

Tesis de Posgrado

Estudio del metabolismo del fosfatidil-dCMP en células eucarióticas

Iujvidin, Sonia

1986

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

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

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

Cita tipo APA:

Iujvidin, Sonia. (1986). Estudio del metabolismo del fosfatidil-dCMP en células eucarióticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2000_Iujvidin.pdf

Cita tipo Chicago:

Iujvidin, Sonia. "Estudio del metabolismo del fosfatidil-dCMP en células eucarióticas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2000_Iujvidin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL FOSFATIDIL-dCMP EN CELULAS EUCARIOTICAS

Autora

SONIA IUJVIDIN

Director de Tesis

Dr. JOSE MORDOH

Co-director

Dr. ISRAEL D. ALGRANATI

Lugar de trabajo

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS

"FUNDACION CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS

1986

A mi familia, a mis amigos,
a Mayali y Alejandra,
a Oscar

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es el fruto de seis años largos de trabajo; años intensos durante los cuales interactué con numerosas personas que, de una forma u otra, hicieron que esta Tesis fuera posible. Deseo expresarles mi agradecimiento:

Al Dr. José Mordoh, Director de Tesis, por sus enseñanzas, sus críticas y porque su calidez y una buena dosis de paciencia fueron determinantes en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haber otorgado las becas y los subsidios que posibilitaron este trabajo.

A la Fundación Campomar, en la persona de los miembros de la Comisión Directiva, por haberme permitido realizar gran parte de este trabajo de Tesis en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Dr. Israel Algranati, por haber aceptado la co-dirección formal de esta Tesis, a los efectos de presentarla en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A mis compañeros de laboratorio en la Fundación Cima, Hospital Castex y Fundación Campomar, por las hermosas horas compartidas, por el clima de camaradería y por la colaboración brindada en todo momento.

A mis compañeros del IIB, de quienes mucho aprendí, por los gratos momentos pasados.

A todo el personal técnico y administrativo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por su eficaz y cordial colaboración.

Al Lic. Daniel Gluschankof, por la elaboración de un programa de computación para ordenar las referencias bibliográficas.

A Norberto Malarini, por su dedicación en la confección de las figuras e ilustraciones de esta Tesis.

A Irene Cangiano, por su excelente disposición para la transcripción y corrección del manuscrito.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis ha sido publicada en los siguientes artículos:

"Inhibitory effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on the synthesis of phosphatidyl-dCMP".

Iujvidin, S., Feledi, C., Medrano, E. y Mordoh, J. (1983)

European Journal of Biochemistry 130, 293-296.

"Metabolism of phosphatidyl-dCMP in Sarcoma 180 cells. Effect of chlorpromazine, phosphatidic acid and inositol".

Iujvidin, S. y Mordoh, J. (1986)

European Journal of Biochemistry 154, 187-192.

INDICE

INTRODUCCION.

	Página
I. <u>Rol de los nucleótidos de citidina en la biosíntesis de fosfoglicéridos.</u>	1
I.1. Fosfolípidos. Generalidades.	1
I.2. Fosfoglicéridos. Estructura molecular y características generales.	3
I.3. Biosíntesis de fosfoglicéridos.	8
I.3.1. Biosíntesis de fosfoglicéridos en E. coli.	8
I.3.2. Biosíntesis de fosfoglicéridos en S. cerevisiae.	11
I.3.3. Biosíntesis de fosfoglicéridos en células eucarióticas. ..	12
I.3.3.1. Biosíntesis de ácido fosfatídico.	14
I.3.3.2. Biosíntesis de 1,2 diacilglicerol y los fosfoglicéridos neutros.	15
I.3.3.3. Biosíntesis de Ptd-CMP y los fosfoglicéridos ácidos	16
I.3.3.3.1. Degradación de los polifosfoinosítidos.	18
I.4. Control de la biosíntesis de fosfoglicéridos por drogas antifilílicas.	19
I.5. Metabolismo de los nucleótidos de citidina.	21
I.5.1. Metabolismo de la arabinosil-citosina.	24
I.5.1.1. Mecanismos de resistencia al ara-C.	25
II. <u>Transducción de señales extracelulares mediadas por la hidrólisis de fosfoinosítidos.</u>	27
II.1. Formación de inositol 1,4,5 trifosfato y movilización de Ca ²⁺	30
II.2. Acumulación de 1,2 diacilglicerol y activación de la proteína quinasa C.	35
II.3. Formación de araquidonato y sus metabolitos.	37
II.4. Interacciones sinergistas entre la vía de 1,2 diacilglicerol y la del inositol 1,4,5 trifosfato.	38
II.5. Crecimiento celular y oncogenes.	40
II.6. Inhibidores de la síntesis de fosfoinosítidos.	48

III. <u>Biosíntesis de Ptd-dCMP en células eucarióticas.</u>	51
III.1. Antecedentes inmediatos.	51
III.2. Objetivos de la investigación.	54

MATERIALES Y METODOS.

1. <u>Células y líneas celulares utilizadas.</u>	57
1.1. Timocitos de ratón.	57
1.2. Sarcoma 180 variedad ascítica.	57
1.3. Mieloblastos de pacientes leucémicos.	57
1.4. Línea celular HL-60.	58
2. <u>Inducción de diferenciación de HL-60 a neutrófilos maduros.</u>	59
2.1. Ensayo de NBT.	59
2.2. Coloración de Wright-Giemsa.	59
3. <u>Preparación de fracciones subcelulares.</u>	60
3.1. Aislamiento y purificación de núcleos.	60
3.2. Aislamiento de microsomas.	61
4. <u>Incorporación de precursores radioactivos a distintos sistemas celulares.</u>	61
4.1. Medición del transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$	61
4.2. Incorporación de $(^3\text{H})\text{Cyd}$ y $(^3\text{H})\text{dCyd}$ a células intactas.	61
Determinación de la radioactividad incorporada a la fase orgánica y a la fase ácido insoluble.	61
4.3. Incorporación de $(^3\text{H})\text{dThd}$ a células intactas.	62
4.4. Incorporación de $(^3\text{H})\text{dCTP}$ a células permeabilizadas.	63
4.5. Incorporación de $(^3\text{H})\text{dCTP}$ a núcleos.	63
4.6. Incorporación de $(^3\text{H})\text{ara-C}$ a células intactas.	63
4.7. Incorporación de $(^3\text{H})\text{Ins}$ a células intactas.	64

