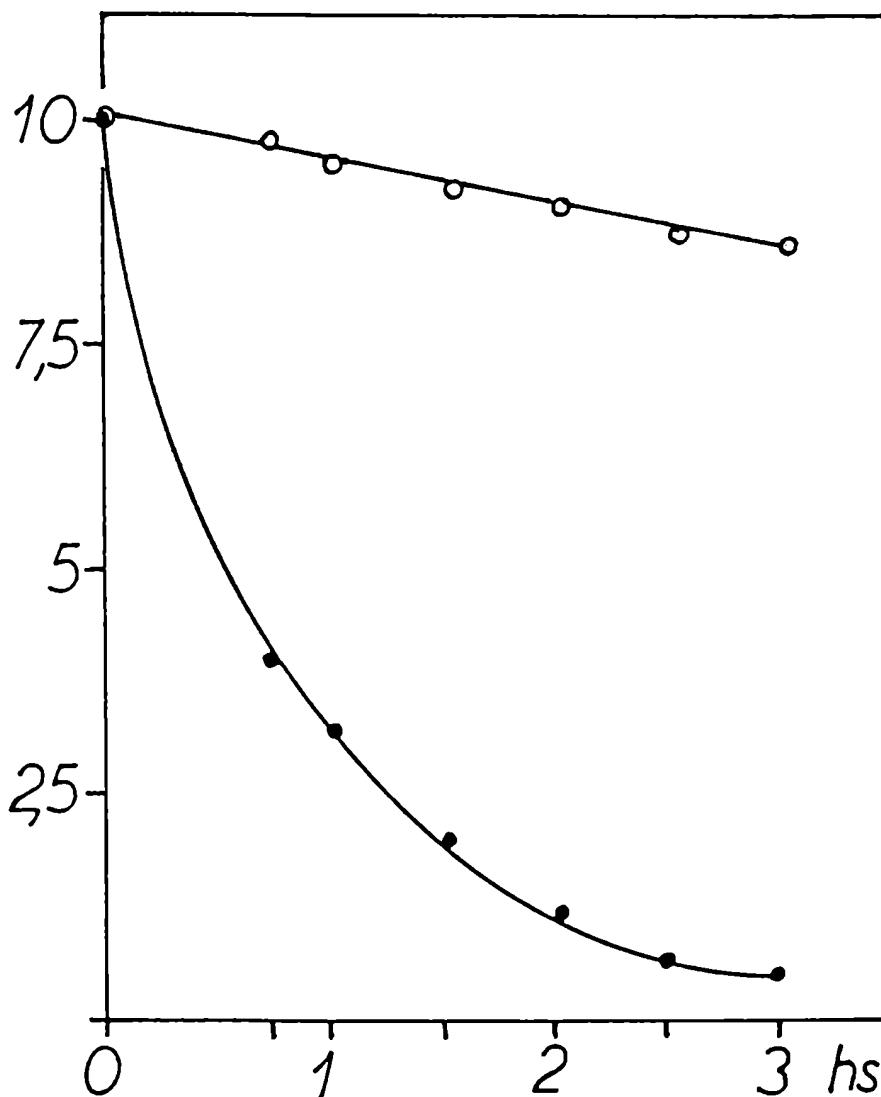
**Figura 12:** desapariciones específicas de: (a) glucosa, cuando en el medio de incubación hay una cantidad de  $50 \mu\text{g/cav}$ . Los datos se obtienen por medición directa de glucosa.  
b) glucosa, cuando en el medio de incubación hay igual cantidad de glucosa que en (a) y  $10 \mu\text{Ci/cav}$ . de  $\text{Man-2}^3\text{H}$ . La glucosa se mide indirectamente asumiendo incorporación indistinta de manosa y glucosa.  
c) manosa, cuando en el medio de incubación hay una cantidad de  $50 \mu\text{g/cav}$ . La medición se efectúa por la desaparición de la radioactividad de  $\text{Man-2}^3\text{H}$  del medio de incubación ( $1 \mu\text{Ci/cav}$ ). La glucosa se excluye del medio para estos ensayos.  
d) glucosa, cuando en el medio de incubación hay  $25 \mu\text{g}$  de glucosa/cav. y  $25 \mu\text{g}$  de manosa/cav.  
e) manosa, en las condiciones establecidas en (d). La suma (d)+(e) indica el consumo total de azúcares.

incubación. La radioactividad del medio sin incubar corresponde a 10 uCi. Como puede observarse en la figura 13, un importante decaimiento de la oferta de Man-2 <sup>3</sup>H tiene lugar en los primeros 45 minutos de incubación. En la misma figura se observan los resultados obtenidos de un experimento similar cuando en el medio se incluye glucosa en niveles fisiológicos (50 ug/cav.) además de la manosa-2 <sup>3</sup>H. En este último caso, solo desaparece un 10% del valor inicial del precursor radioactivo. Merece destacarse que el decaimiento de Man-2 <sup>3</sup>H del medio de incubación solamente se observó cuando las muestras destinadas a la medición de radioactividad fueron acidificadas y secadas.

### 3.8. Desaparición de azúcares con oferta de concentraciones iguales de glucosa y manosa.

Con la finalidad de explorar la selectividad de la desaparición de manosa y glucosa cuando la relación de los carbohidratos en el medio es 1:1, se diseñó el experimento que sigue. Partiendo de corteza cerebral de 5 días se incubó por un máximo de 3 hs empleando medio de incubación que contenía 50% de cada azúcar. Es decir, 25 ug/cav. de glucosa + 25 ug/cav. de manosa en lugar de 50 ug de glucosa. A diferentes tiempos se midieron en el medio de incubación los consumos de glucosa y manosa como se indica en Materiales y

$\mu\text{Ci}/\text{cav.}$



**Figura 13:** desaparición de radioactividad del medio de incubación cuando contiene  $10 \mu\text{Ci}/\text{cav.}$  de  $\text{Man-}^{23}\text{H}$  en presencia de una concentración fisiológica de glucosa de  $1 \text{ g/l}$  (○) y con una concentración inicial de glucosa de  $0,05 \text{ g/l}$  (●). Las determinaciones se realizan seleccionando las cavidades que contienen  $150 \pm 15 \mu\text{g}$  de proteína.

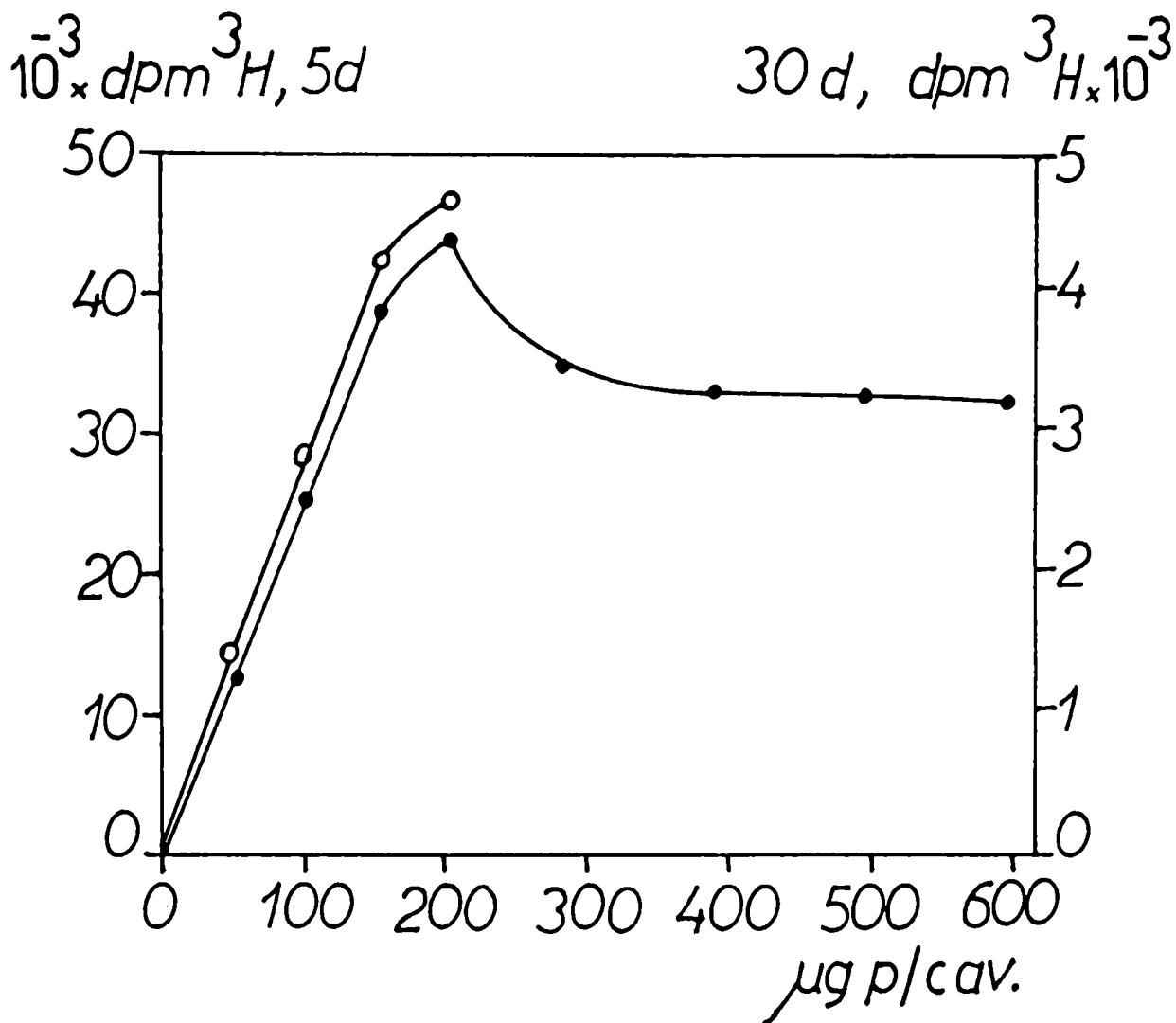


Métodos. En estos casos se trabajó con  $150 \pm 15$  ug P/cavidad. Los valores se obtuvieron de dos cavidades por separado para cada tiempo. Los resultados obtenidos se expresan como desaparición (ug azúcar  $\text{mg p}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) y se representan en la figura 12, en la que se puede observar que cuando la concentración de manosa es igual a la de glucosa en el medio de incubación, la relación de utilización de  $\text{Man/Glu} = 2$ .

Los resultados obtenidos para todas las condiciones descriptas (Fig. 12), están en relación con lo encontrado in vitro, para la hexoquinasa purificada de cerebro de rata (46,47,48,49).

### 3.9. Optimización de la incorporación de tritio a la proteína a partir de Man-2 $^3\text{H}$ en función de la cantidad de proteína incubada.

Con el fin de lograr condiciones lineales de incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de Man-2  $^3\text{H}$ , cantidades crecientes de particulado de corteza cerebral de 5 y 30 días correspondientes a 50-600 ug de proteína se incubaron con medio que contenía 1 g/l de glucosa (50 ug/cavidad) y 10 uCi/cavidad de Man-2  $^3\text{H}$ . A las 3 horas de incubación, el particulado fue procesado para la medición de radioactividad como se indicó en Materiales y Métodos.



**Figura 14:** radioactividad incorporada a protefina a partir de Man- $^{23}\text{H}$  en funci3n de la cantidad de protefina incubada por cavidad. Man- $^{23}\text{H}$  = 10  $\mu\text{Ci/cav.}$  en presencia de concentraci3n fisiol3gica de glucosa (1 g/l). Tiempo de incubaci3n: 3 horas. Corteza cerebral de rata de 5 ( ) y 30 (O) dfas de edad.

En la figura 14 puede observarse el resultado de este experimento. Las incorporaciones de radioactividad son lineales para un máximo de 150-180 ug de proteína incubada por cavidad, tanto en corteza cerebral de 5 y 30 días.

Cuando se incuban 250 ug ó más de proteína, el principal fenómeno observado es una acidificación del medio de incubación que vira del rojo pálido al amarillo (rojo de fenol). Por lo tanto se establece un valor de proteína/cavidad menor o cercano a 180 ug para todos los experimentos realizados en estas condiciones.

### 3.10. Incorporación de tritio a proteína a partir de Leu-4,5 <sup>3</sup>H.

Con el fin de establecer las características de la incorporación de leucina a proteínas en las condiciones de incubación previamente establecidas, se realizaron los siguientes experimentos. Particulados de corteza cerebral de ratas de 5, 15 y 30 días (50-150 ug/cavidad) se incubaron a distintos tiempos hasta 3 horas con 5 uCi de Leu-4,5 <sup>3</sup>H/cavidad. Para cada tiempo de incubación se emplearon 3 cavidades. La proteína se procesó para medir radioactividad como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados pueden observarse en la figura 15a. Existe una incorporación lineal de leucina a proteína tanto para corteza cerebral de 5, 15 y

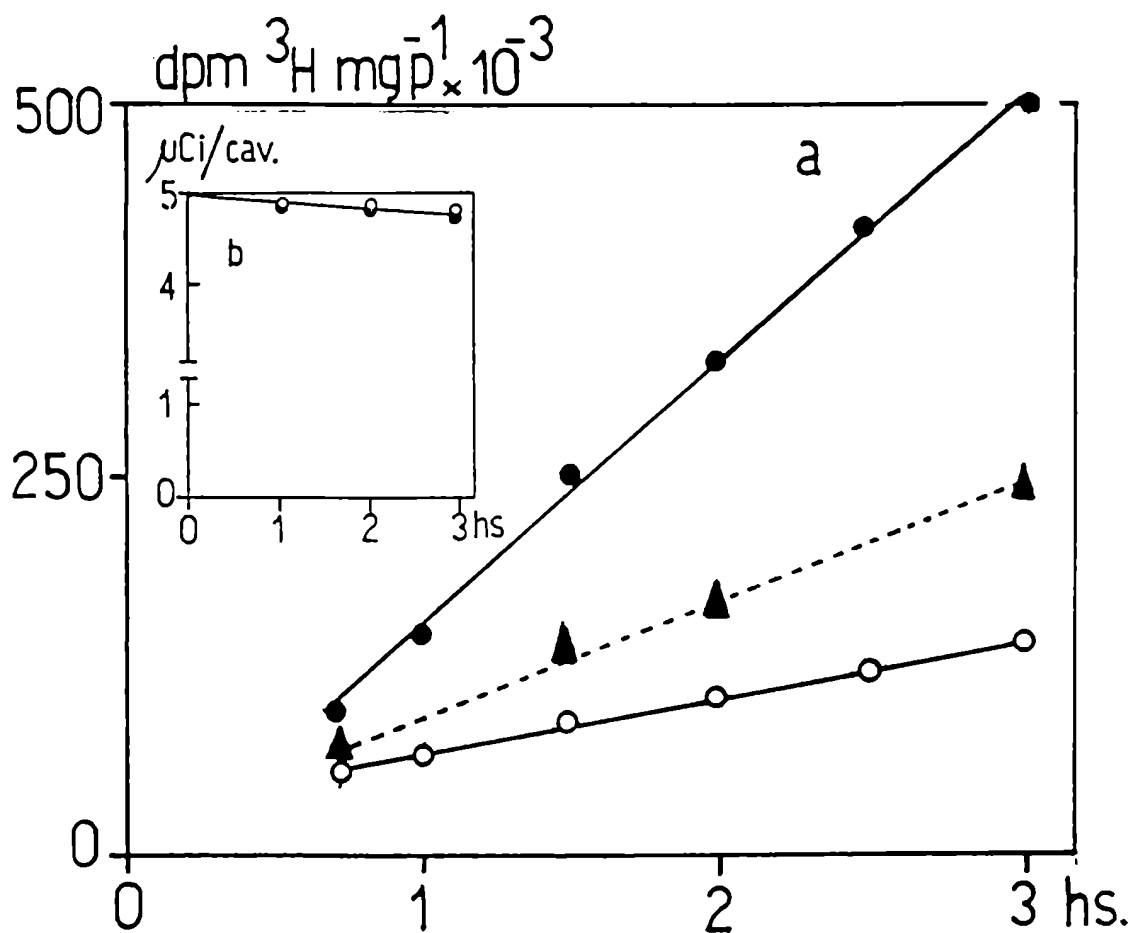


Figura 15: (a) incorporación de leucina-4,5 $^3\text{H}$  a la proteína en función del tiempo de incubación. Corteza cerebral de rata de 5 (●), 15 (▲) y 30 (○) días de edad. (b, inserto): desaparición del precursor radioactivo del medio de incubación.

30 días. Esta linealidad puede relacionarse con la sobrevida del tejido, ya que la velocidad de incorporación del aminoácido no se modifica durante las 3 horas de incubación.

Como un control de la oferta de radioactividad de Leu-4,5  $^3\text{H}$  durante la incubación, se realizaron los siguientes experimentos. Alícuotas del medio de incubación de cada cavidad correspondiente a corteza cerebral de 5 y 30 días empleada para determinar la incorporación de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a proteína se ensayaron para medir radioactividad. Se seleccionaron las cavidades que contenían  $150 \pm 15$  ug de proteína y se graficó la leucina remanente en el medio en función del tiempo de incubación. Puede observarse en la figura 15b (inserto) que la desaparición de leucina del medio de incubación disminuye muy poco luego de 3 horas de incubación, y por lo tanto los datos de incorporación de Leu- $^3\text{H}$  a proteína fueron obtenidos en condiciones de oferta casi constante del precursor.

3.11.1. Aumento de la incorporación de tritio en proteínas como función de la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa.

Con el objeto de estudiar la influencia sobre la actividad específica de  $^3\text{H}$  incorporado a proteínas (dpm mg P<sup>-1</sup>) a partir de cantidades variables de Man-2  $^3\text{H}$  en el

medio de incubación, se realizaron los siguientes experimentos.

Particulados de corteza cerebral de 5 y 30 días se incubaron con medios conteniendo entre 1 y 200 uCi/cavidad de Man-2  $^3\text{H}$  (AE = 133 Ci/g) y 50 ug/cavidad de glucosa por un período de 2 horas. El resto del procedimiento para la medición de  $^3\text{H}$ -proteína se siguió como se indica en Materiales y Métodos.

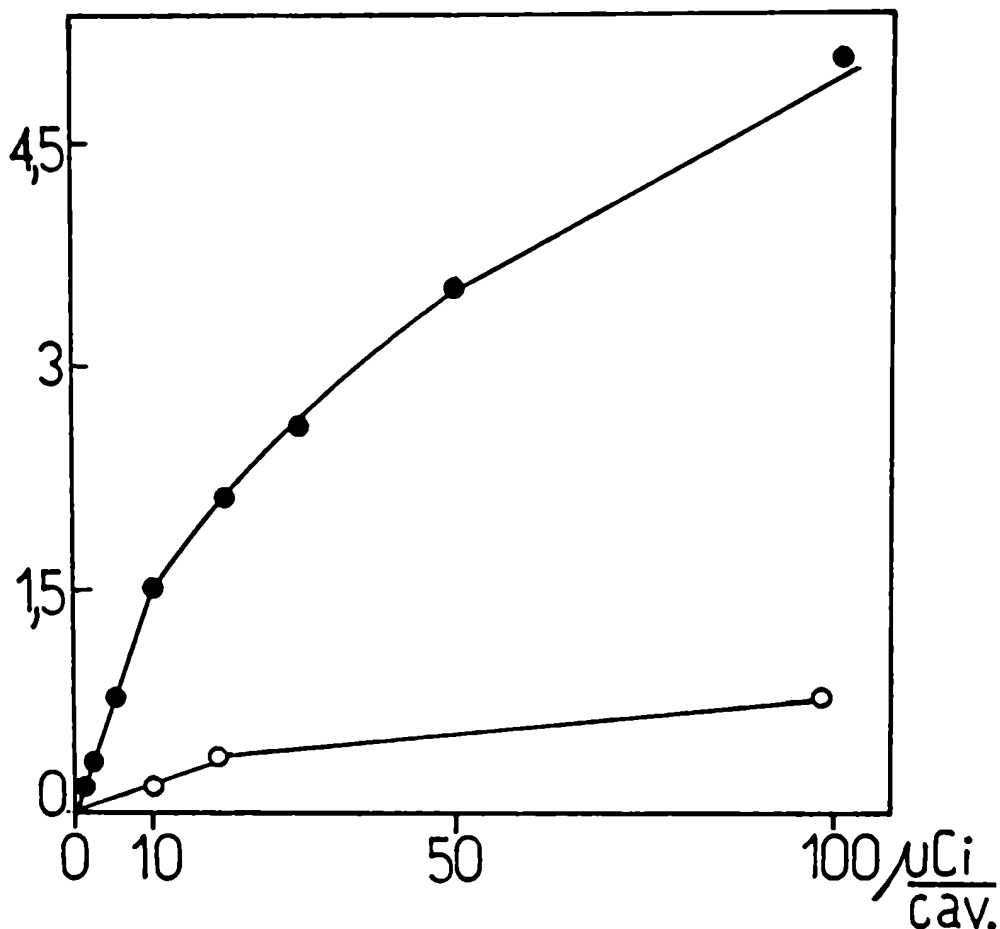
Como se puede observar en la Fig. 16a, los incrementos de actividad específica ( $^3\text{H}/\text{mgP}$ ) son directamente proporcionales a la cantidad de manosa- $^3\text{H}$  agregada al medio hasta 10 uCi. Desde ese valor en adelante, la linealidad se pierde. El fenómeno tiene lugar para corteza cerebral de 5 y 30 días.

3.11.2. Variación de la incorporación de tritio en proteínas como función de la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  de diferente actividad específica en ausencia de glucosa.

Para estudiar la dilución que introduce la presencia de glucosa en la actividad específica de los precursores marcados con Man-2  $^3\text{H}$ , se utilizó un medio de incubación que contiene 50 ug de Man-2  $^3\text{H}/\text{cav}$  de diferentes actividades específicas (0,2-16 Ci/g), en lugar de 50 ug de glucosa/cav.