5. <u>Identificación de (³H)dCMP en los sobrenadantes de incubación.</u> ..	64
6. <u>Identificación y purificación de Ptd-(³H)dCMP.</u>	64
6.1. Identificación cromatográfica de Ptd-(³ H)dCMP proveniente de timocitos intactos y permeabilizados.	64
6.2. Separación cromatográfica de Ptd-CMP y Ptd-dCMP.	65
7. <u>Síntesis de fosfatidil-inositol en la fracción microsomal.</u>	66
7.1. Condiciones de incubación con (³ H)Ins.	66
7.2. Identificación cromatográfica del producto de reacción.	66
8. <u>Determinación de la viabilidad celular.</u>	67
8.1. Método de exclusión del azul tripan.	67
8.2. Método de formación de colonias en agar semisólido.	67
9. <u>Métodos varios.</u>	68
9.1. Tratamiento de los productos de incubación con DNAsa.	68
9.2. Incubación de células con anticuerpos monoclonales.	68
9.3. Determinación de la concentración de proteínas.	69
9.4. Determinación del contenido de fósforo de fosfolípidos.	69
9.5. Preparación de DNA coprecipitante.	69

RESULTADOS Y DISCUSION.

I. <u>Estudio del efecto del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP.</u>	70
I.1. Síntesis de Ptd-dCMP en timocitos de ratón. Efecto de CPZ. .	70
I.2. Identificación de los compuestos lipídicos sintetizados en timocitos intactos y permeabilizados.	73
I.3. Efecto del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA en timocitos intactos.	73
I.4. Efecto del ara-C sobre la hidrólisis del Ptd-dCMP.	75
I.5. Efecto del ara-C sobre el transporte de (³ H)dCyd.	81
I.6. Efecto del ara-CTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA.	81
I.7. Incorporación de (³ H)ara-C a la fase orgánica.	85
I.8. Efecto del dipiridamol sobre el transporte de (³ H)ara-C. ...	85

I.9. Modelo propuesto para explicar el efecto del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP.	89
II. <u>Síntesis de Ptd-dCMP en células de origen mieloide.</u>	93
II.1. Efecto del ara-C sobre mieloblastos de pacientes leucémicos.	93
II.1.1. Efecto del ara-C sobre la incorporación de (³ H)dCyd a Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos de pacientes con LMA. ...	93
II.1.2. Efecto del ara-CTP sobre la incorporación de (³ H)dCTP a Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos de pacientes con LMA. ...	95
II.1.3. Transporte de (³ H)ara-C en mieloblastos del paciente N°3.	97
II.2. Síntesis de Ptd-dCMP en la línea celular HL-60.	100
II.2.1. Síntesis de Ptd-dCMP y DNA en HL-60 en proliferación. ..	101
II.2.2. Síntesis de Ptd-dCMP y DNA en HL-60 inducidas a diferenciar.	101
II.2.3. Síntesis de Ptd-dCMP en células diferenciadas permeabilizadas.	105
II.2.4. Transporte de (³ H)dCyd en HL-60.	110
II.2.5. Efecto de la CPZ sobre la capacidad clonogénica de HL-60.	110
II.3. Discusión.	112
III. <u>Estudio del efecto de la clorpromazina sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA.</u>	116
III.1. Efecto de la CPZ sobre la hidrólisis de Ptd-dCMP.	116
III.2. Reversibilidad del efecto de CPZ.	121
III.3. Factores que afectan la síntesis de Ptd-dCMP en diferentes sistemas.	121
III.4. Rol del Ca ²⁺ en el efecto estimulador de CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP.	126
III.5. Efecto de la deoxicitidina en la reversión del efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA.	128
III.6. Efecto de la CPZ sobre el transporte de (³ H)dCyd.	130

III.7. Efecto de la CPZ sobre la síntesis de DNA en diferentes sistemas.	130
IV. <u>Ro1 del Ptd-dCMP como intermediario en la biosíntesis de fosfatidil-inositol.</u>	134
IV.1. Liberación de (³ H)dCMP dependiente de inositol.	137
IV.2. Síntesis de Ptd-Ins a partir de Ptd-dCMP en microsomas de Sarcoma 180.	141
IV.2.1. Obtención de Ptd-dCMP purificado.	141
IV.2.2. Incubación de microsomas con (³ H)Ins en presencia de Ptd-dCMP.	144
IV.3. Cuantificación de la cantidad de Ptd-dCMP y Ptd-CMP en células de Sarcoma 180.	147
IV.4. Ro1 del inositol en la falta de detección de Ptd-dCMP en células intactas.	147
IV.5. Efecto del quercetin sobre la biosíntesis de Ptd-dCMP. ...	153
IV.5.1. Efecto sobre células intactas.	154
IV.5.2. Efecto sobre la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins. ..	154
IV.5.3. Efecto del QRC sobre la síntesis de Ptd-CMP.	164
IV.6. Efecto del Ptd-Ins 4 P sobre la síntesis de Ptd-dCMP.	164
IV.7. Efecto del GTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP en HL-60. ...	169
IV.8. Discusión.	172
<u>ABREVIATURAS.</u>	185
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.</u>	188

INTRODUCCION

I. ROL DE LOS NUCLEOTIDOS DE CITIDINA EN LA BIOSINTESIS DE FOSFOGLICERIDOS

I.1. Fosfolípidos. Generalidades.

Los fosfolípidos constituyen una clase particular de lípidos que contienen fósforo en su estructura molecular, habitualmente en la forma de ortofosfato.

Dentro de la clasificación general de lípidos (del griego "lipos": grasa) los fosfolípidos forman parte de los lípidos complejos, todos los cuales contienen ácidos grasos como componentes de su estructura hidrocarbonada y son, por lo tanto, saponificables. Los otros miembros de este grupo son los acilglicéridos, esfingolípidos -usualmente glicolípidos- y las ceras.

Por otro lado, los lípidos simples o no saponificables incluyen a los terpenos y esteroides.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Strickland (1) los fosfolípidos pueden ser divididos en cinco sub-clases en base a sus constituyentes principales. Así, además de los fosfolípidos que contienen glicerol (fosfoglicéridos o glicerofosfátidos) y aquellos que contienen esfingosina (fosfoesfingolípidos), se incluyen también derivados de la dihidroxiacetona (fosfodiol lípidos), fosfolípidos que contienen fósforo en la forma de fosfonato (fosfonolípidos) y fosfolípidos que tienen el grupo fosfato esterificado a un azúcar de un glicolípidido (fosfoglicolípidos).

La característica común de todos los fosfolípidos es su naturaleza anfipática, con una región hidrofóbica formada por las colas no polares de los ácidos grasos o de la N-acilesfingosina y una región hidrofílica formada por las cabezas polares esterificadas al grupo fosfato (Figura I).

Cuando estos compuestos se encuentran en un ambiente acuoso tienden a agregarse de tal manera de exponer las regiones hidrofílicas al agua y ocultar sus colas hidrofóbicas. En la Figura I se observa que esto lo pueden lograr formando micelas esféricas o bien formando una bicapa fosfolipídica que se vesiculiza espontáneamente para minimizar la interacción de las colas hidrofóbicas de los extremos con el agua.

Las membranas biológicas están constituidas en un 50% de su peso por lípidos anfipáticos de los cuales los fosfolípidos son los más abundantes y están dispuestos formando una bicapa; luego le siguen el colesterol y los gli-

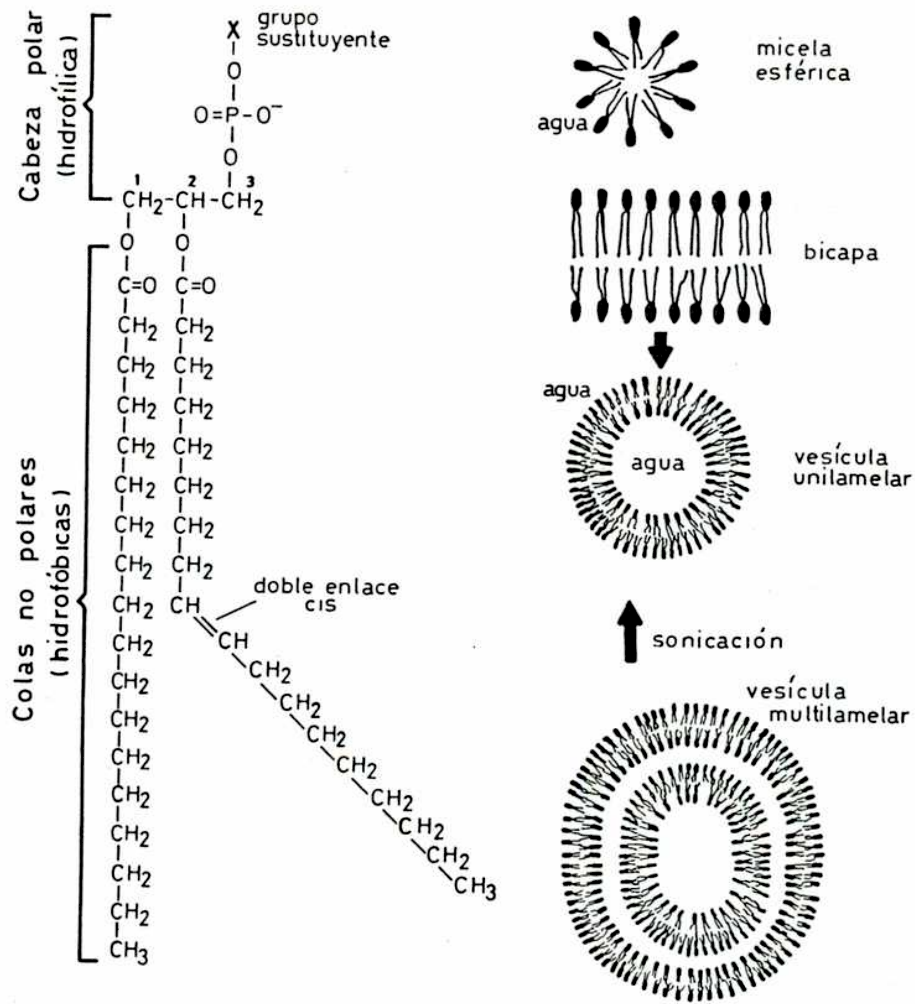


Figura I: Estructura de un fosfoglicérido y representación simplificada de la organización de estas moléculas en un ambiente acuoso.

colípidos. Cabe señalar que las membranas bacterianas carecen de colesterol y, a diferencia de los organismos superiores, contienen mayoritariamente un sólo tipo de fosfolípido. Así, la membrana de *Escherichia coli* contiene un 70% de fosfatidil-etanolamina.

La presencia de distintos tipos de fosfolípidos en membranas eucarióticas sugiere que no cumplen solamente una función estructural.

I.2. Fosfoglicéridos. Estructura molecular y características generales.

Los fosfoglicéridos son los principales componentes de las membranas celulares y lipoproteínas del plasma.

De acuerdo con la recomendación de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica (IUPAC) los fosfoglicéridos se definen como derivados sn-glicerol-3-fosfato (sn-glicero-3-P) que contienen al menos un resto O-acil, O-alkil o O-alkil-1'-enil unido a la molécula de glicerol (2,3).

En estos compuestos uno de los grupos hidroxilo primarios del glicerol se halla esterificado por el ácido fosfórico; los demás grupos hidroxilo pueden estarlo por ácidos grasos (O-acil), o bien por un resto de hidrocarburo (saturado o no) unido en forma de éter.

El compuesto originario de la serie es, por lo tanto, el éster fosfórico del glicerol. Por tener un carbono asimétrico, este compuesto puede denominarse D-glicerol-1-fosfato o bien L-glicerol-3-fosfato. Debido a que las reacciones biológicas son estereoespecíficas, se ha adoptado la numeración estereoespecífica para los derivados del glicerol (se abrevia con el prefijo sn-stereospecific numbering) (4). Esta numeración exige que en la proyección de la fórmula del glicerol-fosfato el hidroxilo en el C-2 asimétrico quede representado a la izquierda y los carbonos superior e inferior se numeren como C-1 y C-3 respectivamente.