Se utilizaron particulados de corteza cerebral de rata de 5 días y el procedimiento de incubación y medición

$10^{-5}$  dpm  $^3\text{Hmgp}^{-1}$



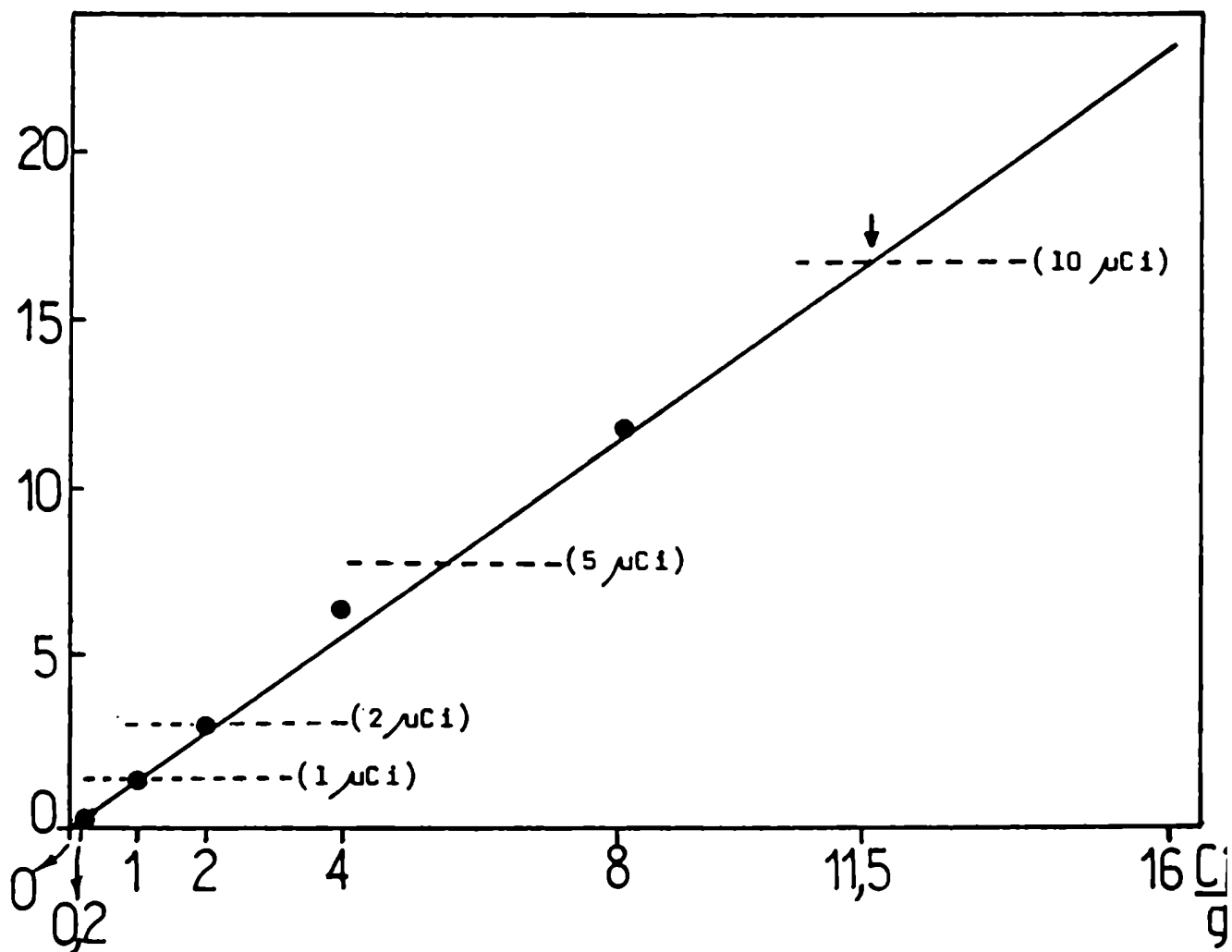
**Figura 16a:** incorporación de  $^3\text{H}$  a glicoproteínas en función de la cantidad de precursor Man- $2^3\text{H}$  (AE=133 Ci/g), agregado al medio de incubación que contiene glucosa (1 g/l). Tiempo de incubación 2 horas. Corteza cerebral de rata de 5 (●) y 30 (○) días de edad.

se realizó como se indica en la Sección 3.11.1.

Los resultados pueden observarse en la Fig. 16b. La cantidad de radioactividad incorporada a GP es directamente proporcional a la actividad específica del precursor en el medio de incubación. Esta proporcionalidad puede explicarse porque la masa total de manosa ofertada es igual en todos los casos, y por lo tanto, la incorporación de  $^3\text{H}$  es solo función de la actividad específica. En la misma figura (16b), se incluyen los valores de incorporación de  $^3\text{H}$  en GP obtenidos en presencia de glucosa como se describe en la Sección 3.11.1. y la intersección con la curva de incorporación obtenida sin glucosa permite determinar la dilución que experimenta la Man-2  $^3\text{H}$  (133 Ci/g) en los intermediarios involucrados en la biosíntesis de GP, cuando se emplea glucosa a niveles fisiológicos en el medio. Por ejemplo, para 10 uCi/cav. en presencia de glucosa, el valor de incorporación interseca al obtenido con Man-2  $^3\text{H}$  sin glucosa (flecha Fig. 16b), correspondiéndole una AE en los intermediarios de 11,5 Ci/g (abcisa, Fig. 16b), mientras que para 100 uCi/cav. (+ glucosa) debiera corresponderle 115 Ci/g de AE y una incorporación 10 veces mayor de  $^3\text{H}$  en GP. Sin embargo, en el último caso se obtiene 2,5 veces menos de incorporación (Fig. 16a), lo que correspondería a una AE en precursores de 50 Ci/g en lugar de 115 Ci/g. Por lo tanto,



$10^{-4} \text{ dpm } ^3\text{H mgp}^{-1}$



**Figura 16b:** incorporación de  $^3\text{H}$  a glicoproteínas en función de la actividad específica del precursor Man- $^{23}\text{H}$  (abscisa), cuando es el único azúcar presente en el medio de incubación en una concentración de  $1\text{g/l}$ . Tiempo de incubación = 2 horas. Corteza cerebral de rata de 5 días. Los valores puntuados se obtienen como se indicó en la Fig. 16a y entre paréntesis se indica el nivel de radioactividad de referencia. La flecha indica la intersección para la cual corresponde en abscisa el valor  $11,5 \text{ Ci/g}$ . Para detalles ver texto.

comparadas las actividades específicas de los precursores con la máxima de Man-2  $^3\text{H}$  (133 Ci/g), la dilución de esta última es de 11,5 veces para 10 uCi/cav. (+ glucosa) y de 2,6 veces para 100 uCi/cav. (+ glucosa). Igual sentido en las relaciones descriptas se obtiene para los valores intermedios (10 a 100 uCi/cav. + Glu) pero con magnitudes correlativas, mientras que por debajo de 10 uCi/cav. (+ Glu) las relaciones son totalmente lineales.

### 3.11.3. Incorporación de manosa- $^{14}\text{C}$ a glicoproteínas en presencia de glucosa.

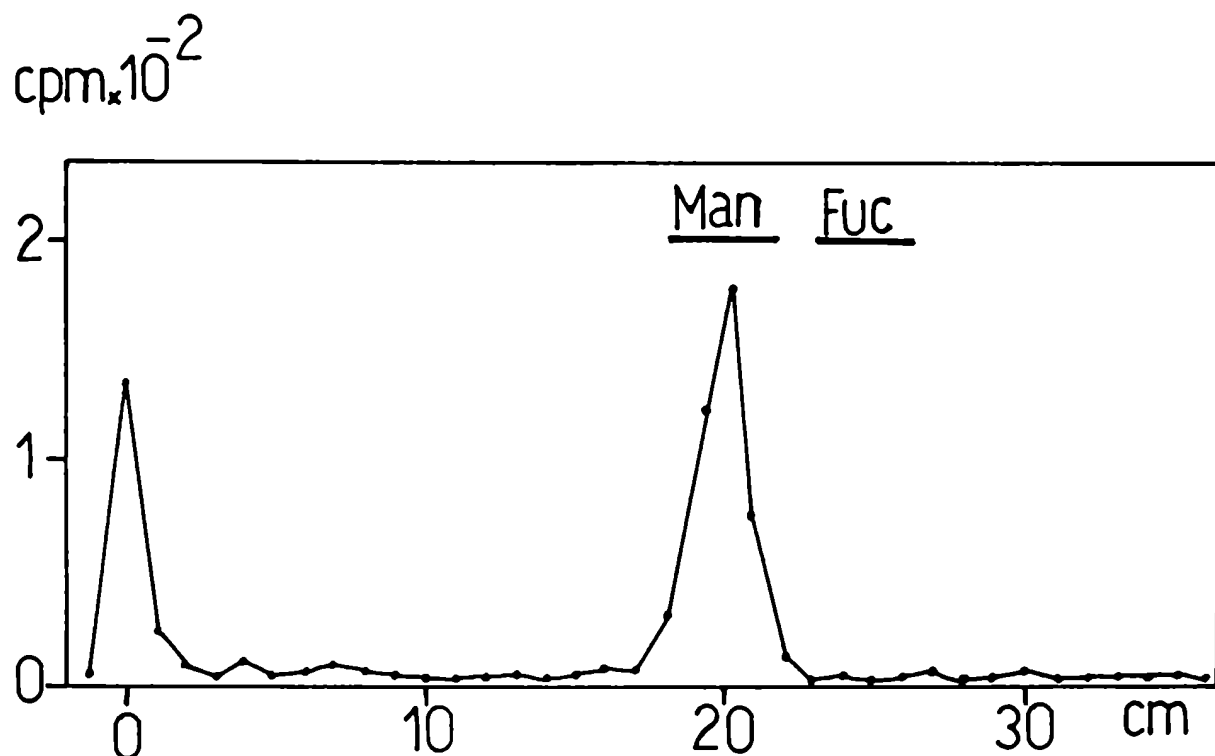
La Man-2  $^3\text{H}$  podría tener una dilución adicional a la calculada en la Sección 3.11.2., que pudiera estar relacionada con la posición del  $^3\text{H}$  en el C-2 de la manosa. Esta última característica podría producir dilución si el equilibrio a nivel de la enzima fosfomanosa isomerasa (E-Man-6-P: E-Fru-6-P) fuera muy significativo. Para estudiar esta posibilidad se incubó por un período de 2 horas particulado de corteza cerebral de rata de 5 días en presencia de glucosa (1 g/l) y con igual masa de Man- $^{14}\text{C}$  (AE = 1,19 Ci/g) que la correspondiente a 10 uCi de Man-2  $^3\text{H}$  y se determinó la incorporación de  $^{14}\text{C}$  en glicoproteínas. El promedio de los resultados obtenidos de dos experimentos (667 y 725 dpm mg P $^{-1}$ /2 h) cada uno realizado con 8 cavidades, permite calcular una masa de azúcares en la glicoproteína

correspondiente a  $1,7 \text{ ng mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , valor que se compara con el obtenido en iguales condiciones de incubación, pero en presencia de Man-2  $^3\text{H}$  ( $1,75\text{-}2,9 \text{ ng mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , Sección 3.16.). En ambos casos, los cálculos se realizaron previa corrección de las actividades específicas de los precursores y asumiendo una dilución de 11,5 como se indica en la Sección 3.11.2. Este experimento sugiere que no existe una dilución inherente a la posición de la marca cuando se utiliza Man-2  $^3\text{H}$ .

De incubaciones realizadas con Man- $^{14}\text{C}$  como se indicó más arriba, pudo obtenerse de la cromatografía del producto TCA caliente insoluble solamente manosa (Fig. 16c), lo que sugiere que el precursor se comporta de manera semejante a la Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa (1 g/l).

### 3.12. Cinética de incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2 $^3\text{H}$ en función de la oferta de azúcares en el medio de incubación.

Con la finalidad de establecer el efecto de las diferentes relaciones de azúcares presentes en el medio de incubación sobre la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de Man-2  $^3\text{H}$ , se realizaron los siguientes experimentos. Se incubaron en diferentes condiciones particulados de corteza cerebral de 5 días a distintos tiempos hasta 3 horas. En



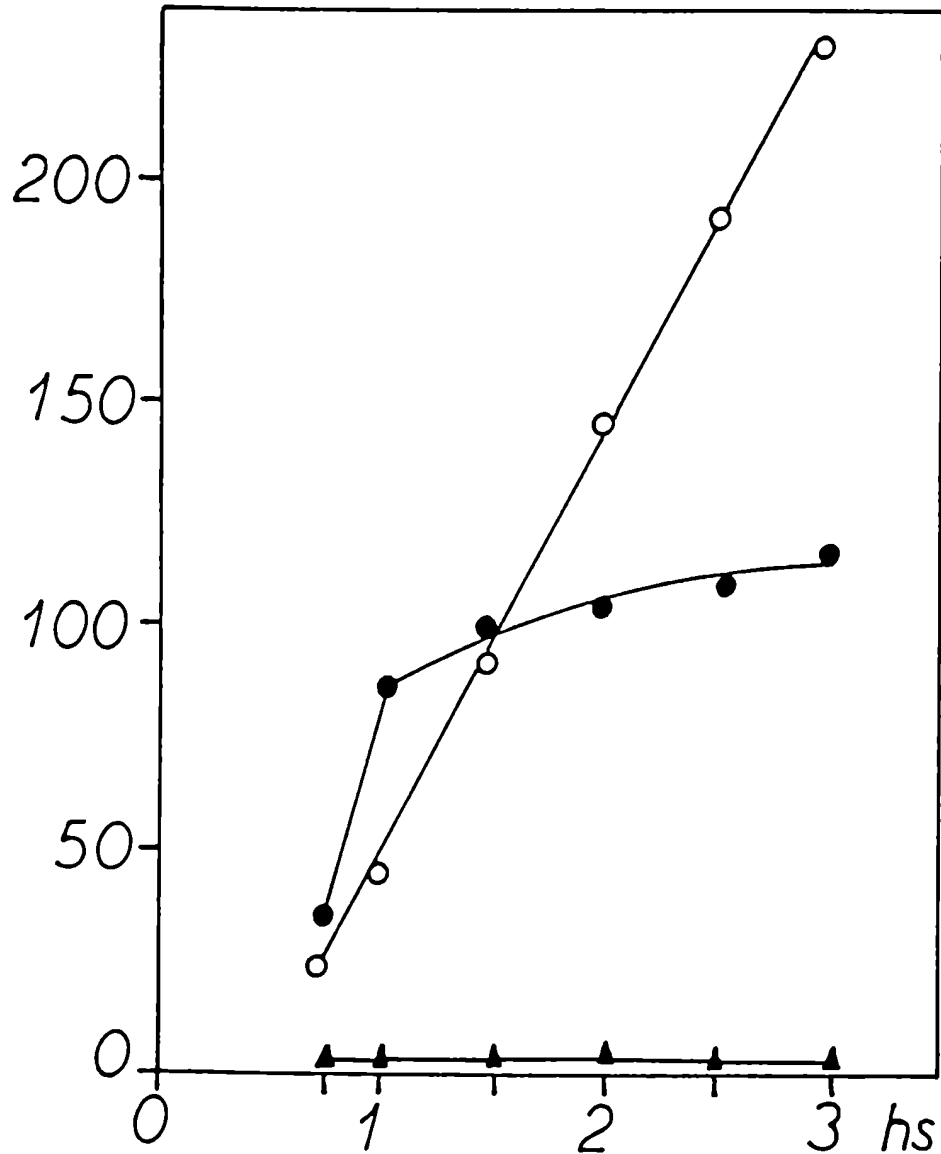
**Figura 16c:** radiocromatograma del hidrolizado ácido de la fracción insoluble en TCA caliente, que se obtiene de particulado de corteza cerebral de rata de 5 días incubada durante 2 horas con Man- $^{14}\text{C}$  (76 ng/cav., AE=1,19 Ci/g) en presencia de glucosa (50  $\mu\text{g}$ /cav.). La cromatografía se realizó durante 27 horas empleando el sistema de solventes A. Las barras indican la posición de estándares externos. El pico que se observa en el origen corresponde a compuestos no hidrolizados e insolubles en agua, que fueron transferidos al papel durante la siembra.

todos los casos se trabajó en las condiciones establecidas más arriba para lograr linealidad ( $150 \pm 15$  ug P/cav., 10 uCi Man-2  $^3\text{H}$ /cav. y 50 ul medio/cav.). A los tiempos correspondientes se tomaron alícuotas para medir Man-2  $^3\text{H}$ , las incubaciones se detuvieron y el material se procesó como se indica en Materiales y Métodos para medición de radioactividad en proteína y la cantidad de proteína incubada. Se emplearon 2 cavidades por punto experimental.

Los resultados pueden observarse en las figuras 13 y 17. En la Fig. 17 se muestra que cuando el medio de incubación contiene glucosa en cantidad fisiológica (1 g/l), la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína procede linealmente. Asimismo, en la Fig. 13 se verifica que la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  durante las 3 horas de incubación decrece muy poco.

Por otro lado, la figura 17 también muestra que no existe incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína, cuando la manosa (1 g/l) sustituye a la glucosa. En este caso también se verifica que la manosa disminuye en el medio al igual que la glucosa (sección 3.5.). Finalmente se puede ver en la misma Fig. 17 el efecto de una concentración muy baja de glucosa en el medio de incubación (0,05 g/l en lugar de 1 g/l). A los 45 minutos la incorporación es algo mayor que en la presencia de glucosa, pero a partir de 1 hora de incubación existe una detención de la incorporación, y también las pen-

$10^{-3} \times \text{dpm mg p}^{-1}$



**Figura 17:** cinética de incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de  $\text{Man-}2^3\text{H}$  ( $10 \mu\text{Ci/cav.}$  en todos los casos) en función del tiempo de incubación. Corteza cerebral de 5 días. Medio de incubación con glucosa en concentración fisiológica de  $1 \text{ g/l}$  (○). Medio de incubación con manosa ( $1 \text{ g/l}$ ) y sin glucosa (▲) y medio de incubación con baja concentración de glucosa ( $0,05 \text{ g/l}$ ), (●).

dientes difieren de la del control. Estos datos se corresponden con el notable decaimiento de la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  en el medio de incubación, como se puede observar en la Fig. 13.

Por lo descripto, queda establecida la necesidad absoluta de la presencia de glucosa a concentración fisiológica en el medio de incubación para que la cinética de incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de Man-2  $^3\text{H}$  proceda linealmente en las condiciones descriptas en esta tesis.

### 3.13. Experimentos de "pulso" de marcación y "chase" a partir de Man-2 $^3\text{H}$ .

Con la finalidad de investigar si la cantidad de marca unida a proteína está sujeta a cambios independientes de la incorporación durante la incubación, se procedió como sigue. Se realizó una incubación de particulado de corteza cerebral en las condiciones descriptas más arriba para lograr una cinética de incorporación lineal. Luego de un pulso de 1 hora con Man-2  $^3\text{H}$ , se procedió a efectuar una remoción de la marca como se indica en Materiales y Métodos, y la incubación se completó a distintos tiempos hasta 3 horas ("chase"). Para cada punto experimental se emplearon 2 cavidades. Asimismo se verificó la desaparición de glucosa durante todo el período de la incubación. Estos resultados

son del orden de 18 y 33 ug Glu mg p<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para corteza cerebral de 5 y 30 días respectivamente y se corresponden con los descriptos anteriormente (Fig. 9), lo que indica que el tejido continúa incorporando glucosa a la misma velocidad después del "chase".

Los resultados para corteza cerebral de 5 y 30 días de edad pueden observarse en la figura 18 e indican que la cantidad de radioactividad en la GP no se modifica durante el período de "chase".

#### 3.14. Caracterización de productos.

Con el objeto de establecer la naturaleza de los productos formados a partir de Man-2 <sup>3</sup>H en condiciones de incorporación lineales, se procedió a efectuar los siguientes análisis: labilidad a proteasa y al álcali e identificación cromatográfica de carbohidratos tritiados, como se indica en Materiales y Métodos. Los materiales incubados fueron: particulado de corteza cerebral de 5 días (150 ug P/cav., 5 cav. con 10 uCi de Man-2 <sup>3</sup>H/cav. y 1 cav. con 100 uCi de Man-2 <sup>3</sup>H) y de 30 días (150 ug P/cav., 12 cav.). Se emplearon más cavidades en el caso de corteza cerebral de 30 días debido a la menor incorporación de <sup>3</sup>H en proteína que para 5 días. En los dos casos (5 y 30 días) se incubó durante 2 horas. Los resultados obtenidos pueden observarse



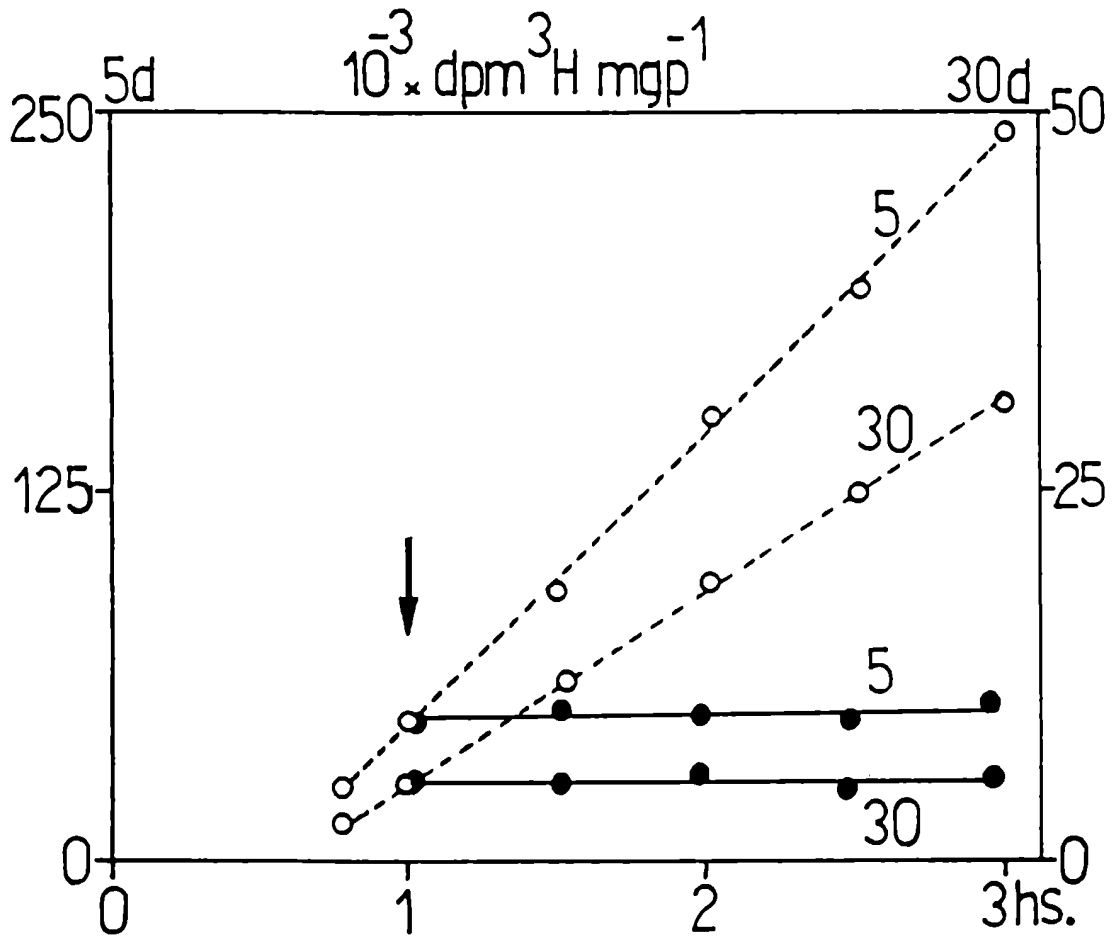


Figura 18: actividad específica de <sup>3</sup>H incorporado a proteína a partir de Man-2<sup>3</sup>H en función del tiempo de incubación. Luego de un pulso de marcación de 1 hora el medio de incubación se reemplaza por otro libre de radioactividad (flecha). Incorporación de radioactividad a la proteína sin "chase" (○) y radioactividad remanente en la proteína después del "chase" (●). Los números junto a cada curva indican la edad de la corteza cerebral ensayada.

en la tabla I y en la figura 19. En todos los casos, se obtuvo manosa en la cromatografía de los productos lábiles al ácido.