El isómero del glicerol-fosfato presente en los fosfoglicéridos naturales se denomina sn-glicero-3-P y pertenece a la serie estereoquímica L.

Consideraremos en detalle los fosfoglicéridos que poseen dos ácidos grasos esterificados a los hidroxilos C-1 y C-2, denominados R_1 y R_2 .

Generalmente R_1 y R_2 son distintos y, por lo menos uno de ellos es no saturado. La configuración del doble enlace es generalmente cis; en los ácidos grasos monoenoicos se halla ubicado entre los átomos de carbono 9 y 10 (ác.

palmitoleico y oleico) mientras que en los polienuicos generalmente se conserva dicho doble enlace y se le agregan otros hacia el extremo metilo-terminal de la cadena (ác. linoleico, linolénico y araquidónico).

Dada la diversidad de grupos R_1 y R_2 , cada representante de este grupo constituye una familia de compuestos.

La presencia de ácidos grasos insaturados le otorga a la molécula de fosfoglicérido una mayor flexibilidad y, dado que se empaquetan menos en una bicapa lipídica, contribuyen a aumentar la fluidez de las membranas (5).

El compuesto más sencillo de los fosfoglicéridos es el ácido fosfatídico (Ptd-A). Este ácido se encuentra libre en las células en cantidades muy bajas (1-5% de los fosfolípidos totales), pero es un intermediario metabólico muy importante en la biosíntesis de fosfoglicéridos. Los fosfoglicéridos más abundantes en plantas superiores y animales son la fosfatidil-etanolamina (Ptd-EA) y fosfatidil-colina (Ptd-Col) que contienen los aminoalcoholes etanolamina y colina respectivamente. En la Figura II se encuentran las fórmulas químicas de los principales sustituyentes presentes en las cabezas polares de los fosfoglicéridos.

La Ptd-EA y Ptd-Col poseen un grupo amino ionizable ($pK'=10$ para la etanolamina y $pK'=13$ para la colina), con un punto isoelectrónico alrededor de $pH=6,7$, por lo cual se consideran compuestos neutros en condiciones fisiológicas.

Otro fosfolípido nitrogenado es la fosfatidil-serina (Ptd-Ser), donde el grupo hidroxilo del aminoácido L-serina está esterificado por el ácido fosfórico. Por tener un grupo ácido extra este fosfoglicérido es ácido a $pH=7$. La Ptd-Ser está ampliamente distribuida en la naturaleza aunque en concentraciones menores al 10% del contenido celular total de fosfolípidos. La mielina del sistema nervioso contiene cantidades mayores, las plantas tienen poca cantidad y en bacterias sólo se detectan trazas.

Los fosfolípidos no nitrogenados revisten carácter ácido por tener sólo restos cargados de ácido fosfórico. El más complejo de todos es el difosfatidil-glicerol (DPG) o cardiolipina, con dos restos fosfatidil unidos a una molécula de glicerol. Se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias donde alcanza el 20% del contenido de fosfolípidos de la organela y contribuiría a mantener una inusual impermeabilidad a iones (6). Se encuentra

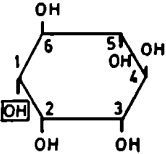
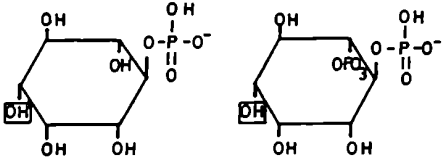
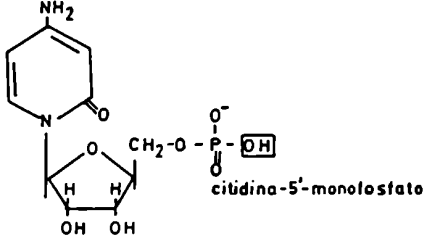
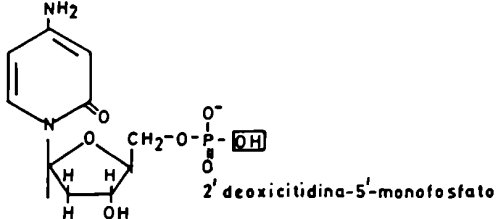
Grupo sustituyente	Fosfoglicérido
H	ácido fosfatídico
$\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\boxed{\text{OH}}$ etanolamina	fosfatidil-etanolamina
$(\text{CH}_3)_3\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\boxed{\text{OH}}$ colina	fosfatidil-colina
$\text{NH}_3\text{-CH}(\text{COO}^-)\text{-CH}_2\text{-}\boxed{\text{OH}}$ serina	fosfatidil-serina
$\text{HO-CH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{-}\boxed{\text{OH}}$ glicerol	fosfatidil-glicerol
$\text{CH}_2\text{-C}(\text{OH})\text{-CH}_2$ $\boxed{\text{OH}} \quad \text{H} \quad \boxed{\text{OH}}$ glicerol	di fosfatidil-glicerol
 mio-inositol	fosfatidil-inositol
	fosfatidil-inositol-4-fosfato y fosfatidil-inositol-(4,5)-bis fosfato
 citidina-5'-monofosfato	
 2' deoxicitidina-5'-monofosfato	fosfatidil - dCMP

Figura II: Grupos sustituyentes de la cabeza polar de los fosfoglicéridos.

El grupo OH recuadrado se halla esterificado al grupo fosfato del ácido fosfatídico.

también en los cloroplastos vegetales y en las membranas bacterianas. Su nombre proviene de haber sido aislado por primera vez de corazón, material muy rico en mitocondrias.

El fosfatidil-glicerol (Ptd-Gli), con una molécula de glicerol esterificada al ácido fosfórico del Ptd-A y su derivado el 3'-O-lisil-fosfatidil-glicerol se encuentran también frecuentemente en bacterias.

Otro grupo importante de fosfoglicéridos ácidos es el de los fosfoinosítidos. El compuesto parental de la serie es el fosfatidil-inositol (Ptd-Ins) que posee una molécula de mio-inositol (1,2,3,5 cis-4,6 trans-ciclohexano-hexadiol) esterificada, a través de su hidroxilo 1, al resto fosfatidil.