### 3.15. Cinética de la glicosilación de proteínas durante el desarrollo de la corteza cerebral de la rata.

Particulados provenientes de 3 cortezas cerebrales para cada edad, entre -3 y 30 días, se incubaron en las condiciones óptimas antedichas (aprox. 150 ug P/cav., 10 uCi Man-2  $^3\text{H}$ /cav. en 50 ul medio/cav.), a distintos tiempos hasta 2 horas. Para cada punto experimental se emplearon dos microcavidades, las incubaciones se detuvieron y la actividad específica de  $^3\text{H}$ /mg P se determinó como se indica en Materiales y Métodos.

En la figura 20 pueden apreciarse los resultados obtenidos para las diferentes edades, que presentan las siguientes características: a) los valores absolutos de las actividades específicas son inversamente proporcionales a la edad postnatal, y b) las pendientes de las rectas varían en el mismo sentido que los valores absolutos y expresan la velocidad relativa de glicosilación para cada edad. Esta velocidad no es un valor absoluto sino que depende de la actividad específica de los precursores y, por lo tanto, no puede compararse sobre una base estricta para las distintas

Tabla I: Caracterización del producto  $^3\text{H}$ -proteína insoluble en TCA caliente, luego de una incorporación a partir de Man-2  $^3\text{H}$  durante 2 horas en condiciones de linealidad.

Corteza cerebral (días)	Proteólisis			Tratamiento NaOH, 0,05 N, 24 hs, 25°C			Tratamiento NaOH 1 N, 2 hs a 25°C		
	lábil (%)	resistente (%)	recuperación (%)	lábil (%)	resistente (%)	recuperación (%)	lábil (%)	resistente (%)	recuperación (%)
5	97	3	79	2,5	97,5	95	3,3	96,7	97
30	96	4	82	1,8	98,2	96	3	97	98

Los valores en % de las fracciones lábil y resistente se obtienen considerando 100% la suma de la radioactividad medida en cada caso. La recuperación se calcula como sigue:

Recuperación (%):  $100 \frac{(\text{cpm producto inicial} - \text{cpm lábiles} - \text{cpm resistentes})}{\text{cpm producto inicial}} - 1$ .

Detalles de los procedimientos se indican en Materiales y Métodos (Sección 2.15.4.).

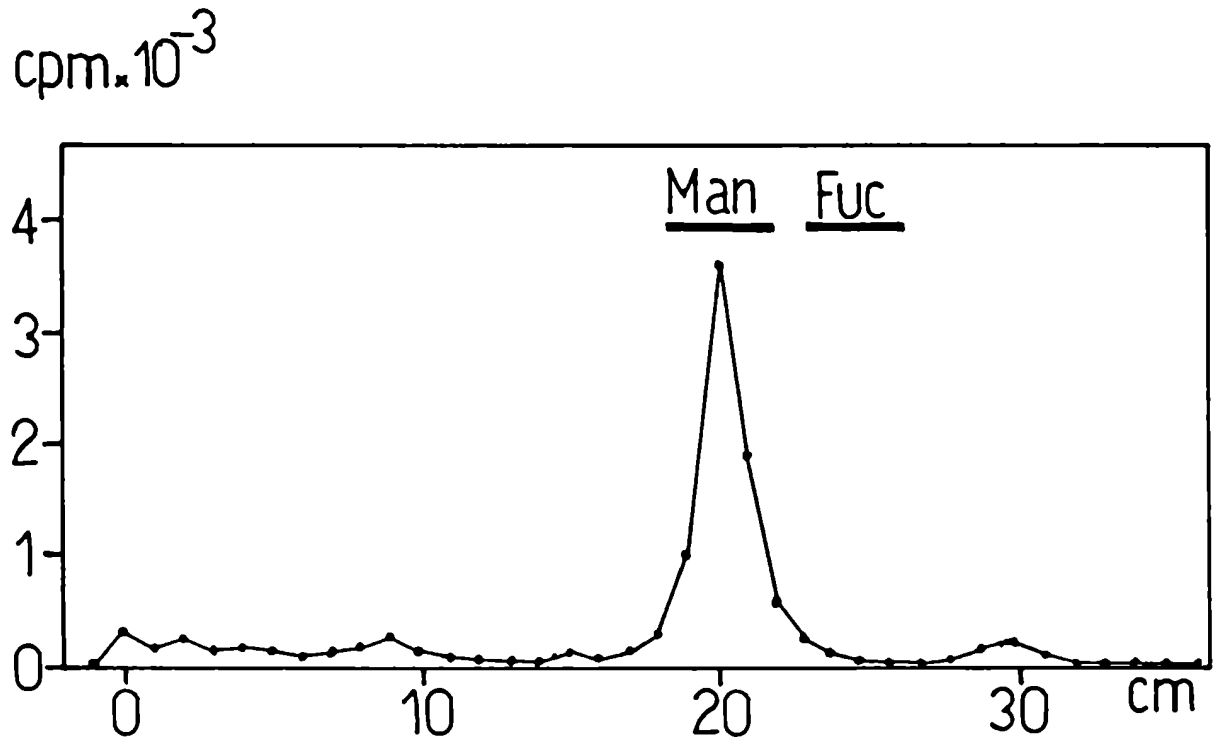
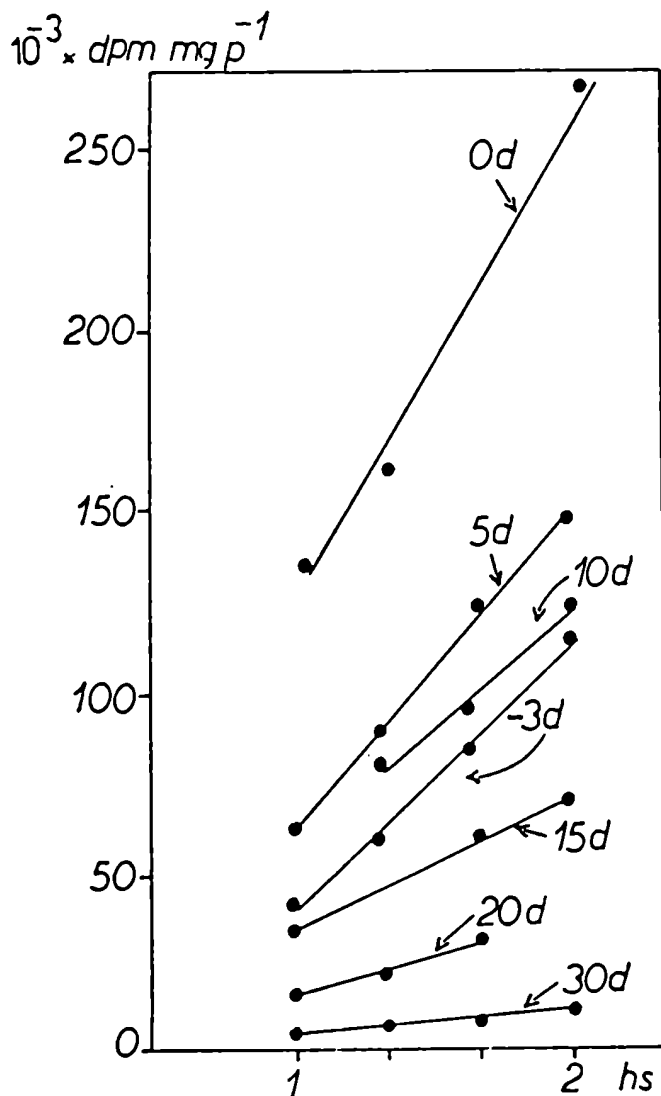


Figura 19: radiocromatograma del hidrolizado ácido de la fracción insoluble en TCA caliente, que se obtiene de particulado de corteza cerebral de rata de 5 días incubado por 2 horas con  $100 \mu\text{Ci/cav.}$  de  $\text{Man-}^{23}\text{H}$  en presencia de glucosa ( $50 \mu\text{g/cav.}$ ). La cromatografía se realizó durante 27 horas empleando el sistema de solventes A. Las barras indican la posición de los estándares externos.



**Figura 20:** cinética de glicosilación de proteínas a partir de Man- $^{23}\text{H}$  en condiciones de estado estacionario de marcación durante el desarrollo de la corteza cerebral de la rata.

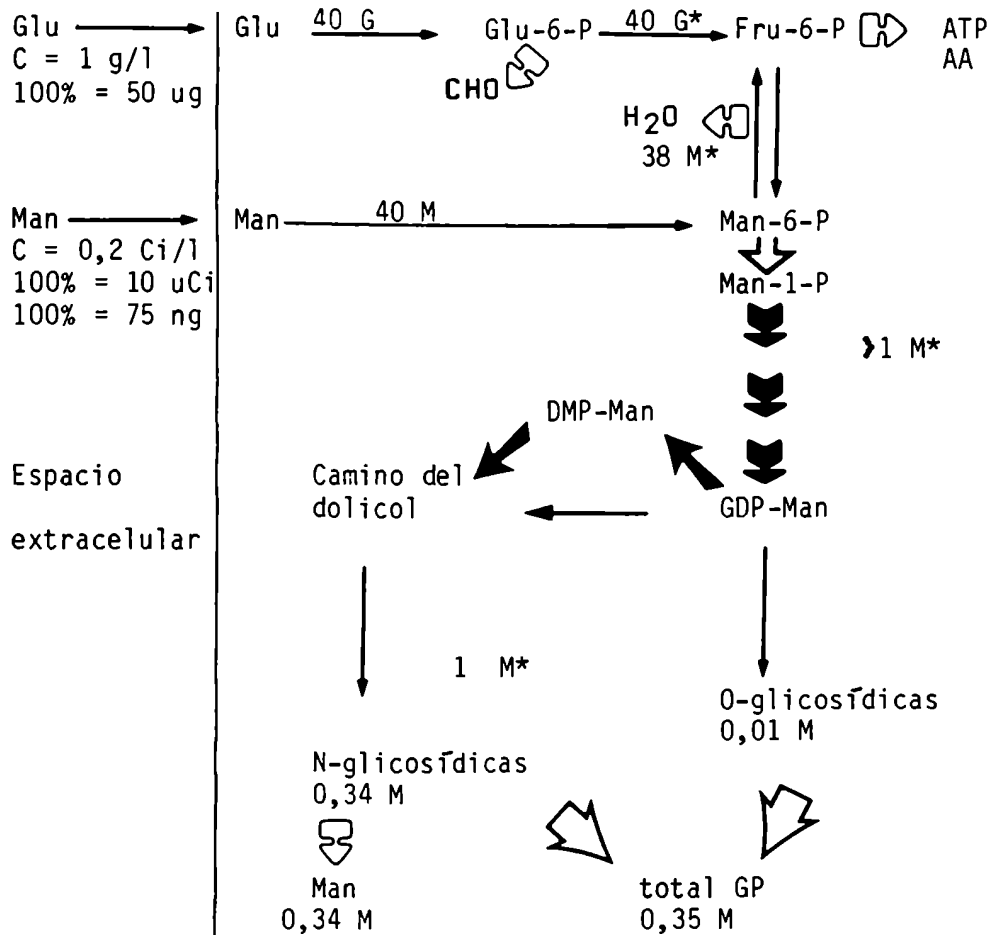
El mismo patrón se obtiene cuando la marcación se realiza a partir de 76 ng de Man- $^{23}\text{H}$  (133 Ci/g) en presencia de glucosa (1 g/l) o a partir de Man- $^{23}\text{H}$  (2 Ci/g) a razón de 1 g/l en ausencia de glucosa. La figura ilustra el primer caso.

edades (50).

3.16. Parámetros cuantitativos de la vía de marcación de glicoproteínas a partir de Man-2 <sup>3</sup>H en presencia de concentración fisiológica de glucosa.

En el Esquema V, se resumen los hallazgos referidos a la vía completa de marcación de glicoproteínas en la corteza cerebral de rata de 5 días. Los datos fueron obtenidos en estado estacionario de marcación, por lo cual puede estimarse el flujo de marca a través de diversos precursores desde el medio de incubación hasta los productos finales. En el mismo esquema, puede observarse que la actividad específica de los productos dependerá principalmente de la dilución de la marca a nivel de Man-6-P. Como se ha establecido en la Sección 3.11.2., en las condiciones de marcación empleadas para la confección del Esquema V, la actividad específica de <sup>3</sup>H en Man-6-P es del orden de 1/11,5 de la AE de Man-2 <sup>3</sup>H (133 Ci/g) y, por lo tanto, la masa neta de manosa transferida a GP resultaría de 1,7-2,9 ng mg P<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Esquema V: Diagrama de flujo y distribución de precursores desde el medio de incubación a las glicoproteínas biosintetizadas en condiciones de estado estacionario de marcación de corteza cerebral de rata de 5 días.



Todos los valores expresados en % mg P<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de la cantidad de glucosa (G) o manosa-2 <sup>3</sup>H (M), presentes inicialmente en el medio de incubación. Los números con (\*) son valores máximos calculados. El resto se obtiene de los resultados experimentales.

3.17. Efecto de la estreptomicina sobre la cinética de incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2 <sup>3</sup>H en la corteza cerebral de rata inmadura.

Los experimentos destinados a establecer el efecto de la estreptomicina se realizaron incubando en las condiciones estándar, particulado de corteza cerebral de rata de 5 días ( $150 \pm 15$  ug proteína/cavidad, 10 uCi Man-2 <sup>3</sup>H cav. en 50 ul/cav. medio de incubación). El medio de incubación utilizado se adicionó con estreptomicina (Sm) en el momento de uso para una concentración final de 100 ug/ml, como se indica en Materiales y Métodos. Las incubaciones se realizaron a distintos tiempos hasta 3 horas. Como puede observarse en la Fig. 21 a partir de los 90 minutos, existe una alteración en la linealidad de la incorporación de <sup>3</sup>H a proteína. En la misma figura, se incluye un control de corteza cerebral de 5 días incubada con medio sin Sm. La alteración de la incorporación de Man-2 <sup>3</sup>H a proteína se observó con dosis de Sm de 50 ug/ml para la corteza cerebral de 5 días. A esta última dosis la incorporación de radioactividad a proteína de corteza cerebral de 15 días no resultó inhibida durante las 3 horas de incubación (resultados no mostrados).



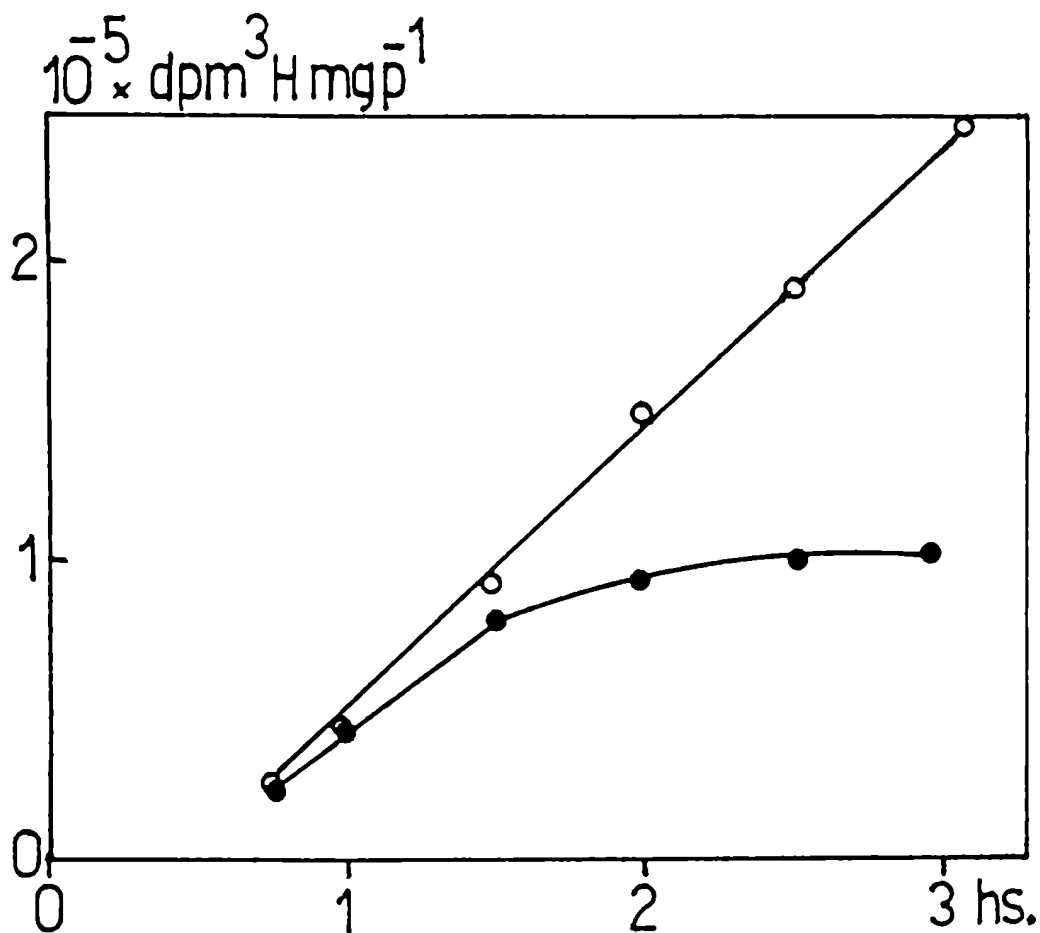


Figura 21: efecto de la estreptomina sobre la cinética de glicosilación de proteínas a partir de Man- $2^3\text{H}$  en condiciones de estado estacionario de marcación. Corteza cerebral de rata de 5 días de edad. Ordenada: actividad específica de  $^3\text{H}$  incorporado a proteína; abcisa: tiempo de incubación. Incorporación con medio de incubación normal ( $\circ$ ) y cuando se agrega desde el inicio 100  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomina ( $\bullet$ ).

3.18. Utilización de glucosa y Man-2 <sup>3</sup>H del medio de incubación durante los ensayos del efecto de la estreptomycinina.

Con la finalidad de evaluar si la inclusión de Sm en los medios de incubación altera las incorporaciones de glucosa y/o Man-2 <sup>3</sup>H al tejido, se procedió a medir la desaparición de los azúcares del medio de incubación. Las mediciones se realizaron en diferentes condiciones. Por un lado se midieron los carbohidratos remanentes en el medio a las 2 y 3 horas de incubación en las condiciones en que se ensayó el efecto de la Sm ( $150 \pm 15$  ug proteína/cavidad). Por otro lado se incubaron con Sm cantidades de proteína mayores ( $350 \pm 35$  mg P/cav.) durante 1, 2 y 3 horas. Esto último se realizó para aumentar la precisión de las determinaciones al conseguirse una mayor diferencia entre las cantidades de los compuestos medidos en el medio antes y después de la incubación. Las determinaciones se efectuaron para 2 cavidades por separado en cada caso. En todos los casos se calculó la desaparición de glucosa y Man-2 <sup>3</sup>H (ug Glu mg P<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> y uCi Man-2 <sup>3</sup>H mg P<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y los resultados se indican en la Fig. 22, donde puede observarse que los valores de desaparición de glucosa y de Man-2 <sup>3</sup>H en presencia de Sm difieren poco de los obtenidos para corteza

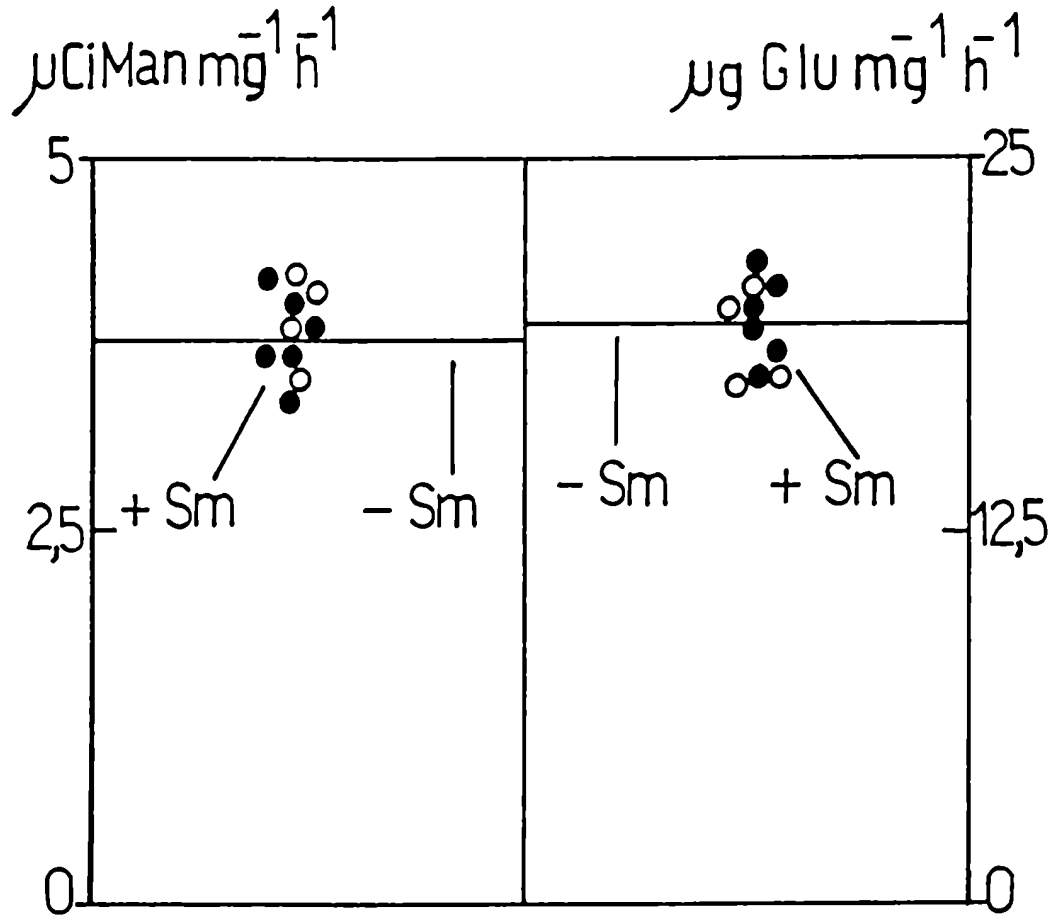


Figura 22: desaparición de manosa- $2^3\text{H}$  y glucosa de los medios de incubación cuando se incuba corteza cerebral de rata de 5 días en presencia de estreptomicina (Sm) a razón de  $100 \mu\text{g/ml}$  y en ausencia del antibiótico, como se indica en la figura. Los consumos se refieren a mg de proteína por hora de incubación. Incubaciones de 2 y 3 horas con aprox.  $150 \mu\text{g}$  proteína/cavidad (O) y por 1, 2 y 3 horas con aprox.  $350 \mu\text{g}$  proteína/cavidad (●). Los valores de control (-Sm) se obtienen de las figuras 7, 9, 11 y 12.

cerebral de 5 días incubada sin el antibiótico y la variación de la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  y glucosa es de  $\pm 15\%$  de la media para las diversas condiciones de medición de los azúcares.