En condiciones apropiadas, la hidrólisis ácida de este compuesto libera inositol-fosfato y diglicérido. En los laboratorios de Ballow y Brown se estableció que las preparaciones de semilla de soja, hígado y cerebro contenían el isómero D-mio-inositol-1-fosfato (7). Dicha configuración fue posteriormente corroborada por otros laboratorios (8). Por lo tanto, el nombre completo del Ptd-Ins es 1'-(3sn-fosfatidil)-D-mio-inositol.

El Ptd-Ins es el más abundante de los fosfoinosítidos y está ampliamente distribuido en la naturaleza en cantidades que oscilan entre el 2 y 12% de los fosfolípidos totales. Está presente en tejidos animales, vegetales, algunas bacterias y hongos (7,9-13).

Los derivados fosforilados del Ptd-Ins constituyen los polifosfoinosítidos. De ellos, el Ptd-Ins-4P posee un grupo fosfato esterificado al hidroxilo 4 del mio-inositol y el Ptd-Ins (4,5)P₂ posee dos grupos fosfato en las posiciones 4 y 5 respectivamente.

Si bien los polifosfoinosítidos fueron descubiertos inicialmente en cerebro (14), posiblemente existan trazas en todas las células eucarióticas, aunque en tejido nervioso y médula adrenal la cantidad es mayor (15). El hecho que estos tejidos, ricos en membranas plasmáticas posean cantidades mensurables de estos compuestos sugiere que están concentrados en dicha fracción subcelular (16).

La dificultad de cuantificar los polifosfoinosítidos se debe a que se hidrolizan rápidamente, es difícil realizar su extracción cuantitativa y están presentes en muy poca cantidad en la mayoría de los tejidos.

Un rasgo común de todos los fosfoinosítidos, que los distingue del resto de los fosfoglicéridos, es que tienen una distribución particular y constante de ácidos grasos: R_1 es generalmente ácido esteárico (C_{18}) y R_2 es ácido araquidónico ($C_{20:14}$) (17). Esta distribución no ha sido encontrada en los fosfoinosítidos de plantas.

Finalmente, el último fosfoglicérido que vamos a condiderar (en la clasificación propuesta por Strickland existen más de 20) es el fosfatidil-CMP (Ptd-CMP). Este liponucleótido posee un grupo citidílico (citidina-5'-fosfato) esterificado al grupo fosfato del ácido fosfatídico (Figura 2). Se lo conoce habitualmente con el nombre de CDP-diglicérido pero de acuerdo con Hauser y Eichberg es más correcto designarlo como Ptd-CMP ya que refleja mejor su rol como dador de grupos fosfatidil (18).

Si bien su existencia como intermediario en la biosíntesis de fosfoglicéridos fue sugerida desde 1958, su aislamiento y caracterización fue posible recién en 1973, cuando Raetz y Kennedy incubaron células de *E. coli* con (3H)citosina y sn-glicerol-3-(^{32}P)fosfato y examinaron la composición de un extracto orgánico purificado por columnas de DEAE-celulosa (19). En dichos experimentos los autores describieron la presencia de cantidades equimoleculares de Ptd-CMP y Ptd-dCMP (fosfatidil-dCMP), siendo la concentración de ambos 20 veces menor a la del Ptd-A, que en bacterias corresponde al 1% del contenido total de fosfolípidos.

Posteriormente, el Ptd-CMP fue extraído de células animales. Hauser y Eichberg en 1975, utilizando precursores radioactivos, hallaron formación de Ptd-CMP en glándula pineal (18) y Thompson y MacDonal mediante el uso de procedimientos de extracción en gran escala, aislaron dicho compuesto a partir de cerebro e hígado bovino (20). Estos autores proponen que la concentración in vivo del Ptd-CMP es súmamente baja, representando 1-5% de la concentración de Ptd-A. Existen evidencias que indican que está presente también en plantas (9) y hongos (21).

Con respecto al Ptd-dCMP, ha sido localizado en mitocondrias de hígado de rata por Ter Schegget y col. (22), en núcleos de neuronas de conejo (23) y en linfocitos humanos por Mordoh y col., constituyendo ésta la primer evidencia de su existencia en células eucarióticas intactas (24-27).

I.3. Biosíntesis de fosfoglicéridos.

Los principales fosfoglicéridos se sintetizan a partir de Ptd-A por dos rutas diferentes, una de las cuales es la que prevalece en animales y plantas superiores y la otra tiene lugar en algunas bacterias y hongos. En ambas rutas los nucleótidos de citidina se utilizan como portadores, tanto de los grupos -OH de las cabezas polares como del grupo fosfatidil.

El rol central de los nucleótidos de citidina en la biosíntesis de fosfolípidos fue descubierta por E.P. Kennedy (28) por lo que se la conoce también como "Vía de Kennedy" o de los CDP-intermediarios.

Veremos ahora las principales rutas de síntesis de fosfoglicéridos en uno y otro grupo, señalando los rasgos sobresalientes en cada caso.

I.3.1. Biosíntesis de fosfoglicéridos en E. coli

En las bacterias Gram negativas (como *Escherichia coli*) los fosfoglicéridos que forman parte de la envoltura celular son tres: Ptd-EA (75-85%), Ptd-Gli (10-20%) y cardiolipina (DPG) (5-15%). En general, la mayoría de las bacterias Gram negativas no contienen Ptd-Col, Ptd-Ins, esfingolípidos, glicolípidos, plasmalógenos o esteroides, que son característicos de los sistemas eucarióticos (29).

En la Figura III se muestran las principales reacciones que conducen a la síntesis de Ptd-EA, Ptd-Gli y DPG en *E. coli* (30).

Comenzando con la acilación del sn-glicero-3-P, todas las reacciones de la síntesis de fosfolípidos ocurren en la membrana citoplasmática de la bacteria. Esta conclusión está basada en la observación que los intermediarios claves como el Ptd-A, Ptd-CMP y Ptd-Ser están unidos a membrana y que las enzimas biosintéticas se recuperan en la fracción de membrana interna de los extractos celulares (31-33).

En el paso inicial, el sn-glicero-3-P es acilado en la posición 1 con un ácido graso saturado, unido a través de una unión tioéster a una proteína aceptora "ACP" ("acyl carrier protein"). En las cepas salvajes se acumula muy poco ácido lisofosfatídico, ya que es rápidamente acilado con un ácido graso no saturado para formar Ptd-A. Al igual que los otros intermediarios de ésta

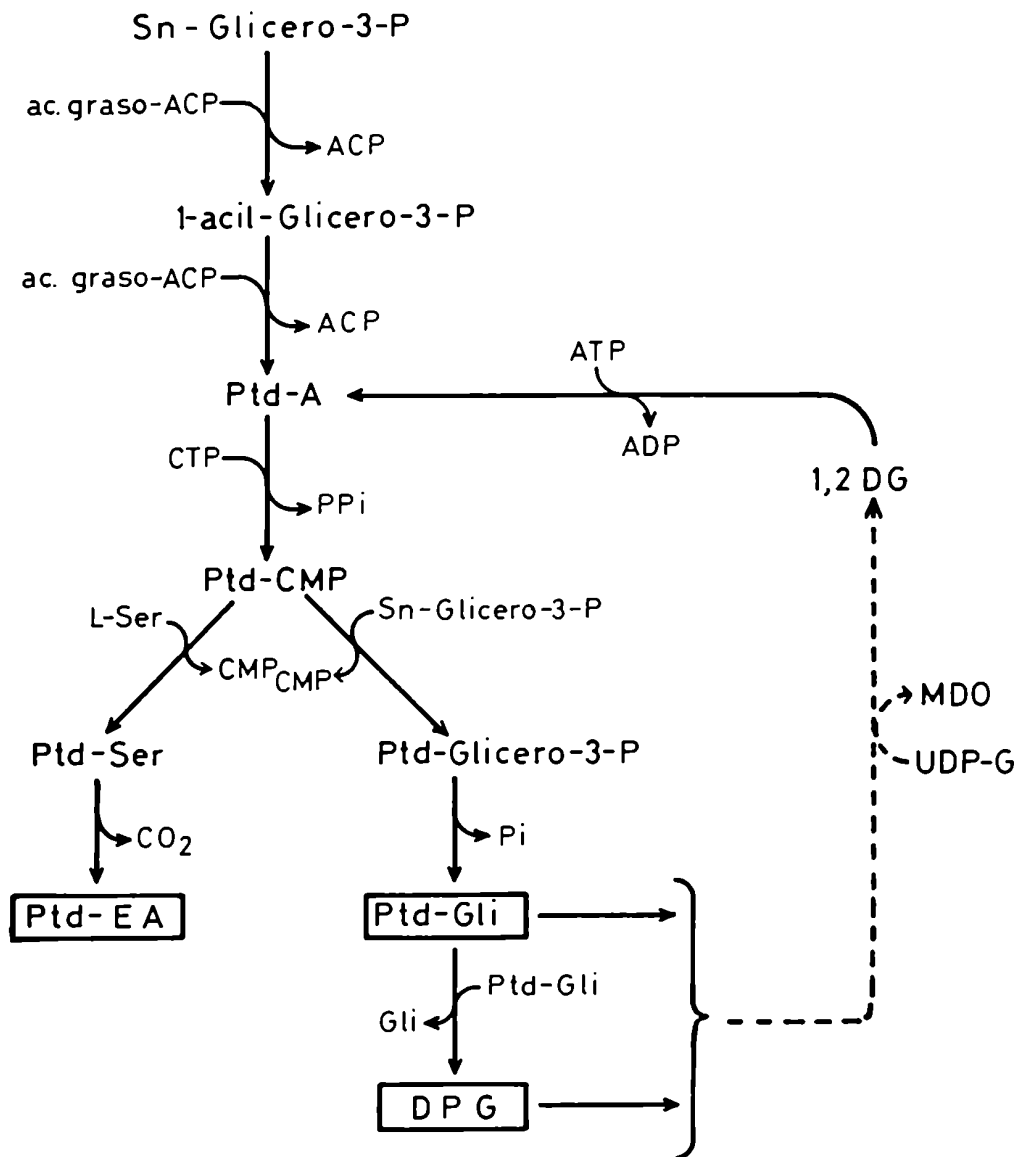


Figura III: Biosíntesis de fosfoglicéridos en *E. coli*.

Las líneas punteadas indican que la reacción ha sido inferida de estudios genéticos (ref. 30).

ruta metabólica, el Ptd-A tiene un alto número de recambio ("turnover") y constituye no más del 1% de los lípidos totales. La acilación del sn-glicero-3-P es, probablemente, la etapa de regulación de la composición de los ácidos grasos de los fosfoglicéridos de E. coli.

En una segunda etapa, el Ptd-A es convertido a Ptd-CMP y Ptd-dCMP. Ambos liponucleótidos están presentes in vivo y se recambian con una vida media del orden de segundos (19,34). Existen algunas evidencias que sugieren que la formación de Ptd-CMP y Ptd-dCMP es la etapa limitante de toda la ruta. Sin embargo la función específica de cada uno se desconoce. Se ha purificado parcialmente un liponucleótido-sintetasa que utiliza tanto CTP como dCTP (35). Por otra parte, ambos liponucleótidos son sustratos para las fosfatidil-transferasas de E. coli (19).

El aislamiento de mutantes parcial y totalmente defectivas en CTP:fosfatidato-citidililtransferasa permitió demostrar que el 90% de los fosfolípidos de E. coli se sintetiza a partir de estos liponucleótidos. En las mutantes parcialmente defectivas, que acumulan Ptd-A, si bien la síntesis de Ptd-CMP y Ptd-dCMP está muy disminuída, la síntesis residual permite que el resto de los fosfolípidos se sintetice normalmente (36). Las mutantes totalmente defectivas son letales condicionales: a pH mayor de 8 la acumulación de Ptd-A sube a un 30% de los lípidos totales y la síntesis de novo de Ptd-EA y Ptd-Gli disminuye abruptamente, muriendo al cabo al cabo de 60 min de incubación a pH=8,5 (37). Los autores postulan que la citidilil-transferasa normalmente regularía el pH intracelular en E. coli y que en estas mutantes la proteína alterada estaría inhabilitada para cumplir tal función.