Por lo expuesto, el efecto observado de la Sm sobre la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína a partir de Man-2  $^3\text{H}$  no se relaciona directamente con alteraciones en la incorporación del precursor radioactivo ni de la glucosa.

3.19. Efecto de la estreptomycin sobre la incorporación de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a proteína en la corteza cerebral de rata de 5 días.

Con el objeto de evaluar la afectación de la síntesis proteica por la Sm, se procedió a medir la cinética de incorporación de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a proteína en presencia del antibiótico (100 ug/ml del medio de incubación). Se incubó a distintos tiempos hasta 3 horas en las condiciones estándar (150  $\pm$  15 ug P/cav., 5 uCi Leu-4,5  $^3\text{H}$ /cav. y 50 ul medio + Sm/cav.).

El resultado puede observarse en la Fig. 23, donde se incluye como referencia la cinética de incorporación de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a proteína obtenida sin el antibiótico. Según estos datos, la incorporación del aminoácido a la proteína no se encuentra alterada.

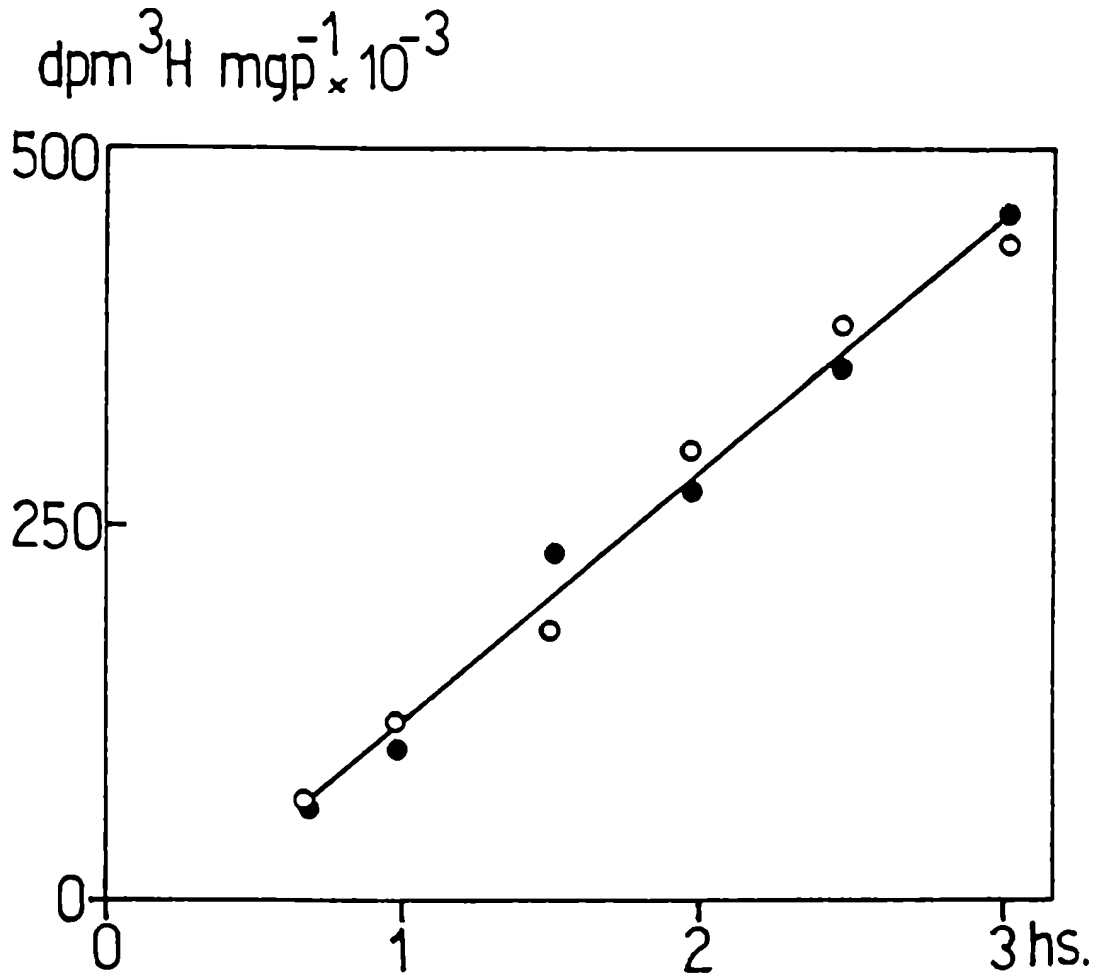


Figura 23: efecto de la estreptomina sobre la incorporación de Leu-4,5 $^3\text{H}$  a proteína. Ordenada: actividad específica de  $^3\text{H}$  incorporado a proteína; abcisa: tiempo de incubación. Incorporación en presencia de 100  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de estreptomina (●) y en ausencia del antibiótico (O). Corteza cerebral de rata de 5 días de edad.

3.20. Medición de lípido-azúcares intermediarios del camino del dolicol, durante la incubación de corteza cerebral de rata de 5 días con estreptomycin.

Con la finalidad de explorar la detención de la incorporación de  $^3\text{H}$  a proteína, a partir de Man-2  $^3\text{H}$  desde el punto de vista de un posible bloqueo del camino del dolicol inducido por el antibiótico, se realizó el siguiente experimento. Particulado de corteza cerebral de rata de 5 días se incubó en las condiciones estándar (150 ug proteína/cavidad, 50 ul volumen final) empleando un medio de incubación en el que la glucosa (50 ug/cav.) fue totalmente sustituida por glucosa- $^{14}\text{C}$  de alta actividad específica, como se indica en Materiales y Métodos. En un caso se incubó con Sm (Cf = 100 ug/ml) y en otro, sin el antibiótico, que se consideró el control. Se incubaron 5 cavidades para cada situación durante un período de 150 minutos. Al finalizar la incubación, el material se procesó para la obtención y análisis cromatográfico de oligosacáridos derivados de los lípido-azúcares intermediarios como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados de la cromatografía se muestran en la Fig. 24 y permiten observar un aumento de las fracciones que migran como:

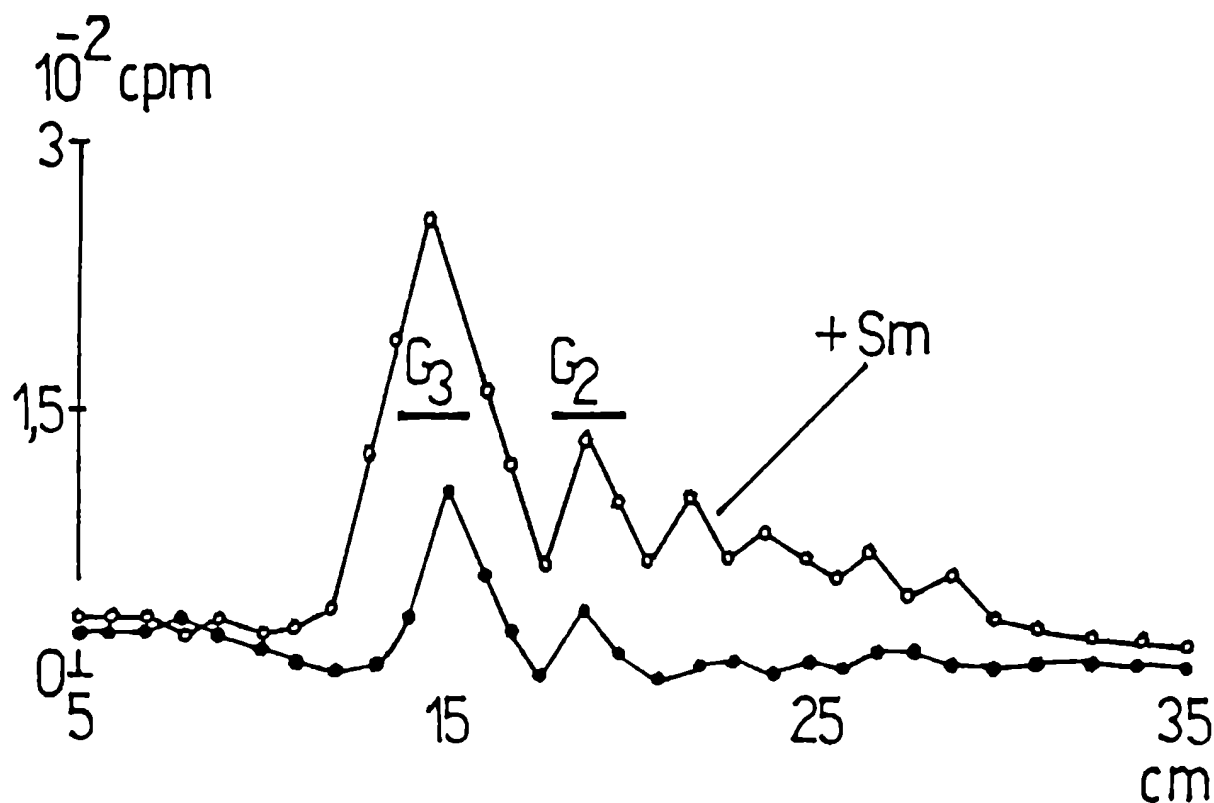


Figura 24: radiocromatograma de los productos ácido lábiles de la fracción extraíble en el sistema de solventes H y que provienen de incubaciones en condiciones de estado estacionario de marcación en las que la glucosa del medio fue reemplazada por igual masa de Glu- $^{14}$ C. Los marcadores externos de la cromatografía son: G3 = Glu<sub>3</sub>Mang(NAcGluNH)<sub>2</sub> y G2 = Glu<sub>2</sub>Mang(NAcGluNH)<sub>2</sub>. Corteza cerebral de rata de 5 días incubada en presencia de 100  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomina (Sm), (O) y control, incubado sin antibióticos (●).

G<sub>3</sub>: (NAcGluNH)<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glu<sub>3</sub> y

G<sub>2</sub>: (NAcGluNH)<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glu<sub>2</sub> en el caso de las incubaciones realizadas en presencia de Sm con respecto al control incubado sin antibiótico. Este resultado indica que la transferencia de G<sub>3</sub> oligosacárido a la proteína (Fig. 2, paso 6) podría encontrarse afectada por la Sm y permite descartar la inhibición en la síntesis de intermediarios del camino del dolicol en etapas previas a la de transferencia de oligosacárido a proteína como causa primaria de la falta de transferencia de <sup>3</sup>H a proteína observada cinéticamente cuando se incuba con Man-2 <sup>3</sup>H (Fig. 21).

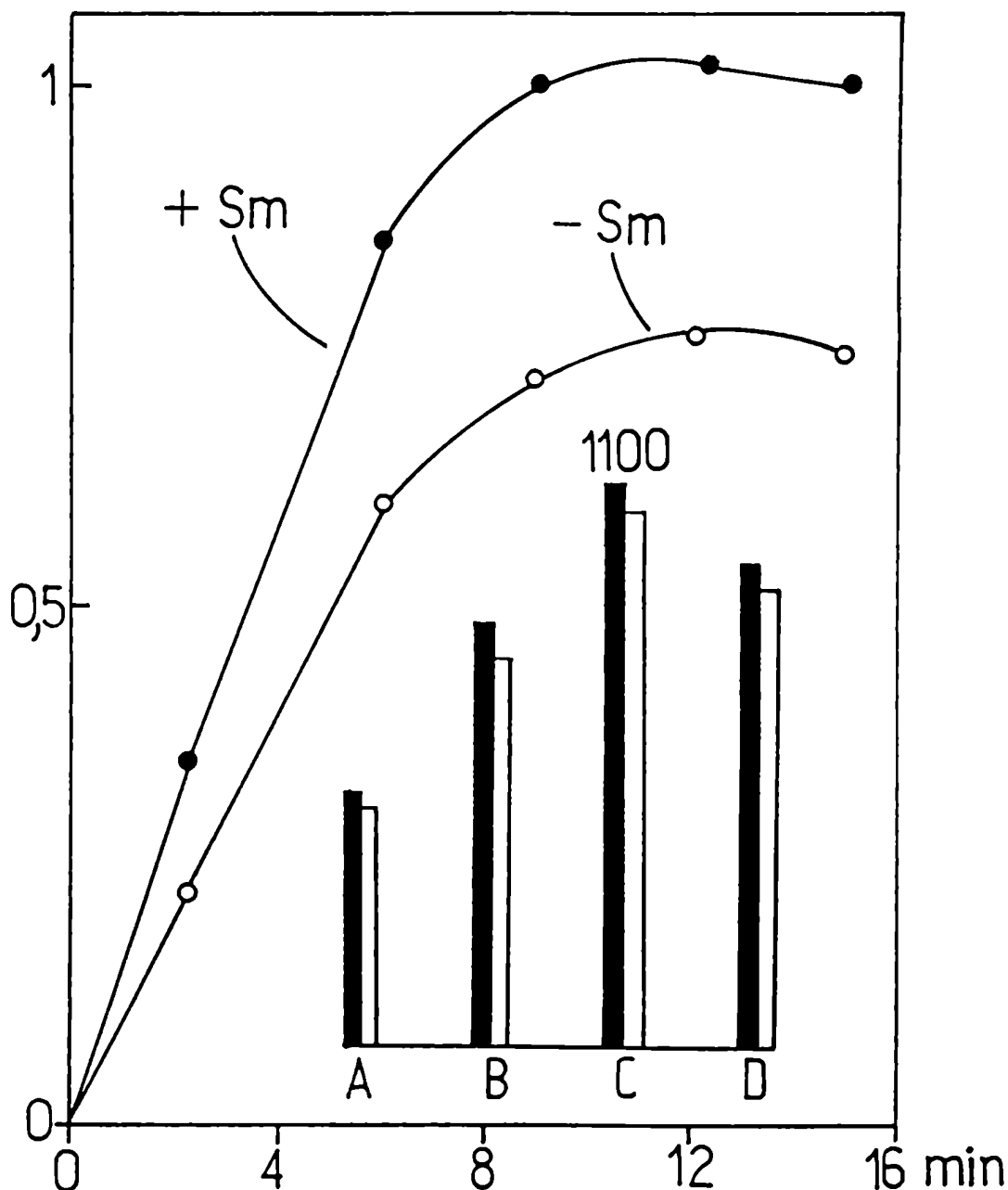
3.21. Efecto de la Sm sobre la actividad de la enzima dolicol-P-P-G<sub>3</sub>-oligosacárido: proteína oligosacaril transferasa.

Con el objeto de explorar si la falta de transferencia de Glu<sub>3</sub>-oligosacárido (observada en el tejido incubado en presencia de Sm), pudiera deberse a un efecto de la Sm sobre la transferasa, se procedió a determinar in vitro la actividad de la enzima en ausencia y presencia del antibiótico, como se indica en Materiales y Métodos (sección 2.6.2.).

En la Fig. 25 puede observarse que la cantidad óptima de detergente es igual en ambos casos. La misma figura muestra que la Sm no altera significativamente la velocidad



inicial y, por lo tanto, la Sm como tal no tendría efecto sobre la enzima.



**Figure 25:** efecto de la estreptomicina (Sm) sobre la actividad de la enzima dolicol-P-P-oligosacárido:proteína transferasa *in vitro*. Las barras indican el óptimo de concentración de detergente para máxima actividad. Barras oscuras (+ Sm), barras claras (- Sm). Las concentraciones de detergente en el medio de incubación son: A = 3,8 mg/ml, B = 7,5 mg/ml, C = 11,3 mg/ml y D = 15 mg/ml. La actividad de la enzima fue ensayada a la concentración indicada en C de Tritón X-100, para la fracción microsomal de la corteza cerebral de rata de 5 días. La Sm agregada corresponde a la empleada en las incubaciones de particulado de corteza cerebral, sobre la base de la cantidad de proteína.

### 3.22. Detección de algunos compuestos orgánicos por tratamiento térmico en papel.

Los siguientes experimentos fueron llevados a cabo a fin de profundizar el fenómeno de detección y recuperación de compuestos por el procedimiento térmico-UV desarrollado en esta tesis.

El primer grupo de experimentos se llevó a cabo usando 1  $\mu\text{mol}$  de compuestos orgánicos estándar. En todas estas instancias, la cromatografía descendente en papel se realizó con los sistemas de solventes indicados durante 4 hs. Los papeles se secaron con aire y se revelaron planchándolos a  $230^{\circ}\text{C}$  con una plancha doméstica. Después de 30 segundos se observaron manchas oscuras en las zonas correspondientes a las sustancias cromatografiadas. Fue posible continuar calentando hasta obtener un contraste máximo.

La glucosa, por ejemplo, que tiene una temperatura de descomposición de  $146^{\circ}\text{C}$  dio una mancha de color marrón detectable a  $230^{\circ}\text{C}$ . En contraste, la matriz de celulosa del papel, que se descompone a  $260^{\circ}\text{C}$ , no dio ningún color. Esta diferencia entre la celulosa y otros compuestos con temperaturas de descomposición por debajo de  $260^{\circ}\text{C}$  constituye el fundamento físico del método propuesto. Podría entonces predecirse la detección de una sustancia dada como se demuestra en la tabla II.

Tabla II: Detección de algunos compuestos orgánicos por tratamiento térmico.

Sustancia ensayada	Temperatura de descomposición u oscurecimiento (°C)*	Detección predicha	Detectado experimentalmente	Sistema de solventes
Celulosa	260-270			A, B, C, D, E, F
Glucosa	146	+	+	A, B, C
Glucosamina	110	+	+	A, B, D, E
Glicerol	290			C, D
Sacarosa	185		+	A, B
Lactosa	223		+	A, B
L-Fucosa	145		+	A, B, D
Fructosa	103		+	A, B
Manosa	132		+	A, B, C, D, E
Inositol	319			A, B, C, D
Acido L-ascórbico	189	+		F
Glicina	228	+	+	F
Prolina	220	+	+	F
Serina	228	+	+	F
Lisina	210	+	+	F
Acido succínico	233	+	+	D

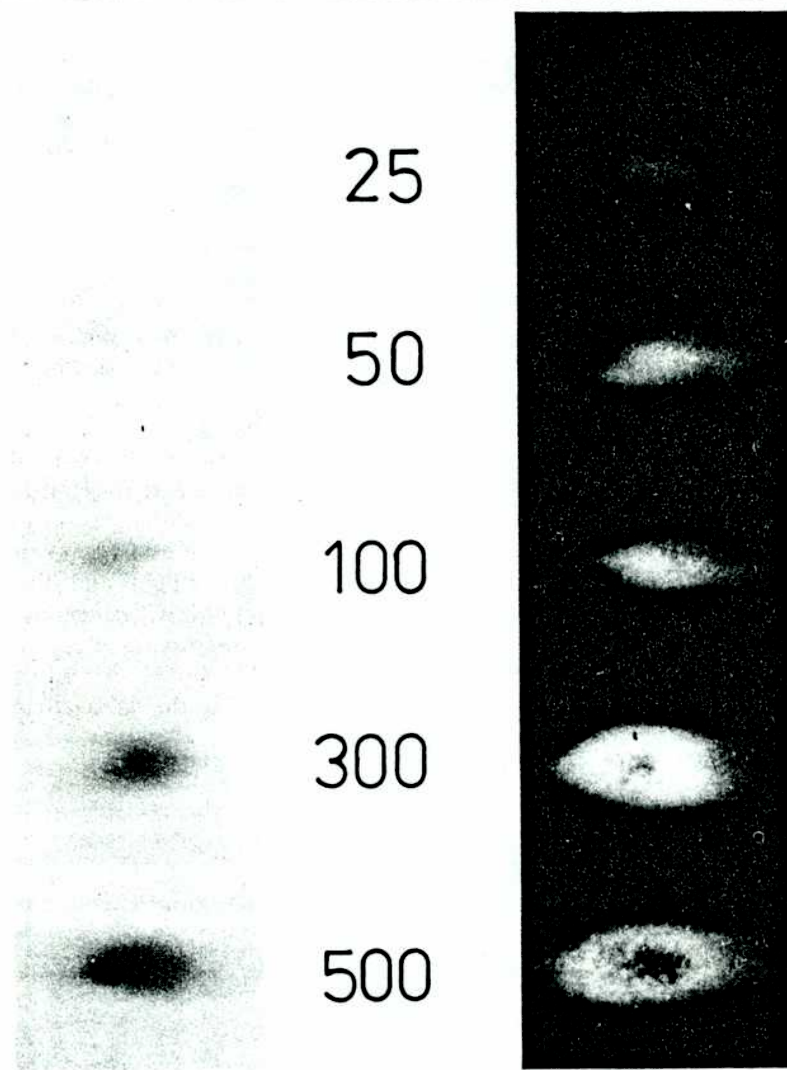
\*Los valores fueron obtenidos de (51, 52, y 53).

Además, se han detectado los siguientes compuestos (no se muestran en la tabla II): lactosa, maltosa, maltooligosacáridos que poseen desde 2 hasta 7 unidades de glucosa, galactosa, arabinosa, ribosa, glucosa-6-fosfato, fructosa, N-acetilglucosamina, melibiosa, L-ramnosa, xilosa, ácido cítrico y malónico.

### 3.23. Sensibilidad de detección sobre papel.

Cantidades relativamente grandes de sustancias se utilizaron en los experimentos arriba mencionados (1  $\mu\text{mol}$ ). Para investigar la sensibilidad del método, varias concentraciones de glucosa y glucosamina entre 25 y 250 nmoles se cromatografiaron separadamente como se describió anteriormente.

Después de revelado el cromatograma a  $230^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos, se pudieron detectar bajo luz visible 100 y 200  $\text{nmoles}/\text{cm}^2$  de glucosamina y glucosa, respectivamente. Los mismos cromatogramas se observaron después bajo luz ultravioleta, y la sensibilidad aumenta a 25 y 50  $\text{nmoles}/\text{cm}^2$  para la glucosamina y la glucosa, respectivamente. El cromatograma de la glucosamina que ilustra este experimento se muestra en la figura 26. Los centros oscuros en las zonas de fluorescencia se deben posiblemente al enmascaramiento de la misma causado por la gran concentración de sustancia en esa



**Figura 26:** fotografía de un cromatograma en el cual diferentes cantidades de glucosamina fueron detectadas por el procedimiento térmico-UV. Izquierda: cromatograma bajo luz visible después de calentado a 230°C por 30 seg. Los números indican nanomoles de glucosamina. Derecha: el mismo cromatograma observado bajo luz ultravioleta (366 nm).

zona, que genera manchas visibles.