Como se aprecia en la Figura III, el Ptd-CMP (y Ptd-dCMP) está localizado en un punto de divergencia biosintética: puede donar su grupo fosfatidil ya sea al grupo -OH de la L-Ser o al -OH de la posición 1 del sn-glicero-3-P. A pesar de que ambas fosfatidil-transferasas pueden funcionar en los dos sentidos, el equilibrio está ampliamente desplazado en la dirección de los productos fosfodiéster (38,39).

Tal como ocurre con los otros intermediarios de esta ruta, en condiciones normales la Ptd-Ser y el Ptd-Gli-P no se acumulan. La primera es decarboxilada para formar Ptd-EA mientras que el segundo es defosforilado, dando Ptd-Gli, siendo estas reacciones irreversibles. La Ptd-EA es

generalmente un producto final estable mientras que el Ptd-Gli se convierte en cardiolipina por una reacción que, a diferencia con eucariontes, no requiere liponucleótido (40).

Aproximadamente un tercio del pool total de Ptd-Gli se recambia en una generación; la cardiolipina recambia aproximadamente a la misma velocidad. El turnover de los poliglicerofosfátidos puede ser inhibido casi completamente sin ningún efecto adverso sobre el crecimiento o la división celular (41).

En 1973, Van Golde y col. (42) descubrieron una familia de oligosacáridos los cuales tenían unido covalentemente sn-glicero-1-P, ácido succínico y fosforil-etanolamina (43). Este material, llamado "MDO" ("membrane derived oligosaccharides") constituye el 0,5-1% del peso seco de *E. coli* y está localizado en el espacio periplásmico (41,42). Los estudios de marcación radioisotópica así como su inusual estereoquímica sugieren que el grupo sn-glicero-1-P deriva de las cabezas polares de los poliglicerofosfátidos, especialmente el Ptd-Gli (42). La formación de MDO puede dar cuenta del 75% del "turnover" de poliglicerofosfátidos que ocurre en las cepas salvajes, ya que mutantes incapaces de sintetizar MDO muestran una dramática reducción en la velocidad de recambio de estos compuestos (43).

Como consecuencia de la transferencia de la porción glicerol-1-P del Ptd-Gli al MDO, se generaría sn-1,2 diacilglicérido (1,2DG) como subproducto. En las cepas salvajes, este compuesto es convertido nuevamente a Ptd-A por acción de una diglicérido quinasa (44). A pesar de que este "ciclo del diglicérido" es una ruta menor en la biosíntesis de Ptd-A, mutantes que carecen de la quinasa acumulan cantidades sustanciales de 1,2DG in vivo (44).

I.3.2. Biosíntesis de fosfoglicéridos en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los eucariontes inferiores como la levadura *S. cerevisiae*, tienen un metabolismo de fosfoglicéridos similar a las bacterias, a pesar de que poseen una mayor diversidad de fosfolípidos (Ptd-Col, Ptd-Ins, Ptd-Ser, fosfoesfingolípidos, etc.). La similitud reside en que todos estos compuestos se sintetizan a partir del Ptd-CMP (21,45).

En estas células, la privación de inositol conduce, entre otras cosas, a la muerte celular (46), y utilizando mutantes auxótrofas para este polialcohol se determinó que en ausencia de inositol se acumulan fundamentalmente

Ptd-A y Ptd-CMP (45).

A diferencia las de bacterias, en estos organismos no se sintetiza Ptd-dCMP (47). Más aún, ha sido aislada y purificada una CTP:fosfatidato-citi dililtransferasa de mitocondrias de *S. cerevisiae* que posee una especificidad absoluta para el CTP, siendo el dCTP un inhibidor no competitivo de la misma (48).

1.3.3. Biosíntesis de fosfoglicéridos en células eucarióticas.

En la Figura IV se han esquematizado las vías biosintéticas de los principales glicerolípidos en células eucarióticas (fosfoglicéridos y acilglicéridos) con las enzimas intervinientes en cada paso. Trataremos en detalle sólo algunas de ellas, que hacen a la introducción del trabajo realizado.

Si bien estas rutas se conocen desde hace más de veinte años, son pocas las enzimas involucradas que han sido purificadas a homogeneidad. La dificultad reside en su estrecha asociación a membranas, generalmente del retículo endoplasmático y mitocondriales, lo que dificulta su solubilización, en la labilidad de las enzimas solubilizadas y en la dependencia, en algunos casos, de fosfolípidos para su actividad.

En líneas generales, tres hechos distinguen la biosíntesis de fosfoglicéridos en células eucarióticas con respecto a los organismos inferiores:

- 1°) La acilación del sn-glicero-3-P ocurre con ácidos grasos esterificados a la coenzima A (CoA).
- 2°) A diferencia de bacterias y levaduras, en células eucarióticas el Ptd-CMP es precursor solamente de los fosfoglicéridos ácidos, mientras que los fosfoglicéridos neutros se sintetizan por transferencia de los precursores activados con CDP al 1,2 DG (Figura IV).
- 3°) La síntesis de cardiolipina (DPG) utiliza Ptd-CMP como dador del segundo resto fosfatidil de la molécula de DPG.

I.3.3.1. Biosíntesis de ácido fosfatídico.

La biosíntesis del Ptd-A ocurre a través de la acilación secuencial del sn-glicero-3-P por tioésteres de la CoA conteniendo una cadena de ácido graso. La enzima sn-glicero-3-P-aciltransferasa (en la figura IV, reacción 2*) se encuentra en las fracciones microsomal y mitocondrial de células animales (49) y en la cubierta de los cloroplastos (50). Ha sido parcialmente purificada de microsomas y mitocondrias de hígado de rata y se determinó que difieren en su sensibilidad al calor, pH óptimo, Km para ambos sustratos y especificidad para el acil-CoA (la enzima mitocondrial tiene más afinidad por los derivados con ácidos grasos saturados) (51,52). Se ha sugerido que la preferencia de la enzima mitocondrial hepática por los tioésteres de acil-CoA saturados podría regular la composición de ácidos grasos de los glicerolípidos celulares. En ese sentido, se ha encontrado que los fosfolípidos de células tumorales, que contienen poca o nula actividad de glicero-3-P-aciltransferasa mitocondrial, tienen una proporción inusualmente alta de ácidos grasos no saturados en la posición sn-1 (53).