### 3.24. Recuperación de compuestos de cromatogramas en papel.

Para investigar la aplicabilidad del método sobre la recuperación de compuestos radioactivos, se efectuó la siguiente serie de experimentos. Se sembraron cantidades iguales de  $^{14}\text{C}$ -glucosa más 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa no marcada en cuatro carriles de un papel, se cromatografiaron con el sistema de solventes A, y los procedimientos siguientes (Fig. 27) se utilizaron para revelar los cromatogramas: (a) nitrato de plata (barras 4), (b) el método aquí presentado a  $230^\circ\text{C}$  (barras 3) y (c)  $150^\circ\text{C}$  durante 30 segundos (barras 2). En el último caso, la detección solo fue posible usando luz ultravioleta. En el experimento de control el cromatograma no se reveló (barras 1). Se cortó una banda de papel en una posición equivalente a la que migra la glucosa. Se midió la radioactividad en todos los casos y los resultados se expresan como porcentaje de recuperación relativo al control. Este experimento se repitió usando cuatro cantidades diferentes de radioactividad, como se muestra en la Fig. 27. Las recuperaciones de radioactividad fueron de 98%, para el método térmico a  $150^\circ\text{C}$  durante 30 segundos (UV), 86% con revelado a  $230^\circ\text{C}$  durante 30 segundos (luz visible) y 4% luego del revelado con nitrato de plata.

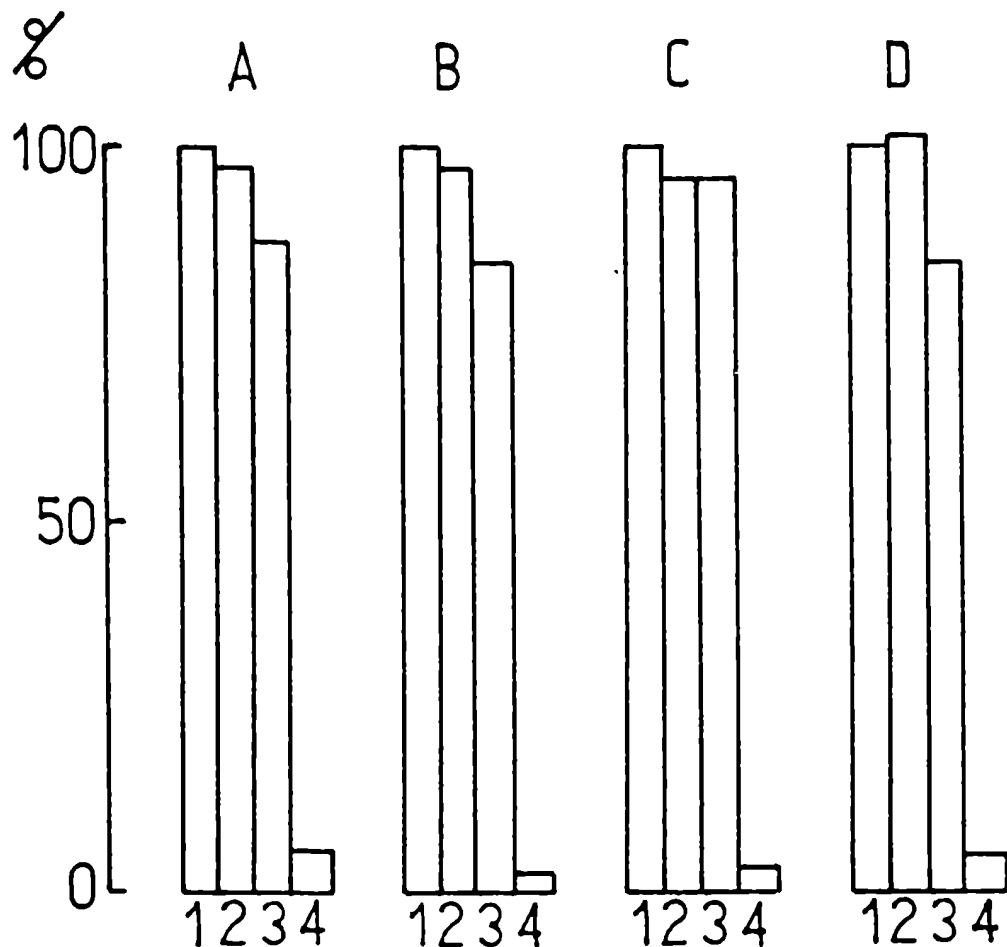


Figura 27: recuperación de radioactividad de glucosa-<sup>14</sup>C (ordenada) después de la cromatografía en papel con el sistema de solventes A y diferentes métodos de detección: 1, control (sin tratamiento); 2, 150°C, 30 seg. UV; 3, 230°C, 30 seg. VIS.; 4, revelado con AgNO<sub>3</sub>. Grupos: A, 8240 cpm; B, 4460 cpm; C, 2860 cpm y D, 1100 cpm.



En otro experimento, se sembraron 12.000 cpm de  $^{14}\text{C}$ -lisina más 1 umol de lisina no marcada y se cromatografiaron con el sistema de solventes F. Después de la cromatografía el papel se calentó a  $230^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos y el contorno de la mancha revelada se marcó bajo luz ultravioleta. Se cortó el papel y se midió la radioactividad por centelleo líquido, aproximadamente el 97% de la marcación se pudo recuperar en relación a un control cromatografiado y no revelado.

La descomposición química del compuesto radioactivo después del tratamiento térmico se estudió examinando el comportamiento cromatográfico de las sustancias radioactivas después de la detección térmica ultravioleta. Una mezcla de 1 umol de glucosa no marcada y 18,000 cpm de  $^{14}\text{C}$ -glucosa se sembró sobre papel y se cromatografió durante 24 horas usando el sistema de solventes A. El papel se trató a  $150^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y el azúcar se detectó utilizando luz ultravioleta. En un carril de papel adyacente al anterior se sembró 1 umol de glucosa no marcada en la misma posición de la muestra UV detectada, entonces se cromatografió durante 24 horas más usando el mismo solvente. En la banda de papel que contenía el compuesto radioactivo se midió radioactividad por conteo  $\beta$  de barrido. El  $R_f$  del pico radioactivo coincidió con aquel de la glucosa auténtica, como se muestra

en la figura 28. La zona del papel correspondiente a la mancha se recortó y se midió la radioactividad por centelleo líquido. La mayor parte de la radioactividad (98%) se recuperó en una posición que tiene un  $R_f$  idéntico al de la glucosa, mientras que el resto de la marca sembrada quedó en el origen del cromatograma.

Se efectuó un experimento similar utilizando 1 umol de glucosa no marcada. Después de la cromatografía y de la detección térmica ultravioleta a 150°C durante 30 segundos, la cantidad de glucosa que se recupera se midió enzimáticamente usando un método en base a glucosa oxidasa. Se demostró que un 96% del compuesto detectado térmicamente se comportaba como glucosa auténtica. El control (100%) fue 1 umol de glucosa sembrada en papel y no cromatografiada, y una superficie de papel de igual área y sin sustancias se empleó como blanco.

### 3.25. El rol del adsorbente en la generación de compuestos fluorescentes.

Para determinar si el adsorbente es requerido durante el tratamiento térmico para la inducción de fluorescencia en carbohidratos, se realizó el siguiente experimento. Alrededor de 10 mg de glucosamina y glucosa fueron colocados por separado sobre una placa de vidrio sin adsorbente. La placa

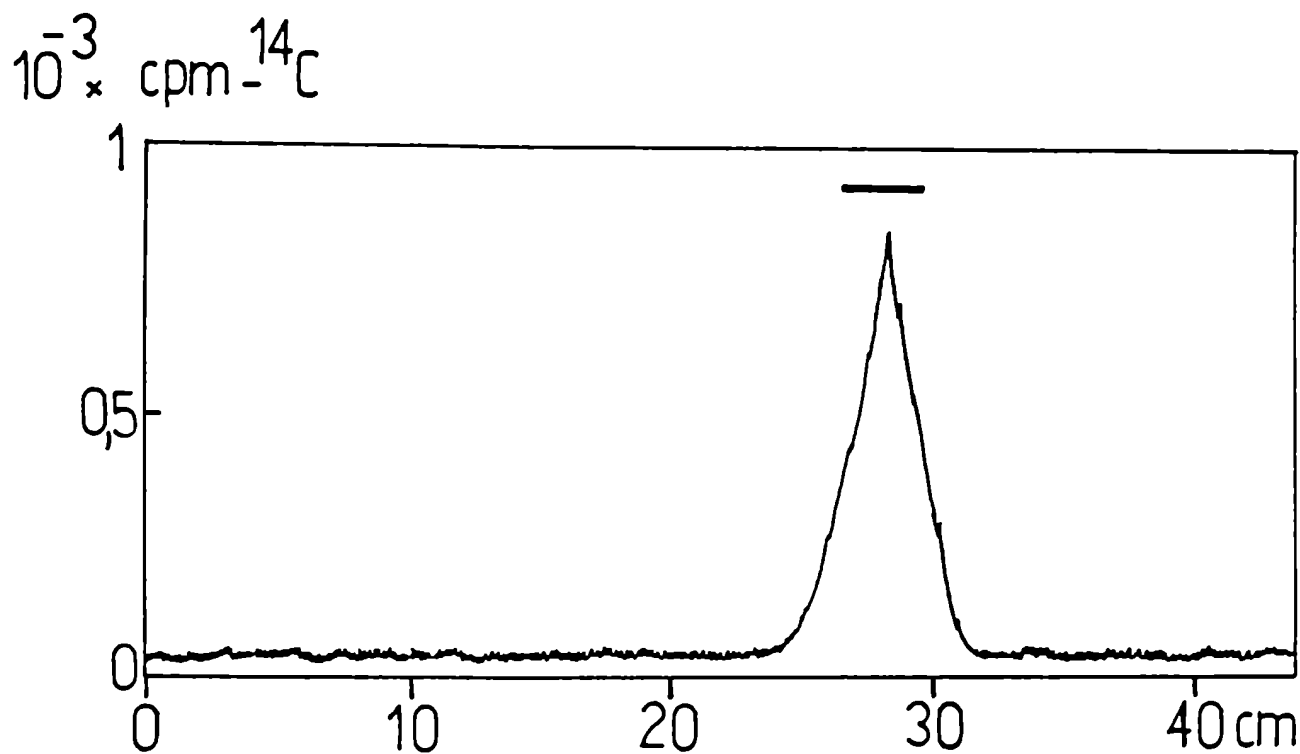


Figura 28: registro de radioactividad de glucosa- ${}^{14}\text{C}$  después de que la muestra fuera cromatografiada durante 24 horas en el sistema de solventes A, revelada por el método térmico-UV y recromatografiada por otras 24 horas en el mismo sistema de solventes. La barra indica la posición de un estándar externo de glucosa agregado paralelamente a la posición de la glucosa después del primer revelado y antes de la recromatografía.

se calentó desde 50 a 200°C en pasos de 10°C por 5 minutos a cada temperatura. Las sustancias se examinaron después de cada etapa de calentamiento bajo luz visible y ultravioleta. Sustancias no calentadas fueron simultáneamente observadas como un control. No se pudo detectar fluorescencia en todo el rango de temperaturas ensayadas para ninguna de las dos sustancias. Bajo luz visible, un color amarillo aparecía a 90°C para glucosamina y a 150°C para glucosa como podría esperarse para una reacción de descomposición.

Compuestos fluorescentes de los carbohidratos mencionados más arriba se generan cuando están sembrados en papel, sílica gel o papel de vidrio (54). El presente resultado demuestra que la presencia del adsorbente es un requerimiento absoluto para la generación de compuestos fluorescentes.

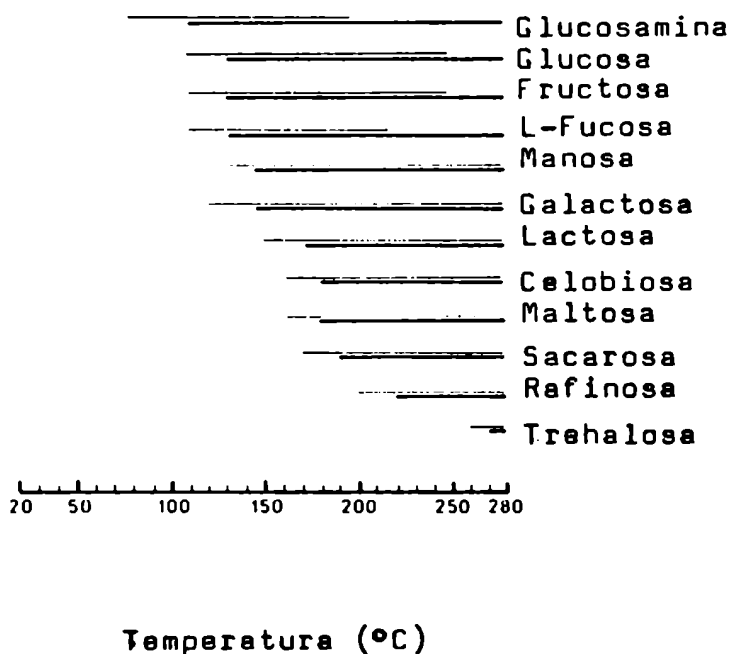
Estas observaciones son compatibles con transformaciones de compuestos orgánicos debido a interacciones secundarias entre las sustancias y el adsorbente (55,56,57).

### 3.26. Detección diferencial de azúcares en TLC.

La posibilidad de diferenciar carbohidratos según la temperatura del revelado se investigó de la siguiente manera. Alrededor de 1  $\mu\text{mol}$  de los compuestos listados en la

Fig. 29 fueron sembrados en una placa de sílica gel (TLC) y cromatografiados empleando el sistema de solventes A. Después de la cromatografía, la placa se colocó en el compartimiento de columnas de un cromatógrafo de gases como se describe en Materiales y Métodos. Las características de este equipo en cuanto a alta precisión y rapidez en lograr la temperatura deseada (temp.  $\pm 1^\circ\text{C}$ , 30 seg.) son importantes para establecer las temperaturas de detección de cada compuesto. La Fig. 29 muestra que existe una temperatura característica de detección para cada tipo de azúcar, tanto en el rango visible como UV de visualización. Puede notarse también que existe un rango de alrededor de  $20^\circ\text{C}$  en el cual los compuestos sólo pueden detectarse bajo luz UV. Esto último es muy importante para la eventual recuperación de los compuestos como se mostrará más adelante.

De acuerdo con la temperatura de detección, los carbohidratos pueden agruparse como mono y disacáridos. Los disacáridos requieren una mayor temperatura de detección. El único trisacárido estudiado (rafinosa) sólo pudo visualizarse a una temperatura mayor que para los disacáridos, con excepción de la trehalosa, que posee la mayor temperatura de detección de todos los compuestos ensayados ( $260^\circ\text{C}$ ). En el grupo de los monosacáridos, la glucosamina pudo revelarse a una temperatura relativamente baja ( $60^\circ\text{C}$ ).



**Figura 29:** patrón de temperaturas de detección de diferentes carbohidratos. Las barras horizontales finas indican detección en 366 nm (UV) y las gruesas bajo luz visible. Los compuestos fueron cromatografiados como se indica en el texto. La detección se realizó observando la placa después de calentar por 5 minutos. Los incrementos de temperatura se realizaron en pasos de 10°C.

Para determinar si las sucesivas etapas de calentamiento influyen sobre la temperatura de detección, el siguiente experimento se llevó a cabo. La temperatura se ajustó directamente al menor valor determinado en la Fig. 29 para la detección y se calentó durante 5 minutos. Esto se realizó para glucosamina (60°C), manosa (120°C), trehalosa (260°C), rafinosa (200°C) y sacarosa (170°C). Los resultados obtenidos son similares a los de la Fig. 29 y, por lo tanto, el calentamiento secuencial empleado para establecer las temperaturas de detección no influye sobre los valores obtenidos. Para determinar si la temperatura de detección de un compuesto dado puede ser influenciada por la presencia de otras sustancias se realizaron los siguientes experimentos. Una mezcla compuesta por 1 umol de un azúcar que revela a baja temperatura, e igual cantidad de otro que se detecta a una temperatura mayor fue sembrada en TLC y calentada. El tratamiento térmico se realizó como se indica en la Fig. 29 y la temperatura a la que revelan los carbohidratos no difiere de la previamente establecida. Esta observación está restringida al azúcar de menor temperatura de detección.

Los pares de azúcar que se ensayaron en las mezclas son: glucosamina-glucosa, glucosa-sacarosa y sacarosa-trehalosa.

3.27. Sensibilidad de detección para carbohidratos en TLC.

Para determinar la mínima cantidad de azúcares detectables en TLC empleando el método térmico-UV, diferentes cantidades de varios compuestos fueron cromatografiados en el sistema de solventes A. Se encontró que 1 nmol de glucosa, glucosamina o manosa puede observarse bajo luz ultravioleta (366 nm) luego de calentar 5 min a 200°C.

3.28. Recuperación de glucosamina-<sup>3</sup>H y de manosa-<sup>14</sup>C luego de la detección térmica-UV en TLC.

Para determinar el efecto del calentamiento sobre la recuperación de glucosamina-6 <sup>3</sup>H y de manosa-U <sup>14</sup>C, alrededor de 20.000 dpm y 1 umol de cada azúcar fueron sembrados en placas de TLC. Diez muestras de cada compuesto se cromatografiaron en el sistema de solventes A. La placa se calentó entonces a 60°C durante 5 min, la fluorescencia de glucosamina aparecía y esa banda se raspó y midió para radioactividad. La placa se calentó luego a 70°C durante 5 min y el procedimiento anterior se repitió sucesivamente para una temperatura de 10°C mayor que la precedente, hasta 130°C. En cada etapa se determinó la radioactividad de una banda.

Un procedimiento similar al descrito para glucosamina



se empleó para manosa pero comenzando de 120°C. Los resultados pueden observarse en la Fig. 30 e indican que se recupera prácticamente el 100% de la radioactividad de los dos azúcares ensayados en el rango de detección ultravioleta de cada uno de ellos. Como control se utilizaron bandas no calentadas (100%). La recuperación disminuyó notablemente con el incremento de temperatura y la aparición de color bajo luz visible.

3.29. Desarrollo de colores fluorescentes luego del tratamiento térmico.

Antes o después de cromatografía, muchos compuestos sometidos al tratamiento térmico en TLC desarrollaron colores fluorescentes a 366 nm que son característicos. Por ejemplo: rojo para 2,3,6-trimetil glucosa, blanco para 2,3,4-trimetil glucosa y amarillo para 2,4,6-trimetilglucosa, azul para glucosamina, amarillo para N-acetilglucosamina y para glucosa. Estos colores se observaron consistentemente solo en la escala de temperaturas que corresponde a la detección en UV.

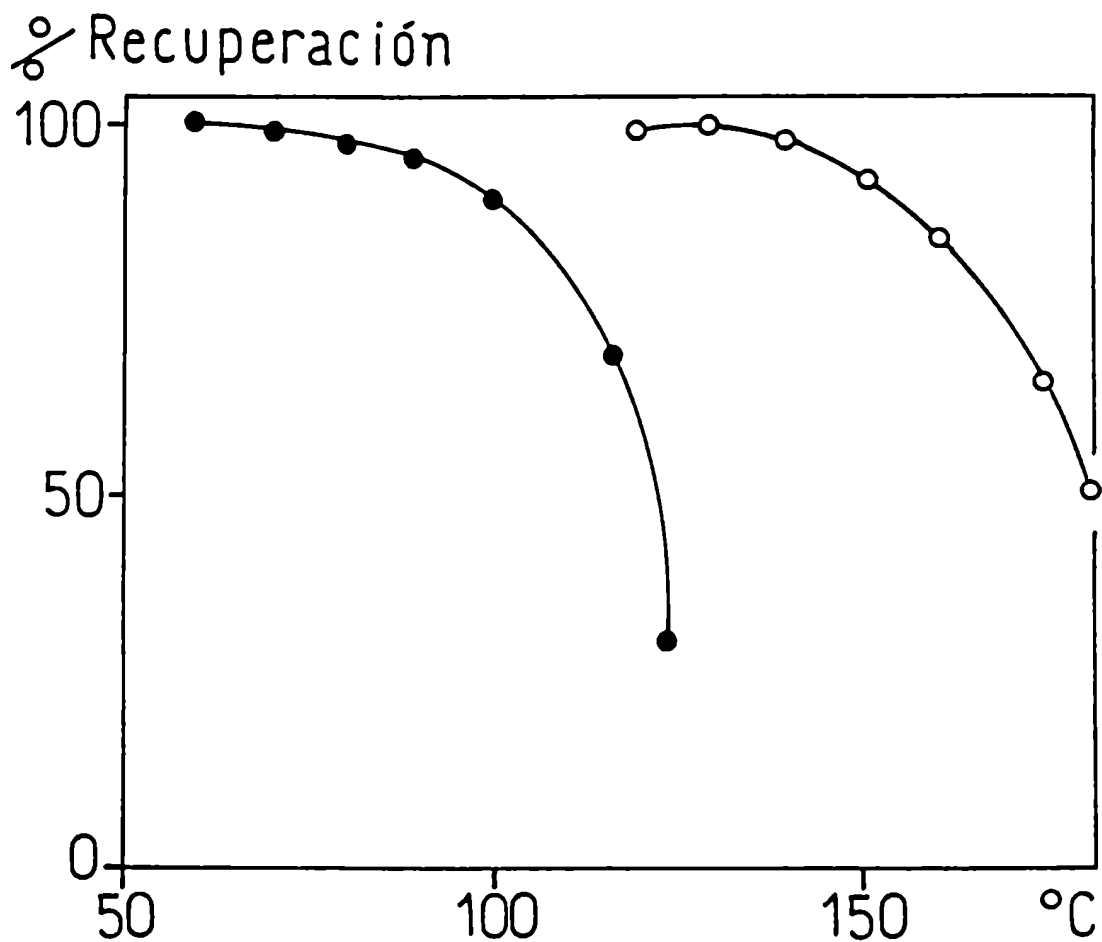


Figura 30: recuperación de glucosamina y manosa después de la detección térmica-ultravioleta. Alrededor de 20.000 dpm, (1  $\mu$ mol) de cada azúcar fue sembrado en placas de sílica gel y corrido con el sistema de solventes A. Cada punto corresponde a la radioactividad contada en la zona detectada siguiendo el mismo procedimiento que se describe en la Fig. 29. Las recuperaciones se refieren a muestras no calentadas. Glucosamina-6<sup>3</sup>H (●) y Man-14C (○).

### 3.30. Solubilización del material fluorescente.

Zonas de 1 cm<sup>2</sup> de una placa de sílica gel fueron sembradas con las siguientes soluciones: 0,5 ml de agua, 1,5 mg de glucosamina en 0,5 ml de agua y 1,5 mg de glucosa en 0,5 ml de agua. En algunos casos, alrededor de 20.000 cpm de glucosamina-<sup>3</sup>H y glucosa-<sup>14</sup>C fueron agregadas a las correspondientes soluciones antes de la siembra. La placa se secó a temperatura ambiente y luego se calentó a 60°C durante 10 min como se describe para recuperación cuantitativa de glucosamina. Luego del calentamiento, las zonas de sílica gel fueron raspadas y transferidas cuantitativamente a tubos de vidrio. La placa se calentó luego a 120°C durante 10 minutos y el procedimiento se repitió para glucosa y agua.

En todos los casos, la extracción se realizó por agitación con 1 ml por vez de metanol:agua (1:1), centrifugando a 3.500 rpm durante 15 min. La extracción se repitió 4 veces. Los sobrenadantes se agruparon para la determinación de los espectros de fluorescencia.

Extracciones semejantes a las descritas se realizaron por separado para evaluación de la recuperación. Las soluciones de glucosamina y glucosa revelaron fuerte fluorescencia azul y amarilla respectivamente bajo luz UV (366 nm).

En la tabla III se muestran los resultados de la recuperación. Luego de los lavados, la radioactividad remanente en la sílica gel fue solo el 0,25% de la sembrada originalmente. La solución proveniente del último lavado no pudo distinguirse del blanco - metanol:agua (1:1) - cuando se sometió al análisis espectral como se describe más adelante. Estos resultados indican que tanto la radioactividad como la fluorescencia son disueltas del sílica gel de manera prácticamente cuantitativa. Adicionalmente, se ha verificado que la fluorescencia no es retenida por filtros de 0,2  $\mu$ m de poro (Millipore).

### 3.31. Estabilidad de los compuestos fluorescentes.

Las soluciones fluorescentes permanecieron sin cambio aparente, por lo menos durante 2 semanas tanto a  $-20^{\circ}\text{C}$  ó a  $30^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones pudieron ser secadas con aire a  $25^{\circ}\text{C}$  y redisueltas sin aparentes diferencias en color o intensidad. Los residuos secos fueron también estables durante una semana por lo menos, reteniendo el color fluorescente original.

Para determinar el efecto del pH sobre la estabilidad de las soluciones, estas últimas se acidificaron (pH 4) o alcalinizaron (pH 10) por adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio respectivamente. Luego de 1 hora a  $25^{\circ}\text{C}$

TABLA III: Solubilización de los compuestos fluorescentes generados por calentamiento de glucosamina y glucosa sobre sílica gel.

Etapa de extracción	% de radioactividad remanente en el adsorbente		Fluorescencia del adsorbente seco *		% de radioactividad solubilizada		Fluorescencia de las soluciones de lavado*	
	GluNH	Glu	GluNH	Glu	GluNH	Glu	GluNH	Glu
Inicial	100	100	+	+	0	0		-
1°	27	21	+	+	72.5	79	+	+
2°	3.3	2.2	±	±	23.5	18.5	+	+
3°	0.8	0.5			2.2	1.3	±	±
4°	0.27	0.23			0.4	0.2		-
5°	0.26	0.23			0	0		-

\* Se monitoreó la fluorescencia por inspección visual, con la excepción de la 5° etapa. Para más detalles ver el texto.

GluNH: glucosamina; Glu: glucosa.

no se observaron cambios aparentes en el color o intensidad de la fluorescencia.

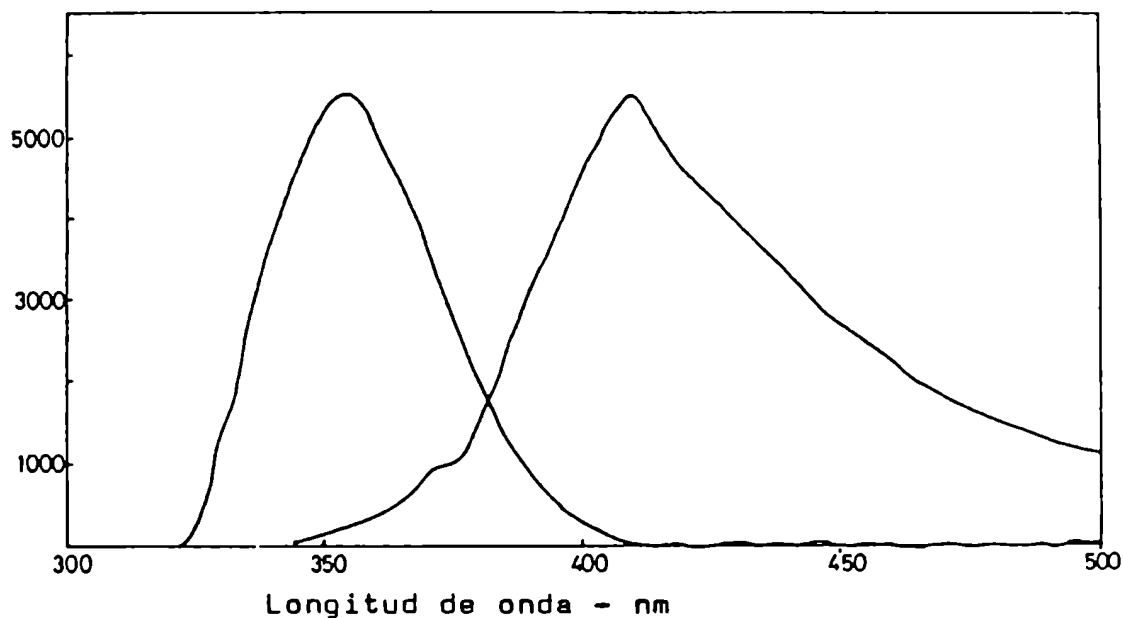
### 3.32. Espectro de emisión de fluorescencia.

Las curvas espectrales de los derivados de glucosamina y glucosa fueron obtenidas de cuatro zonas separadas de sílica gel para cada azúcar, siguiendo el procedimiento de solubilización indicado más arriba.

Los espectros de emisión de derivados de glucosamina y glucosa se muestran en la Fig. 31, siendo cada curva el resultado de la substracción de la fluorescencia de las soluciones respectivas provenientes del adsorbente calentado con la muestra menos la de la sílica gel calentada con agua (blanco). Las temperaturas de revelado de los blancos fueron de 60°C y 120°C para glucosamina y glucosa respectivamente. En cada experimento por separado, solo se obtuvo un pico de fluorescencia. En el caso de los derivados de glucosamina, el pico aparece a 357 nm, mientras que para glucosa lo hace a 410 nm.

El análisis espectral de metanol:agua (1:1) no dio lecturas de fluorescencia significativas (< 1%) a las longitudes de onda de excitación, seleccionadas para una máxima emisión de fluorescencia de los derivados de glucosamina y glucosa.

Intensidad de  
fluorescencia  
(unidades arbitrarias)



**Figura 31:** espectro de emisión de fluorescencia de los derivados obtenidos a partir de glucosamina y glucosa, en solución metanol-agua (1:1). Excitación: 320 nm para glucosamina y 336 nm para glucosa. Emisión: 357 nm y 410 nm para glucosamina y glucosa respectivamente. Resolución en monocromadores: 4 nm. Glucosa normalizado a glucosamina; Valor original = 3600 unidades arbitrarias.

Los espectros (por cuadruplicado) de muestras correspondientes a cada azúcar se superponían con respecto al pico de emisión, tanto en longitud de onda como en intensidad. La diferencia en el último caso fue del orden de  $\pm 5\%$  de la media, indicando de esta manera la alta reproducibilidad de todo el procedimiento empleado.



#### 4. DISCUSION

##### 4.1. Requerimientos generales del tejido nervioso central.

Los primeros intentos realizados para medir la cinética de glicosilación de glicoproteínas de tipo N-Asp en microincubaciones de corteza cerebral de la rata condujeron a resultados muy poco reproducibles. Por esta razón se debió revisar cada paso de la metodología, comenzando por el material biológico.

Para la obtención de tejido nervioso debe tenerse en cuenta la provisión de nutrientes dentro del minuto de decapitación. La instauración de la isquemia produce en pocos segundos un agotamiento de las reservas de energía (58). La fosfocreatina disminuye muy rápidamente, seguida por glucosa, ATP y glucógeno (59). Un daño irreversible ocurre inevitablemente cuando el aporte de nutrientes se suprime por períodos mayores de 5 minutos; otros autores han considerado que después de los 3 minutos comienza un daño irreparable (17,60,61). En esta tesis el procesamiento completo del material - desde la decapitación a la siembra - se efectuó en aproximadamente 3 minutos y la glucosa se proveyó a los 30 segundos de la decapitación. Para el caso de corteza cerebral de 5 días, la gran resistencia a la anoxia contribuye a aumentar las posibilidades de sobrevivida (41).

La preparación de las partículas se efectuó en todo momento con medio previamente equilibrado con 5% CO<sub>2</sub>-aire a 37°C para evitar fenómenos de expansión del espacio no accesible a inulina, que puede introducir artefactos mecánicos y metabólicos indeterminados (62,63,64). El mismo procedimiento de preparación permite eliminar el material no sedimentable a 1 x g en 30 segundos (restos celulares y partículas muy pequeñas) en un volumen de medio 50 veces mayor que el particulado que se obtiene. El empleo de suero fetal en el medio de incubación está fundamentado en el hecho de que solamente al incluirlo puede preservarse la viabilidad del tejido nervioso en cultivos prolongados (64a). Las incubaciones en medios salinos sin aminoácidos y con células disociadas por tripsinización y posterior disrupción mecánica (64b) introducen dudas acerca de lo fisiológico de las condiciones en virtud de las especiales exigencias metabólicas del SNC, que son contempladas en los medios mínimos esenciales destinados a cultivo (64a).

#### 4.2. Intercambio de metabolitos.

La mayoría de los cortes de tejido nervioso central sobreviviente destinados a incubaciones se han empleado generalmente en espesores de 350-500 um (65,66,67), no obstante, se ha cuestionado recientemente el correcto inter-

cambio de metabolitos con el medio de incubación para esos espesores en cerebro de rata adulta (16). La región más desfavorable de los cortes mencionados sería el centro, que se encuentra equidistante de cualquiera de las caras en contacto con el medio de incubación. En nuestro caso (partículas irregulares) el equivalente al centro del corte es la  $d_{min}$ , cuyo valor en el peor de los casos es 50  $\mu m$ . Además se verificó que partículas con  $d_{min} \leq 50 \mu m$  no introducían cambios en los resultados de las incorporaciones de Leu-4,5- $^3H$  y Man-2  $^3H$  a proteínas en corteza cerebral de 5 días, pero dificultaban mucho la sedimentación a 1 x g requerida para la preparación de partículas, siembra y procedimientos de "chase". El tratamiento matemático de la difusión ha sido descrito en la literatura (68,69). El tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) de difusión se define como el tiempo necesario para que se recambie la mitad del volumen extracelular por el medio de incubación y responde a la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = h^2 \cdot L^2 \ln 2 / \pi^2 \cdot D$$

donde  $t$  es el tiempo en minutos,  $h$  es el espesor del corte en  $\mu m$ ,  $L$  es el factor de tortuosidad y  $D$  el coeficiente de difusión. Tanto  $L$  como  $D$  son constantes para el mismo tejido y, por lo tanto, el  $t_{1/2}$  es fuertemente dependiente del espesor. En cortes de corteza cerebral de rata de 500  $\mu m$  de

espesor, el  $t_{1/2}$  ha sido determinado en 2,7 min (69). En nuestro caso, con valores de espesor de 50 a 100  $\mu\text{m}$  (1 a 2  $\times$   $d_{\text{min.}}$ , sección 3.1.), el  $t_{1/2}$  se reduciría a unos 0,1 min. Este último valor es del orden del reportado para retina de conejo (0,07 min) (70), cuyo espesor de 100  $\mu\text{m}$  se considera adecuado para una difusión no limitante del transporte, tanto para aminoácidos como para azúcares (16). El pasaje de algunos nutrientes esenciales como glucosa a través del epitelio capilar que constituye la barrera hematoencefálica (71) tiene lugar in situ de manera dependiente de un transportador con  $K_m = 11 \text{ mM}$  (72). Las incubaciones del particulado de corteza cerebral resuelven este problema y, por lo tanto, las concentraciones intracelulares e intersticiales de metabolitos se equilibran rápidamente (68). Adicionalmente, el empleo del particulado en lugar de cortes en las incubaciones, permite un gran incremento del área expuesta al medio a igualdad de volumen, favoreciendo los intercambios de metabolitos.

La desaparición de precursores del medio de incubación a un tiempo mucho mayor que el  $t_{1/2}$  de difusión responde principalmente a la utilización de los mismos. Esto se debe a los siguientes hechos:

- 1.- La difusión no es limitante para el transporte.
- 2.- El transporte supera a la utilización (69,72), por lo

que luego de alcanzado el equilibrio entre el intersticio y el medio intracelular, una disminución de la concentración de un precursor en el medio de incubación implicará la transformación irreversible de éste dentro de la célula (16), como se ha informado también para otros tejidos (73,74,75).

Por lo expuesto, la desaparición, p.ej. de glucosa del medio de incubación, expresa utilización, siendo el procedimiento conceptualmente comparable a la medición de utilización in situ, que se realiza por diferencia arteriovenosa de la concentración del azúcar (72). La mayor utilización de glucosa (87%) por partículas de corteza cerebral de 30 días con respecto a 5 días (Fig. 9) y la gran desaparición de manosa-2 <sup>3</sup>H del medio cuando es el único nutriente (Fig. 13) permiten descartar fenómenos de limitación por difusión, al menos para corteza cerebral de 5 días, ya que la densidad de elementos formes del SNC es mucho mayor y el contenido acuoso menor en animales adultos (76), lo que implica una disminución en el factor de tortuosidad (L) y aumento del coeficiente de difusión (D) y, por lo tanto, una reducción del tiempo medio de difusión (68). Adicionalmente, la Fig. 13 muestra que la desaparición de azúcares del medio de incubación, cuando la concentración inicial de glucosa es 280 uM, tiene lugar con una velocidad que se corresponde con

el Km de la hexoquinasa (30-40  $\mu\text{M}$ ) (49,77). El pequeño tamaño del particulado de corteza cerebral y la mezcla de las partículas durante la producción sugiere que son, en la siembra, representativas de la corteza cerebral entera.

#### 4.3. Sobrevida del tejido.

La sobrevida del tejido ha sido estimada de acuerdo con el criterio de actividad biosintética preservada, que se refleja en la utilización lineal de la glucosa del medio de incubación y también por la incorporación lineal de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a la proteína (77a). El criterio empleado se corresponde con el hecho de que estos procesos requieren una provisión de ATP compatible con la del tejido vivo (78). Una relación de formación de  $\text{CO}_2$  entre células de 30 y 5 días = 2, ha sido comunicada previamente (78a) y se corresponde con la relación de utilización de glucosa determinada en esta tesis para las mismas edades (Fig. 9). De acuerdo con esto, el tejido particulado es viable por lo menos por 3 horas (Figs. 7, 8, 15). Ha sido comunicado que las células del SNC sobreviven en su mayoría a procedimientos combinados de disrupción del tejido, tripsinización y separación a presión a través de mallas, pero tal como lo expresan los autores, las normales relaciones entre glía y neuronas se suprimen (78a), circunstancia que no ocurre con la metodología descrita en

esta tesis. No se ha observado evaporación del medio durante las incubaciones, lo cual indica que no cambia la concentración de los precursores por esta causa en los tiempos de incubación utilizados (sección 3.3.), a diferencia de lo que ocurre con cultivos más prolongados (79).

No se ha detectado actividad de enzimas libres capaces de transformar glucosa en el medio durante la incubación (sección 3.2.) y la desaparición del azúcar del medio sólo ha podido medirse en presencia de tejido. Si la desaparición de glucosa del medio de incubación se compara con los valores de consumo de glucosa del cerebro de rata anestesiada, la coincidencia es de  $\pm 30\%$  (61a,72,80,80a). Asimismo, los diferentes consumos aparentes de glucosa, en la incubación de corteza cerebral de animales de 5 y 30 días, parecen reflejar los cambios observados durante el desarrollo del SNC (81,82,83).

#### 4.4. Necesidad de azúcares.

En las incubaciones descritas en esta tesis se ha dado importancia a los niveles de glucosa, en base al concepto de umbral fisiológico, que se aplica a los valores mínimos de concentración de azúcar compatibles con una función normal en el SNC del animal entero (84). Por lo expuesto, la cantidad de proteína a incubar y el máximo tiempo de incubación

se han elegido de las figuras 7 y 8, de tal manera que la mínima concentración de glucosa nunca descienda de 0,5 g/l, un valor estimado como razonablemente seguro (16,85,86). Con respecto a los nutrientes, el SNC in situ solamente puede emplear en forma directa glucosa o manosa (15,87,88). Otros autores encuentran en incubaciones de otros tejidos, estructuras anómalas en lípido-oligosacáridos del camino del dolicol producidos por ayuno de glucosa y que sólo revierten con glucosa o manosa pero no con piruvato, glutamina, fructosa, galactosa, etc. (12,13,14). Estas comunicaciones también dan motivo para incluir la glucosa a niveles fisiológicos en las incubaciones. Los resultados cinéticos encontrados en esta tesis, cuando se incorpora Man-2 <sup>3</sup>H a GP en ausencia de niveles fisiológicos de glucosa (0,05 g/l en lugar de 1 g/l) demuestran claramente una profunda alteración en la linealidad de la incorporación, como puede observarse en la Fig. 17. Por las razones expuestas, el empleo de glucosa (1 g/l) resulta indispensable para obtener incorporaciones lineales de <sup>3</sup>H de Man-2 <sup>3</sup>H a glicoproteínas, en las condiciones descriptas en esta tesis.



#### 4.5. Cantidad de proteína incubada.

Cuando se marcan las glicoproteínas a partir de 10 uCi/cav. de Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa (1 g/l), se observa que la radioactividad que aparece en la glicoproteína es directamente proporcional a la proteína incubada sólo en el rango de 0-180 ug proteína/cavidad (Fig. 14). Esto indica que, a pesar de tener glucosa por encima del umbral fisiológico, desde 180 ug proteína/cav. en adelante otros parámetros impiden la proporcionalidad. El único hecho observado es la creciente acidificación del medio de incubación a partir de 250 ug de proteína/cavidad, posiblemente por la liberación de ácido láctico y  $\text{CO}_2$  en exceso con respecto al buffer (78,89).

#### 4.6. Utilización de precursores.

El hecho de haber conseguido marcar eficientemente ( $0,5\% \text{ mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) glicoproteínas a partir de Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de concentración fisiológica de glucosa llamó la atención, pues la relación de masas Glu/Man es 667. Adicionalmente, algunos autores excluyen la glucosa cuando marcan con Man-2  $^3\text{H}$  y agregan piruvato, tanto en células de mamífero (23,24) como en otras (90). Como se relató anteriormente, el piruvato no sustituye todas las funciones

de la glucosa. También se han empleado concentraciones subóptimas de glucosa (0,1-0,18 g/l) durante períodos de incubación prolongados (6 hs-3 días) (91,92). En un caso se ha medido la oferta de Man-2  $^3\text{H}$  en ausencia de glucosa, pero la determinación de radioactividad se realizó sin previo secado ni acidificación, con lo cual se ignora el  $^3\text{H}_2\text{O}$  formada en la utilización de la manosa (23). Muy recientemente se han informado incubaciones con concentraciones fisiológicas de glucosa en presencia de Man-2  $^3\text{H}$ , pero sin medir la oferta de ninguno de los compuestos (93) y en un caso en que se mide la glucosa en el medio y se repone a niveles fisiológicos cada vez que se consume, no se dan indicaciones acerca de lo que ocurre con los niveles de Man-2  $^3\text{H}$  (94). Por lo tanto se trató de obtener información experimental para aclarar cómo desaparece del medio la Man-2  $^3\text{H}$  y la Glu en las condiciones de incubación descritas en esta tesis.

Se trató de determinar si la glucosa (50 ug/cav.) y la manosa-2  $^3\text{H}$  (10 uCi/cav.) son removidas del medio de incubación a igual o diferente velocidad, estando presentes los 2 azúcares. El resultado de la figura 12 (barras a y b) indica que en estas condiciones la velocidad de desaparición de glucosa y Man-2  $^3\text{H}$  tienen igual magnitud. Por lo tanto, el ingreso de marca a glicoproteína cuando la relación de masas

Glu/Man es 667 no se debería a una discriminación de los azúcares que se exprese en cambios de la velocidad de entrada al tejido.

La falta de selectividad en la desaparición de los azúcares reflejaría el comportamiento intracelular de la enzima hexoquinasa I, ya que se ha demostrado que la enzima tiene Km parecido para manosa (21 uM) y glucosa (30 uM) in vitro (46,47,49), lo que está en coincidencia con un consumo de manosa igual al de glucosa observado cuando la glucosa de los medios es reemplazada por igual cantidad de manosa (50 ug/cav., Fig. 12). Finalmente las barras d y e de la Fig. 12 indican mayor consumo de manosa que de glucosa cuando los dos azúcares se encuentran a igual concentración (0,5 g/l), lo que podría ser interpretado en base a la notable regulación por los productos (Man-6-P y Glu-6-P), descrita para la hexoquinasa I (46,47,48,49). Esta enzima fosforila glucosa y manosa a igual velocidad, la manosa es utilizada por la vía Man-6-P a Fru-6-P (95). En este caso, una gran masa de manosa debe pasar por Fru-6-P provocando aumento de este intermediario y ahorro de Glu-6-P. La Glu-6-P es un buen regulador de la hexoquinasa I e impide la metabolización de glucosa, mientras que Man-6-P es un mal regulador de la quinasa y, por lo tanto, se inhibe mucho menos la utilización de manosa (95a). A la concentración empleada - aproxi-

madamente 3 mM para cada azúcar - la hexoquinasa I procede a la  $V_{max}$  y, puesto que el coeficiente de fosforilación es 0,65 para manosa respecto a 1 para glucosa (47); de no existir una regulación por los productos, podría estar favorecida la utilización de glucosa. Sin embargo, tanto en los experimentos con particulado de corteza cerebral como in vitro (46) se observa un consumo preferencial de manosa con respecto a glucosa (2 a 1), para concentraciones iguales y saturantes de los azúcares.

La observación de que la masa total de azúcares consumidos en las situaciones descritas resulte siempre semejante (Fig. 12) puede relacionarse con la regulación del equilibrio de la forma soluble de hexoquinasa y la unida a membranas mitocondriales, el ajuste se produciría principalmente a consecuencia de modificaciones en la relación ATP/ADP que al aumentar induce la solubilización de la enzima, que resulta menos activa (78,96).

Si se incubaba Man (50 ug/cav.) con 10 uCi de Man-2  $^3\text{H}$ /cav., no se observa marca de  $^3\text{H}$  en la proteína, a diferencia de lo que ocurre frente a igual masa de glucosa (50 ug/cav.). Por lo expuesto, una discriminación de glucosa y manosa podría tener lugar intracelularmente en una etapa posterior a la fosforilación. La vía propuesta por Sharon (97) se muestra en el Esquema V y explicaría los hallazgos

experimentales. Luego del ingreso de glucosa como Glu-6-P y de Man-2  $^3\text{H}$  como 2  $^3\text{H}$ -Man-6-P, la 2  $^3\text{H}$ -Man-6-P ingresa al "pool" de Man-6-P, desde donde se transmite en una serie de reacciones prácticamente irreversibles (97) a la glicoproteína, de la cual puede recuperarse en forma de manosa.

#### 4.7. Caracterización de productos.

Se ha verificado que prácticamente toda la marca de  $^3\text{H}$  unida a proteína es lábil a la proteasa y muy poco sensible a la  $\beta$ -eliminación (Tabla I). Estos datos están de acuerdo con los porcentajes descritos de glicoproteínas con uniones N-glicosídicas (95%) en el SNC (2,10) y también indican que la proporción de glicoproteínas con probables uniones O-glicosídicas que contienen manosa, y que de los tejidos de mamífero solo se han descrito en el SNC (98), se biosintetizan en proporción muy baja frente al resto, tanto a los 5 como a los 30 días de edad. La presente metodología de marcación podría permitir el aislamiento en forma intacta de las GP sensibles al álcali débil solamente en presencia de  $\text{NaBH}_4$  (98). Asimismo solo pudo observarse  $^3\text{H}$ -manosa en la cromatografía del hidrolizado ácido fuerte de los productos de proteólisis (Fig. 19). Estos datos se corresponden con lo propuesto para la vía de marcación a partir de Man-2  $^3\text{H}$  y con la estructura general de las GP de tipo N-Asp, medidas

como producto frío acumulado en el SNC (99).

4.8. Efecto de variaciones en la oferta de azúcares en el medio.

En el medio de incubación probablemente aparece  $^3\text{H}_2\text{O}$ , debido a que el consumo de manosa sólo puede medirse llevando a seco en medio ácido, y el recambio de agua en las células del SNC ocurre cada 15 segundos (100). Esta situación es más notable cuando la glucosa se reduce en concentración de 1 g/l a 0,05 g/l. La curva de manosa remanente (Fig. 13) fue imposible de obtener sin un secado muy exhaustivo en medio ácido, sugiriendo que casi en ausencia de glucosa, la vía Man-6-P a Fru-6-P se encuentra muy desplazada hacia Fru-6-P, por déficit de Fru-6-P. En este mismo experimento además de la alteración de la cinética de incorporación de  $^3\text{H}$  a GP ya mencionada, puede decirse también que el déficit de glucosa, reflejado en una disminución de Fru-6-P, podría producir un incremento de la AE de Man-6-P, pues se reduciría la conversión de Fru-6-P a Man-6-P y, por consiguiente, los valores de AE en la GP podrían ser superiores a los obtenidos cuando se incubaba con glucosa (1 g/l), reflejando un valor no proporcional a la síntesis en condiciones fisiológicas de provisión de nutrientes.

Por otro lado, si la cantidad de Man-2  $^3\text{H}$  se incrementa, manteniendo constante la glucosa (1 g/l), la radioactividad en la GP no aumenta de manera directamente proporcional por encima de 10 uCi, tanto para corteza cerebral de 5 y 30 días como se muestra en la Fig. 16a. Este fenómeno puede ser interpretado como sigue. Luego del ingreso de la Man-2  $^3\text{H}$  a la célula se forma 2  $^3\text{H}$ -Man-6-P que se distribuye por el citoplasma y llega a los sitios de transformación a Man-1-P y Fru-6-P. La cantidad de marca observada en la glicoproteína es un reflejo de la actividad específica de  $^3\text{H}$  en 2  $^3\text{H}$ -Man-6-P. El aumento de concentración de Man-6-P sería corregido por la enzima fosfomanosa isomerasa, desplazando el equilibrio hacia Fru-6-P. Los datos obtenidos en esta tesis indican una utilización de glucosa del orden de 20  $\mu\text{g mg P}^{-1} \text{h}^{-1}$  y de Man-2  $^3\text{H}$  de 30  $\text{ng mg P}^{-1} \text{h}^{-1}$  en las condiciones de marcación empleadas para corteza cerebral de 5 días (sección 3.6.). Tanto la glucosa como la Man-2  $^3\text{H}$  son metabolizados principalmente vía Fru-6-P (95), como se indica en el esquema V.

A partir de 10 uCi de Man-2  $^3\text{H}$ /cav., incrementos adicionales del precursor en el medio resultarían en una incorporación de  $^3\text{H}$  a GP cada vez menos proporcional a la cantidad de precursor si la actividad específica de  $^3\text{H}$  en 2- $^3\text{H}$ -Man-6-P resultara más parecida a la de Man-2  $^3\text{H}$  del

medio. Esto último podría tener lugar si la concentración de Man-6-P tuviera un nivel constante y la conversión de Fru-6-P a Man-6-P fuera constante o disminuyera. Los experimentos realizados empleando solamente Man-2  $^3\text{H}$  (1 g/l) como precursor (Sección 3.11.2.) permiten descartar la influencia de la vía metabólica Glu-6-P a Fru-6-P y corroboran que para 10 uCi/cav. (+ Glu) la dilución mínima de Man-2  $^3\text{H}$  (133 Ci/g) en precursores de GP es de 11,5 veces, mientras que para 100 uCi/cav. (+ Glu), es solo de 2,6 veces. Puesto que existe provisión continua de Man-2  $^3\text{H}$  desde el medio, el estado estacionario de marcación se produciría a nivel de la fosfomanosa isomerasa, lo que permite obtener cinéticas estrictamente lineales de incorporación de Man-2  $^3\text{H}$  a GP. La pérdida de linealidad de la marcación por encima de 10 uCi (Fig. 16a) no podría explicarse por saturación de sitios en la fosfomanosa isomerasa ( $V_{\text{max}}$ , Man-6-P a Fru-6-P), pues esta misma enzima es capaz de transformar masas de Man-6-P mucho mayores, como ocurre cuando el único nutriente es la manosa (1 g/l, sección 3.5.). Los resultados de la Fig. 16a también indican que para los experimentos destinados al estudio de estructuras en que no se requiera alta actividad específica en el producto, es más conveniente marcar con no más de 10 uCi y en presencia de glucosa. El rendimiento es alrededor de 3 veces mayor a igualdad de marca.



#### 4.9. Permanencia de la marca en el producto.

Los experimentos de "pulso" y "chase" (sección 3.13.) permiten observar la ausencia de inercia en la marcación, posiblemente por tratarse de masas de precursores muy pequeñas y con velocidades de recambio altas. En otros casos, ha sido comunicado que una expansión (dilución) de precursores con Man-2 <sup>3</sup>H no parece ocurrir (23). Por otro lado, la estabilidad de la marca en el producto durante el "chase" indica un recambio lento de las GP formadas, en coincidencia con los valores comunicados para las proteínas del SNC del orden de días (10,99). Algunas glicoproteínas de gran importancia en el SNC, por ejemplo la enzima acetilcolinesterasa, que tiene isoenzimas de vida media tan corta como 2,8 hs (99a), probablemente constituya una fracción muy baja del total de GP biosintetizadas, a juzgar por los datos obtenidos de recambio (Fig. 18). El procedimiento de "chase" utilizado da igual resultado para corteza cerebral de 5 días cuando se realiza con medio conteniendo 1 mM de manosa o sin este azúcar, en coincidencia con comunicaciones previas al respecto (23).

4.10. Cuantificación de la biosíntesis de glicoproteínas en estado estacionario de marcación.

De las condiciones estudiadas puede concluirse que para obtener un estado estacionario de marcación, la máxima cantidad de proteína a incubar es de alrededor de 180 ug/50 ul de medio con concentración fisiológica de glucosa (1 g/l). Como consecuencia de la utilización indistinta de glucosa y Man-2 <sup>3</sup>H del medio, la relación de masa Glu/Man-2 <sup>3</sup>H se mantiene constante (independientemente del consumo), durante las 3 horas de incubación. Adicionalmente, con glucosa a nivel fisiológico, el tejido recibe una oferta sostenida del nutriente y del precursor radioactivo, y se satisface la utilización.

Por otro lado, si se emplea un bajo nivel de glucosa (0,05 g/l) en el medio de incubación, la oferta de Man-2 <sup>3</sup>H disminuye notablemente (Fig. 13) y la utilización típica resulta muy limitada al acercarse la concentración de azúcares del medio al Km de la hexoquinasa I. Estas últimas condiciones impiden lograr un estado estacionario de marcación.

En el esquema V se indica el diagrama cuantitativo de flujo de la Man-2 <sup>3</sup>H para corteza cerebral de rata de 5 días, logrado en base a los resultados experimentales obte-

nidos en esta tesis. Similares resultados a los obtenidos en el SNC de rata parecen lograrse en la marcación de epidídimo de rata con Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa (eficiencia =  $1\% \text{ mgP}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) y sin la aparente desaparición artefactual de lípido-oligosacáridos del camino del dolicol como ocurre en el caso de efectuarse la marcación en ausencia de glucosa (101).

Todas las rectas de la Fig. 20 pueden proyectarse a la abscisa a un valor de aproximadamente 15 min en lugar de 0, lo que estaría relacionado con el tiempo requerido para llegar a un estado estacionario de marca en los precursores que en otros casos fue determinado en aproximadamente 15 min (23).

La fracción lábil al ácido (HCl 0,015 N,  $100^\circ\text{C}$ , 15 min), proveniente de la fase clorofórmica de una partición de Folch, realizada a incubaciones de particulado de corteza cerebral de 5 días en condiciones de estado estacionario de marcación, no mostraron variación alguna en el nivel de radioactividad entre los 10 y 30 minutos de incubación del tejido (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren la posibilidad de que intermediarios tales como Dol-P-Man puedan encontrarse en estado estacionario de marcación a los 10 minutos de incubación.

Adicionalmente, para el SNC de 5 y 30 días, las rela-

ciones de marca incorporada se mantienen tanto con 10 uCi de precursor o 100 uCi (Fig. 16).

Las pendientes a las rectas de incorporación de Man-2  $^3\text{H}$  determinadas a distintas edades (Fig. 20) reflejan la velocidad de glicosilación. Sin embargo, una concepción estricta del problema hace que solo puedan compararse cambios en la velocidad a una misma edad, ya que para cada edad existe un estado estacionario de marcación y cualquier diferencia en las pendientes podría atribuirse a una modificación en la velocidad y no en la actividad específica de los precursores, cuya determinación constituye un dato imprescindible para la medición de velocidades absolutas. Debido a las muy pequeñas cantidades de tejido y a los bajos niveles de los precursores, estos problemas son difíciles de resolver (50).

Una estimación de la dilución de los intermediarios cuando se marca con Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa puede obtenerse como se indicó en la Sección 3.11.2. Cuando la manosa es el único azúcar presente en el medio en concentración fisiológica (1 g/l), una masa de 20  $\mu\text{g}$   $\text{mg P-1 h}^{-1}$  del azúcar debe transformarse en Man-6-P y este último precursor a Fru-6-P. La vía por la cual se utiliza la mayor parte de manosa o glucosa es la que convierte Fru-6-P en Fru-1,6-DiP (95), siendo la velocidad de utilización de

Fru-6-P mayor que la de fosforilación de los azúcares por la hexoquinasa I (78). Por esta razón, en presencia de manosa como único azúcar, la enzima fosfomanosa isomerasa debe modificar su equilibrio hacia Fru-6-P, aumentando notablemente la actividad específica en los precursores de las GP a diferencia de lo que ocurre en presencia de glucosa. La Fig. 16b ilustra los resultados, pudiendo observarse que para 10 uCi de Man-2  $^3\text{H}$ /cav. (+ Glu) la actividad específica máxima a nivel, por ejemplo, de Man-6-P es de 11,5 Ci/g ó, expresado de otra manera, la Man-2  $^3\text{H}$  (133 Ci/g) se diluye al menos 11,5 veces. Estudios cinéticos directos con Man-2  $^3\text{H}$  a concentración fisiológica (imprescindible para lograr un estado estacionario de marcación) requerirían 50 veces más radioactividad que cuando se combinan Man-2  $^3\text{H}$  y Glu (1 g/l), para lograr igual incorporación de  $^3\text{H}$  en GP.

Los resultados obtenidos en la Sección 3.11.3. sugieren que el equilibrio de la fosfomanosa isomerasa (E-Man-6-P: E-Fru-6-P) no generaría una significativa modificación de la AE de 2- $^3\text{H}$ -Man-6-P, que pudiera haberse originado en la liberación del tritio de la posición C-2 de la 2- $^3\text{H}$ -Man-6-P. El empleo de la Man- $^{14}\text{C}$  permite la marcación de glicoproteínas de una manera semejante a cuando se utiliza Man-2  $^3\text{H}$ ; esto se debe a que la masa de Man- $^{14}\text{C}$  que ingresa a la célula en presencia de glucosa es de unos 30 ng mg P $^{-1}$  h $^{-1}$ ,

mientras que en iguales condiciones, la glucosa se utiliza a razón de  $20 \text{ ug mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Puesto que la masa de glucosa es utilizada principalmente vía Fru-6-P, la dilución que experimenta la Man- $^{14}\text{C}$  a nivel de Fru-6-P es suficientemente grande como para no originar marcación apreciable en los productos originados a partir de Fru-6-P. En cambio, y tal como ocurre con la Man-2  $^3\text{H}$ , la vía Man-6-P a GP se encuentra favorecida para la marcación (Esquema V). La Fig. 16c muestra que solo pudo obtenerse manosa de la cromatografía de los productos insolubles en TCA caliente provenientes de la marcación con Man- $^{14}\text{C}$ .

Por lo expuesto ha podido calcularse (previa corrección de AE) la masa de manosa transferida a GP cuando se utiliza Man- $^{14}\text{C}$  en presencia de glucosa en  $1,7 \text{ ng mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , asumiendo un factor de dilución a nivel de Man-6-P de 11,5, que fuera calculado para la Man-2  $^3\text{H}$  en presencia de glucosa, como se indica en la Sección 3.11.2. La masa de manosa transferida a GP en este último caso resultó de  $1,7\text{-}2,9 \text{ ng mg P}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (calculada para los diferentes valores extremos obtenidos) y, por lo tanto, no se aprecia una diferencia en el metabolismo de la Man-2  $^3\text{H}$  o de la Man- $^{14}\text{C}$  respecto a la marcación de las GP, lo cual permite descartar una dilución de la marca en el precursor 2- $^3\text{H}$ -Man-6-P debido a la posición del tritio en el C-2 de la manosa.

#### 4.11. Comparación con otros procedimientos.

La metodología empleada puede compararse al procedimiento de "flooding" que se utiliza en la evaluación de síntesis de proteínas in situ (102,103). Este procedimiento consiste en inyectar al animal una gran cantidad de leucina de baja actividad específica, luego de cierto tiempo se llega a un estado estacionario y se asume que los intermediarios intracelulares tienen la actividad específica del precursor (104,105). En el caso de la marcación de GP con Man-2 <sup>3</sup>H en presencia de Glu, se crea un estado estacionario a partir de los dos azúcares, que se seleccionan intracelularmente y la AE en los intermediarios resulta constante para corteza cerebral de la misma edad. Algunas dificultades descritas para la medición de síntesis proteica con la técnica in situ (16,106) no tienen lugar en las condiciones de incubación descritas en esta tesis debido a que la concentración de leucina prácticamente no se altera por la inclusión del precursor marcado y el tejido incubado carece de barrera hematoencefálica, con lo cual los principales sistemas saturables y limitantes del transporte de aminoácidos in situ quedan eliminados (71). La relación de valores de biosíntesis de proteínas obtenidos en esta tesis para el período de desarrollo del SNC de la rata (Fig. 15)

coinciden con lo informado previamente tanto in vivo como in vitro (107,108,109).

#### 4.12. Efecto de la estreptomina.

El efecto de la estreptomina (Sm) sobre la biosíntesis de GP ha sido estudiado en las condiciones óptimas previamente establecidas. El interés teórico por este antibiótico se basa en la notable toxicidad que tiene la Sm en el SNC de los mamíferos y puede decirse que prácticamente el tejido nervioso es el único perjudicado por la Sm cuando existen alteraciones en la permeabilidad de la barrera hemoencefálica o cuando por accidente se inyecta el antibiótico en proximidades de un nervio (29).

Asimismo, en tratamientos con Sm, son habituales los daños al nervio auditivo y óptico, dependiendo de la magnitud de la dosis y el tiempo que se administra (28). La inyección de Sm en el SNC de animales produce graves síntomas que pueden culminar en la muerte en un período de 6 a 8 horas (29). El hecho de que la Sm no se una a polirribosomas de células eucariotes hace pensar que el sitio de acción del antibiótico se encuentra a otro nivel (30).

En esta tesis se ofrece evidencia de que la Sm interfiere la glicosilación de proteínas del tipo N-Asp en la corteza cerebral de ratas de 5 días de edad (Fig. 21). Este



fenómeno tiene lugar sin aparente afectación de la incorporación de Leu-4,5  $^3\text{H}$  a proteína (Fig. 23) como podría esperarse de no interferir la Sm con los polirribosomas. El antibiótico tampoco altera la desaparición de azúcares del medio (Fig. 22). El sitio específico donde se detiene la glicosilación es a nivel de la transferencia del oligosacárido a la proteína (Fig. 24). Este efecto difiere del de todos los inhibidores de la glicosilación descritos hasta el momento (7,9).

El estudio de la actividad de la enzima Dol-P-P-Glu<sub>3</sub>--oligosacárido: proteína oligosacaril transferasa in vitro en presencia y ausencia de Sm no muestra diferencias (Fig. 25). Estos datos podrían corresponderse con el tiempo relativamente largo (90 min) en que se observa la detención de la incorporación de  $^3\text{H}$  de Man-2  $^3\text{H}$  a proteína, pues una posibilidad es que la Sm sufra una transformación en el tejido hacia una forma molecular que ejerce los efectos mencionados, para lo cual se requeriría la integridad del tejido. Otra posibilidad es que la Sm genere una disociación espacial entre el sitio de biosíntesis de la proteína y el de glicosilación. De esta manera, los péptidos nacientes no podrían resultar aceptores. La susceptibilidad de células de mamífero (no nerviosas) a la Sm consiste principalmente en una inhibición de la división a tiempos cortos de incubación

(3-6 horas) y muerte celular posterior (48-72 hs). Estos efectos han sido informados solamente con muy altas dosis del antibiótico (3-5 mg/ml) y desaparecen por debajo de 2 mg/ml (110). En el caso del efecto de la Sm sobre el SNC, descrito en esta tesis, la concentración empleada en las incubaciones es de 100 ug/ml, valor que es menor o igual que las dosis terapéuticas usuales, eficaces desde el punto de vista antimicrobiano. Se ha sugerido que el efecto de altas dosis de Sm sobre células de mamífero (no del SNC) pudiera deberse a que el antibiótico produce una alteración en la síntesis proteica que se expresaría en proteínas anormales, más ricas en algún aminoácido (110a).

El efecto de la Sm sólo pudo observarse en la corteza cerebral de ratas de 5 días de edad. Experimentos realizados en igualdad de condiciones con corteza cerebral de 15 días no mostraron disociación entre la incorporación de Man-2 <sup>3</sup>H y de Leu-4,5 <sup>3</sup>H a proteína. El efecto de la estreptomycin plantea la posibilidad de una regulación del camino del dolicol mediada por mecanismos aún no aclarados.

#### 4.13. El método de detección térmico-ultravioleta.

El método térmico-UV desarrollado en esta tesis para detección de carbohidratos es simple, sensible y rápido. La detección de compuestos orgánicos después de cromatografía o

electroforesis en papel es llevada a cabo por vía seca y sin el agregado de reactivos. Una de las grandes ventajas del procedimiento es que permite la recuperación del 98% de la radioactividad de glucosa, con preservación de importantes propiedades químicas y cromatográficas después de la detección. Igual magnitud de recuperación se logra para lisina. Una pequeña cantidad de la muestra sufriría descomposición suficiente como para permitir la detección, mientras que el resto del compuesto permanecería sin afectarse.

Comparado con el método de revelado con sales de plata, la detección térmica-UV tiene el mismo orden de sensibilidad para glucosa (50 nmoles/cm<sup>2</sup>) y es más sensible para la detección de glucosamina (25 nmoles/cm<sup>2</sup>). Más aún, la presencia de grupos reductores no es requerida, como el caso de los métodos con AgNO<sub>3</sub>. Por ejemplo, glucosa-1-P, ácido succínico y cítrico son detectados tan fácilmente como glucosa.

#### 4.14. Recuperación de compuestos detectados.

El comportamiento cromatográfico de la glucosa parece no afectarse después de la detección térmica-UV, como se indica en la sección 3.2.4. Adicionalmente, más del 96% del compuesto obtenido después de dos tratamientos térmicos secuenciales es sustrato adecuado de la enzima glucosa oxi-

dasa. Los resultados obtenidos con las sustancias descritas en la Tabla II sugieren que diferentes tipos de compuestos orgánicos podrían ser detectados con este procedimiento si las condiciones siguientes se satisfacen (para papel): el compuesto debe comenzar a descomponerse o cambiar su estructura a temperaturas inferiores a 260°C, que es la temperatura a la que se descompone la celulosa, que constituye la matriz del papel. Esta descomposición se acompaña de fluorescencia. El calentamiento de los compuestos no debe producir la volatilización de éstos.

La detección de compuestos como los N-acetil aminoácidos ha sido resuelta por el empleo del revelado térmico-UV (54). En este caso, el bloqueo de los grupos amino impide la reacción con ninhidrina y los demás procedimientos por vía húmeda han sido hasta el momento insatisfactorios (112,113). Las sustancias detectadas sobre papel generan una fluorescencia azulada al principio del calentamiento e independientemente de la naturaleza de los compuestos.

Por otro lado, compuestos que tienen una temperatura de detección alta (P.ej.: 230°C) resultan difíciles de visualizar en papel debido al incremento del fondo fluorescente. Estas limitaciones se resuelven por completo en cromatografía en capa delgada sobre sílica gel (TLC)

donde las temperaturas no producen fluorescencia de la matriz en un amplio rango (20-360°C) y los colores fluorescentes generados guardan relación con la estructura de los compuestos detectados. Aún después de 12 horas a 260°C, el sílica gel no genera fluorescencia apreciable a simple vista.

#### 4.15. Detección diferencial de carbohidratos.

El hecho de que diferentes tipos de azúcar tengan también distintas temperaturas de detección constituye un hallazgo en el sentido de poder caracterizar azúcares al mismo tiempo que se los detecta. El rango de temperaturas en las cuales los compuestos presentan fluorescencia y no pueden aún apreciarse con luz visible, resulta óptimo para la recuperación de los carbohidratos de manera prácticamente cuantitativa. Esta característica del método térmico-UV aplicado a TLC permite la detección y recuperación de glucosa, glucosamina, manosa y metilglucósidos (32). En todos los casos se recupera radioactividad con igual Rf que el compuesto original. En el caso de la glucosa, pudo demostrarse también el mantenimiento de propiedades químicas como para ser reconocido por la enzima glucosa oxidasa y con alta recuperación (96%) luego del calentamiento.

#### 4.16. Sensibilidad en TLC.

La sensibilidad para la detección de carbohidratos es mucho mayor en TLC que sobre papel. Pueden detectarse 1 nmol de glucosamina, glucosa y manosa con excelente contraste (32). Pruebas realizadas en corridas cromatográficas de maltooligosacáridos (1-9 unidades de Glu) en las que se revelan las placas con un método convencional en base a ácido sulfúrico y calor, y otras placas semejantes reveladas por el método térmico-UV permiten establecer una sensibilidad igual o mejor cuando se emplea el último método. Adicionalmente, la placa no desarrolla fondo fluorescente apreciable ni difusión de bandas y el procedimiento se realiza simplemente calentando durante 15 min a 200°C (114).

El método térmico-UV puede ser aplicado exitosamente a la detección de lípidos tales como el geraniol, dolicol, colesterol, escualeno,  $\beta$ -sitosterol, cerebrosidos, triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres que pueden detectarse fácilmente luego de calentar durante 15 min a 200°C. La sensibilidad es comparable o mejor que la que se obtiene por carbonización con ácido sulfúrico ( $\leq$  1 ug dolicol, ácido oleico y colesterol), (32).

Para la generación de compuestos fluorescentes es necesaria la presencia de un soporte (papel, sílica gel,

papel de vidrio), ya que el calentamiento de las sustancias sobre vidrio no genera fluoróforos en un amplio rango de temperaturas (33). Estas observaciones son compatibles con transformaciones de compuestos orgánicos debidas a interacciones secundarias con el adsorbente previamente descriptas (55,56,57).

Varios mecanismos fueron postulados por otros autores para la generación de compuestos fluorescentes sobre sílica gel empleando calor junto con reactivos químicos. Entre ellos puede mencionarse la proposición de que los compuestos fluorescentes son formas cristalinas rígidas unidas a la matriz de sílica gel. Estos autores no logran recuperar los compuestos de manera reproducible y la detección se realiza a temperaturas elegidas sin una base clara, además de que se añaden reactivos para inducir la fluorescencia (57,115,116). Por su parte, otros autores encuentran incremento de la fluorescencia de sustancias aromáticas que originalmente son fluorescentes, cuando las calientan sobre un soporte (117,118,119). En este último caso se atribuye la mayor fluorescencia al secado de los compuestos que realizan a temperaturas de 90-120°C.

#### 4.17. Derivados fluorescentes solubles.

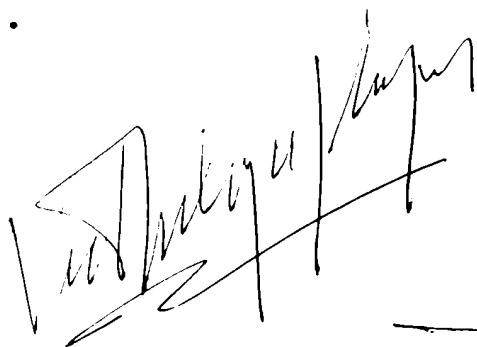
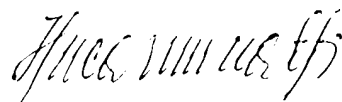
En esta tesis se ha establecido un patrón de temperaturas de detección que permite una recuperación prácticamente cuantitativa de la substancia original. En estas condiciones se pueden recuperar también los compuestos fluorescentes en solución acuosa y de una manera muy reproducible. De esta forma se demuestra que la presencia del adsorbente es necesaria para la generación, pero no para el mantenimiento de la fluorescencia y que la misma es sumamente estable en presencia de agua, en un amplio rango de temperatura y pH (33). Se ha observado también que la fluorescencia no se pierde luego del filtrado de la solución por filtros de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro, lo cual descartaría la posibilidad de que estuviera ligada a partículas de sílica gel no sedimentables a 1000 x g.

Las soluciones acuosas de los fluoróforos resultan muy apropiadas para el estudio de los espectros de fluorescencia, ya que las bandas sobre sílica gel no tienen una distribución regular de masa (55,117) y usualmente debe recurrirse a un filtrado (no siempre eficiente) de la luz de excitación que es reflejada por la matriz de sílica gel (117,120). Adicionalmente las placas de sílica gel son muy difíciles o imposibles de manejar dentro de un fluorómetro



convencional. Los resultados de esta tesis muestran por primera vez los espectros de emisión de fluorescencia en solución para los derivados de glucosa y glucosamina (Fig. 31), que son muy reproducibles y bien diferenciados.

Las propiedades cromatográficas usuales de un compuesto dado, junto con el patrón característico de temperaturas de detección y la precisa determinación de los espectros de fluorescencia en solución, permitiría una gran discriminación entre sustancias muy relacionadas y podría resultar de gran ayuda en casos como los de los metilglucósidos, en donde el cambio de posición de un metilo se acompaña de gran variación en el color de la fluorescencia luego del calentamiento (32). Finalmente, se destaca el hecho que al mismo tiempo que se detectan e identifican, los compuestos originales pueden recuperarse casi cuantitativamente y con la mayor parte sino con todas las propiedades.

A large, stylized handwritten signature in black ink, possibly reading 'V. M. ...'.A smaller handwritten signature in black ink, possibly reading 'Hugo ...'.A horizontal handwritten signature in black ink, possibly reading '...'

5. REFERENCIAS

1. Sharon, N. y Lis, H., Chemical and Engineering News, March 30 (1981) 21.
2. Krusius, T. y Finne, J., Eur.J.Biochem. 78 (1977) 369.
3. Finne, J., Biochim.Biophys.Acta 412 (1975) 317.
4. Parodi, A.J. y Leloir, L.F., Biochim.Biophys.Acta 559 (1979) 1.
5. Gibson, R., Kornfeld, S., y Schlesinger, S., Trends Biochem.Sci. 5 (1980) 290.
6. Lennarz, W.J. (Ed.), The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum Press, New York, 1980.
7. Hemming, F.W., Bioscience Reports, 2 (1982) 203.
8. Hubbard, S.C. e Ivatt, R.J., Annu.Rev.Biochem. 50, (1981) 555.
9. Staneloni, R.J. y Leloir, L.F., Critical Reviews in Biochemistry, CRC Press, Cleveland, OH., 1982.
10. Margolis, R.U. y Margolis, R.K. (Eds.), Complex Carbohydrates of Nervous Tissue, Plenum Press, New York, 1979.
11. Margolis, R.U. y Margolis, R.K., Biochemistry 13 (1974) 2849.
12. Rearick, J.I., Chapman, A. y Kornfeld, S., J.Biol.Chem. 256 (1981) 6255.
13. Gershman, H. y Robbins, P.W., J.Biol.Chem. 256 (1981)

7774.

14. Turco, S.J., Arch.Biochem.Biophys. 205 (1980) 330.
15. Sloviter, H.A. y Kamimoto, T., J.Neurochem. 17 (1970) 1109.
16. Pardrige, W.M., Physiol.Rev. 63 (1983) 1481.
17. Ames, A. y Gurian, B.S., J.Neurophysiol. 26 (1967) 617.
18. Tkacz, J.S., Tunicamicin and Related Antibiotics, en Antibiotics VI, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1982.
19. Atienza-Samols, S.B., Pine, P.R. y Sherman, M.I., Dev.Biol. 79 (1980) 19.
20. Keller, R.K., Boon, D.Y. y Crum, F.C., Biochemistry 18 (1979) 3946.
21. Keenan, R.W., Hamill, R.L., Occolowitz, J.L. y Elbein, A., Biochemistry 20 (1981) 2968.
22. Yusuf, H.K.M., Gottfried Pohlentz y Sandhoff, K., Proc.Natl.Acad.Sci. 80 (1983) 7075.
23. Hubbard, S.C. y Robbins, P.W., J.Biol.Chem. 255 (1980) 11782.
24. Grant, S.R. y Lennarz, W.J., Eur.J.Biochem. 134 (1983) 575.
25. Schwarz, R.T. y Datema, R., The Glycoconjugates, Vol. III, Academic Press, 1982.

26. Stark, N.J. y Heath, E.C., Arch.Biochem.Biophys. 192 (1979) 599.
27. Datema, R. y Schwarz, R.T., J.Biol.Chem. 256 (1981) 11191.
28. Corcoran, J.W. y Hahn, F.E. (Eds.), Antibiotics III, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1975.
29. Goodman, L.S. y Gilman, A. (Ed.), The Pharmacological Basis of Therapeutics, Chapter 58, The Macmillan Co., New York, 1966.
30. Vazquez, D., Inhibitors of Protein Biosynthesis, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1979.
31. Alperín, D.M., Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H., J.Chromatogr. 242 (1982) 299.
32. Alperín, D.M., Carminatti, H., Idoyaga-Vargas, V. y Couso, R., J.Chromatogr. 265 (1983) 193.
33. Alperín, D.M., Iusem, N.D., Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H., J.Chromatogr. 295 (1984) 123.
34. Pucci, P.R., Parodi, A.J. y Behrens, N.H., Anales Asoc.Quím. Argentina 60 (1972) 203.
35. Bray, G.A., Anal.Biochem. 1 (1960) 279.
36. Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H., Biochem J. 202 (1982) 87.
37. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Carminatti, H., Proc.Natl.Acad.Sci. 69 (1972) 3268.

38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., J.Biol.Chem. 193 (1951) 265.
39. Storer, T.I., Usinger, R.L., Stebbins, R.C. y Nybakken, J.W., en General Zoology, McGraw-Hill, New York, 1975.
40. Glowinski, J. y Iverson, L.L., J.Neurochem. 13 (1966) 655.
41. Bazán, N.G., Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Tucumán, 1970.
42. Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H., J.Biol.Chem. 266 (1957) 497.
43. Parodi, A.J., Quesada Allue, L.A. y Cazzulo, J.J., Proc.Natl.Acad.Sci. 78 (1981) 6201.
44. Behrens, N.H., Parodi, A.J. y Leloir, L.F., Proc.Natl.Acad.Sci. 68 (1971) 2857.
45. Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. y Dankert, M., Biochim.Biophys.Acta 270 (1972) 529.
46. Slein, M.W., Cori, G.T. y Cori, C.F., J.Biol.Chem. 186 (1950) 763.
47. Sols, A. y Crane, R.K., J.Biol.Chem. 210 (1954) 581.
48. Ellison, W.R., Lucck, J.D. y Fromm, H.J., J.Biol.Chem. 250 (1975) 1864.
49. Casazza, J.P. y Fromm, H.J., Arch.Biochem.Biophys 177 (1976) 480.

50. Barondes, S.H., en Basic Neurochemistry, Siegel, G.J., Albers, W.R., Katzman, R. y Agranoff, B.W. (Eds.), Little, Brown and Co., Boston, 1976, pag. 333.
51. Krzeczowska, I. Ann.Univ. Marie Curie-Sklodowska, Sect. D, 42 (1964) 343.
52. Weast, R.C. (Ed.) Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co., Cleveland, OH, 57 ed., 1977.
53. Windholz, M. (Ed.) The Merck Index, Merck, 9 ed, 1976.
54. Dubra, M.S., Alperín, D.M., Sagedahl, A., Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H., J.Chromatogr. 250 (1982) 124.
55. Shanfield, H., Lee, K.Y. y Martin, A.J.P., J.Chromatogr. 142 (1977) 387.
56. Lederer, E. y Lederer, M., en Chromatography, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1954, Capítulo 35.
57. Segura, R. y Gotto, A.M., J.Chromatogr. 99 (1974) 643.
58. Lowry, O.H. en Nerve as a Tissue, Rodahl, K., Isselkutz, B. (Eds.), Harper Row Publ., New York, 1966, pag. 163.
59. Lowry, O.H., Passoneau, J.V., Hasselberger, F.Y. y Schulz, D.W., J.Biol.Chem. 239 (1964) 18.
60. Cohen, M.M., J.Neurochem. 9 (1962) 337.
61. Dixon, K.C., Lancet August 5 (1967) 289.
- 61a. Vanucci, R.C. y Duffy, T.E., Am.J.Physiol. 230 (1976)

- 1269.
62. Varon, S. y McIlwain, H., J.Neurochem. 8 (1961) 262.
63. Bourke, R.S. y Tower, D.B., J.Neurochem. 13 (1966) 1071.
64. Tower, D.B. y Bourke, R.S., J.Neurochem. 13 (1966) 1119.
- 64a. Kaufman, L.M. y Barrett, J.N., Science 220 (1983) 1394.
- 64b. Tildon, J.T. y Stevenson, J.H., Science 224 (1984) 903.
65. Chaplin, E.R., Goldberg, A.L. y Diamond, I., J.Neurochem. 26 (1976) 701.
66. Bachelard, H.S., J.Neurochem. 18 (1971) 213.
67. Itoh, T. y Quastel, J.H., Biochem.J. 116 (1970) 641.
68. Lund-Andersen, H. y Kjeldsen, C.S., J.Neurochem. 29 (1977) 205.
69. Lund-Andersen, H y Kjeldsen, C.S., J.Neurochem. 27 (1976) 361.
70. Ames, A., Parks, J.M. y Nesbett, J., J.Neurochem. 27 (1976) 999.
71. Bradbury, M.W.B., Federation Proc. 43 (1984) 186.
72. Pardridge, W.M., Crane, P.D., Mietus, L.J. y Oldendorf, W.H., J.Neurochem. 38 (1982) 560.
73. Betz, A.L., Csejtey, J. y Goldstein, G.W.,

- Am.J.Physiol. 236 (Cell Physiol. 5) (1979) C. 96.
74. Alvares, F.L. y Nordlie, R.C., J.Biol.Chem. 252 (1977) 8404.
75. Bontemps, F., Hue, L. y Hers, H.G., Biochem.J. 174 (1978) 603.
76. Himwich, W.A. en Handbook of Neurochemistry, Lajtha, A. (Ed.), Plenum Press, New York, 1969, pag. 469.
77. Lund-Anderson, H., Physiol.Rev. 59 (1979) 305.
- 77a. Carson, D.D., Earles, B.J. y Lennarz, W.J., J.Biol. Chem. 256 (1981) 11552.
78. Maker, H.S., Clarke, D.D. y Lajtha, A.L. en Basic Neurochemistry, Siegel, G.J., Wayne Albers, R., Katzman, R., Agranoff, B.W. (Eds.), Little, Brown and Co., Boston, 1976.
- 78a. Tildon, J.T., Merrill, S. y Roeder, L.M., Biochem.J. 216 (1983) 21.
79. Lehrer, G.M. en Neurobiological Aspects of Maturation and Aging, Progress in Brain Research 40, Ford, D.H. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, 1973, pag. 219.
80. Borgström, L.K., Norberg, K. y Siesjö, B.K., Acta Physiol.Scand. 96 (1976) 569.
- 80a. Cremer, J.E. y Heath, D.F., Biochem.J. 142 (1974) 527.
81. Kennedy, C., Grave, G.D., Jehle, J.W. y Sokoloff, L., J.Neurochem. 19 (1972) 2423.



82. Klee, C.B. y Sokoloff, L.J., J.Biol.Chem. 242 (1967) 3880.
83. Sokoloff, L. en Basic Neurochemistry, Siegel, G.J., Wayne Albers, R., Katzman, R. y Agranoff, B.W. (Eds.), Little, Brown and Co., Boston, 1976, pag. 388.
84. Lewis, L.D., Ljunggren, B., Norberg, K. y Siesjö, B.K., J.Neurochem. 23 (1974) 659.
85. Tews, J.K., Carter, S.H. y Stone, W.E., J.Neurochem. 12 (1965) 679.
86. Gorell, J.M., Law, M.M., Lowry, O.H. y Ferrendelli, J.A., Neurology 25 (1975) 360.
87. Kety, S.S., Woodford, R.B., Harmel, M.H., Freyhan, F.A., Appel, K.E. y Schmidt, C.F., Am.J.Psychiatry 104 (1948) 765.
88. Sokoloff, L. en Handbook of Physiology-Neurophysiology, Field, J., Magoun, H.W. y Hall, V.E. (Eds.), American Physiological Society, Washington, 1960.
89. McIlwain, H. y Bachelard, H.S. en Biochemistry and the Central Nervous System, Williams and Wilkins, Baltimore, 1971.
90. Parodi, A.J., Lederkremer, G.Z. y Mendelzon, D.H., J.Biol.Chem. 258 (1983) 5589.
91. Cowan, E.P., Cummings, R.D., Schwartz, B.D. y Cullen,

- S.E., J.Biol.Chem. 257 (1982) 11241.
92. Cummings, R.D. y Kornfeld, S., J.Biol.Chem. 257 (1982) 11235.
93. Hsieh, P., Rosner, M.R. y Robbins, P.W., J.Biol.Chem. 258 (1983) 2548.
94. Varki, A. y Kornfeld, S., J.Biol.Chem. 258 (1983) 2808.
95. Morgan, M.J. y Faik, P., Bioscience Reports 1 (1981) 669.
- 95a. Wilson, J.E., Arch.Biochem.Biophys. 196 (1979) 79.
96. Knoll, H.R., Taylor, W.F. y Wells, W.W., J.Biol.Chem. 248 (1973) 5415.
97. Sharon, N. en Complex Carbohydrates, Addison Wesley Publishing Co., Massachusetts, 1975.
98. Finne, J., Krusius, T., Margolis, R.K. y Margolis, R.U., J.Biol.Chem. 254 (1979) 10295.
99. Margolis, R.K., Preti, C., Lai, D. y Margolis, R.U., Brain Res. 112 (1976) 363.
- 99a. Davis, G.A. y Agranoff, B.W., Nature 220 (1968) 277.
100. Raichle, M.E., Elchling, J.O. y Grubb, R.L., Arch.Neurol. 30 (1974) 319.
101. Iusem, N.D. y Alperín, D.M., Resultados no publicados.
102. Diemel, G.A., Pulsinelli, W.A., y Duffy, T.E., J.Neurochem. 35 (1980) 1216.

103. Dwyer, B.E., Donatoni, P. y Wasterlain, C.G.,  
Neurochem.Res. 7 (1982) 563.
104. Jefferson, L.S., Diabetes 29 (1980) 487.
105. McKee, E.E., Cheung, H.Y., Rannels, D.E. y Morgan,  
H.E., J.Biol.Chem. 253 (1978) 1030.
106. Pardridge, W.M., J.Neurochem. 28 (1977) 103.
107. Johnson, D.E. y Sellinger, O.Z., J.Neurochem. 18  
(1971) 1445.
108. Abdel-Latif, A.A. Y Abood, L.G., J.Neurochem. 13  
(1966) 1189.
109. Benjamins, J.A. y McKhann, G.M. en Basic Neuroche-  
mistry, Siegel, G.J., Wayne Albers, R., Katzman, R. y  
Agronoff, B.W. (Eds.), Little, Brown and Co., Boston,  
1976.
110. Moskowitz, M. y Kelker, N., Science 141 (1963) 647.
- 110a. Moskowitz, M. y Kelker, N., Nature 205 (1965) 476.
111. Trevelyan, W.C., Procter, D.P. y Harrison, J.S.,  
Nature (London) 165 (1950) 444.
112. Gal, E.M. y Greenberg, D.M., Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 71  
(1948) 88.
113. Zweig, G. y Sherma, J. (Eds.), en Handbook of Chroma-  
tography, Vol. I, CRC Press, Cleveland, OH., 1972.
114. Alperín, D.M. y Tolmasky, M., Resultados no publica-  
dos.

115. Thou, L., Shanfield, H., Wang, F.-S. y Zlatkis, A., J.Chromatogr. 217 (1981) 341.
116. Segura, R. y Navarro, X., J.Chromatogr. 217 (1981) 329.
117. Senthilnathan, U.P. y Hurtubise, R.J., Anal.Chem. 56 (1984) 913.
118. Hurtubise, R.J., Skar, G.T. y Poulson, R.E., Anal.Chim. Acta 97 (1978) 13.
119. Parker, R.T., Freedlander, R.S. y Dunlap, R.B., Anal.Chim. Acta 119 (1980) 1.
120. Klaus, R., J.Chromatogr. 16 (1964) 311.

6. ABREVIATURAS

AA:	aminoácidos.
AE:	actividad específica.
Asp:	asparragina.
ATP:	adenosina trifosfato.
CMP:	citidina monofosfato.
C:	concentración.
C <sub>f</sub> :	concentración final.
CHO:	carbohidratos.
Ci:	3,7 10 <sup>10</sup> desintegraciones/segundo.
D:	coeficiente de difusión.
d <sub>i</sub> , $\emptyset$ i:	diámetro interno.
DiP:	difosfato.
dmin:	mínima distancia al centro.
DMP:	dolicol monofosfato.
Dol:	dolicol.
FCS:	suero fetal bovino.
Fuc:	L-fucosa.
Gal:	galactosa.
GDP:	guanosina difosfato.
G, Glu:	glucosa.
GN,	GluNH: glucosamina.
GP:	glicoproteína/s.
h:	altura o espesor.
L:	factor de tortuosidad.

M, Man:	manosa.
MEM:	medio mīnimo esencial de Eagle.
NAcGluNH, AcGN:	N-acetilglucosamina.
NAcNeu:	ácido N-acetil neuramīnico, ácido siálico.
NCS:	solubilizador de tejidos (M.R.).
p/p:	peso/peso.
-P:	fosfato.
Pi:	fósforo inorgánico.
-P-P-:	pirofosfato.
PBS:	solución salina de fosfatos.
PPO:	2,5-difeniloxazol.
Q:	N,N'-diacetilquitobiosa.
RER:	retículo endoplásmico rugoso.
Sm:	estreptomicina.
SNC:	sistema nervioso central.
TCA:	ácido tricloroacético.
TLC:	cromatografía en capa delgada.
u,μ:	micro.
UDP:	uridina difosfato.
UV:	ultravioleta.
V:	voltios.
V <sub>f</sub> :	volumen final.
v/v:	volumen/volumen.
x g:	veces la aceleración de la gravedad.