La acilación del liso-Ptd-A en la posición sn-2 ocurre en la cara citoplasmática de las vesículas microsomales (54). La enzima liso-Ptd-A-aciltransferasa (5*) ha sido purificada de microsomas de hígado de rata (55) y tiene mayor afinidad por las especies no saturadas de acil-CoA.

La síntesis de Ptd-A a partir de la acilación de la dihidroxiacetona-P y su consecuente reducción a liso-Ptd-A provee una ruta alternativa para la síntesis de este fosfoglicérido (49,56,57).

La enzima 1,2DG quinasa (7*), que convierte el 1,2DG en Ptd-A está presente tanto en la fracción soluble como en membranas de diversos sistemas. Si bien ha sido detectada en microsomas de hígado de rata (58), en cerebro la actividad se encontró en fracciones enriquecidas en membrana plasmática (59). Fue detectada también en la membrana plásmatica de eritrocitos (60) y linfocitos (61). Como veremos más adelante, esta vía de síntesis de Ptd-A no se utiliza para la síntesis de novo de los fosfolípidos neutros y acil-glicéridos sino para la re-síntesis de Ptd-Ins.

1.3.3.2. Biosíntesis de 1,2 diacilglicerol y los fosfoglicéridos neutros.

La síntesis de 1,2DG ocurre por defosforilación del Ptd-A y está catalizada por la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa (6*). Esta enzima ha sido localizada (y en algunos casos purificada) en las fracciones microsomal, mitocondrial, lisosomal y citosólica de diversos tejidos (62-64). Kent y Vagelos informaron que la enzima de células musculares en cultivo estaba localizada exclusivamente en la membrana plasmática (65), localización también encontrada en otros sistemas (66).

La enzima soluble estaría primariamente involucrada en la síntesis de novo de la mayoría de los glicerolípidos (Ptd-Col, Ptd-EA, TG), mientras que la enzima mitocondrial contribuiría a la síntesis de cardiolipina (67).

Se ha propuesto que la fosfatídico-fosfohidrolasa cataliza el paso limitante de la síntesis de glicerolípidos en hígado de rata por varias razones: i) Su actividad in vitro es la más baja de todas las enzimas de esta ruta; ii) la actividad de la enzima soluble varía directamente con la dieta o la inducción hormonal y iii) su actividad disminuye con algunas drogas que inhiben la síntesis de lípidos neutros (68,69).

En células eucarióticas el 1,2DG es utilizado para la síntesis de Ptd-EA y Ptd-Col, los fosfolípidos más abundantes de las membranas celulares. Ambos aminoalcoholes deben ser primero activados a CDP-colina y CDP-etanolamina donde intervienen colina y etanolamina quinasas (9* y 12*) y colina-P y etanolamina-P-citidiltransferasas (10* y 13*). Estas cuatro enzimas son solubles y se piensa que las transferasas constituirían las etapas regulatorias de la síntesis de ambos fosfolípidos (69).

En una segunda etapa se produce la transferencia de los aminoalcoholes activados al 1,2DG. Esta reacción está catalizada por dos enzimas microsomales diferentes (11* y 14*).

Existe una ruta alternativa para la síntesis de Ptd-Col por metilación de la Ptd-EA, que también da lugar a la Ptd-Ser.

I.3.3.3. Biosíntesis de Ptd-CMP y los fosfoglicéridos ácidos.

La enzima CTP:fosfatidato-citidililtransferasa (18*) cataliza la síntesis de Ptd-CMP a partir de Ptd-A y CTP y requiere Mg^{2+} para su actividad. Esta reacción gobierna la entrada de Ptd-A hacia la síntesis de los fosfolípidos ácidos: Ptd-Ins, Ptd-Gli y cardiolipina (70-72). Ha sido localizada en microsomas y mitocondrias de diverso origen animal y vegetal (62,73-75) y también se detectó esta actividad en núcleos de neuronas aunque asociada a la membrana externa, lo que sugiere que proviene del RE (24). En menor cantidad también se encuentra en la membrana plasmática de hígado de rata (62).

Las enzimas mitocondrial y microsomal difieren en cuanto a su sensibilidad a detergentes. La enzima microsomal se inactiva en presencia de detergentes del tipo del Tritón X-100, mientras que la mitocondrial no se ve afectada (76). Por otra parte se ha demostrado que algunas formas bacterianas de esta enzima requieren para su actividad la presencia de detergentes no iónicos (77). Es posible entonces, que la síntesis de Ptd-CMP mitocondrial sea efectuada por una enzima de tipo procariótico, distinta de la enzima del RE.

Se ha estudiado la influencia de fosfatidato exógeno y unido a membranas (generado en este caso por la acción de fosfolipasa D) y se determinó que la enzima tiene mayor afinidad por el segundo y que in vivo opera muy por debajo de su capacidad máxima (78). Experimentos realizados in vitro mostraron que la enzima no tiene especificidad por distintas especies de Ptd-A (72). Sin embargo en hígado de rata y en cerebro bovino se encontró que las principales especies de Ptd-CMP eran de tipo 1-estearoil-2-araquidonil-glicerol (20,79). Esta composición no se encontraba especialmente en las especies de Ptd-A pero era muy similar a las especies predominantes de Ptd-Ins. Si bien fue sugerido que la CTP:fosfatidato-citidililtransferasa seleccionaría especies de Ptd-A ricas en dicha composición (80), posteriormente se encontró en microsomas de hígado de rata una enzima que cataliza la adición de una molécula de ácido graso a la especie liso-Ptd-CMP (CDP-monoacilglicerol) (reacción 23*). Esta enzima tiene preferencia por araquidonil-CoA, con lo que sugeriría que las especies 1-estearoil-2-araquidonil se formarían por deacilación y reacilación (81). Thompson y MacDonald purificaron casi a homogeneidad esta enzima (araquidonil-CoA-CDP-monoacilglicerol-aciltransferasa) y verifi-

caron su marcada especificidad por el dador araquidonil-CoA y el receptor liso-Ptd-CMP (82). Estos hallazgos permiten establecer una nueva vía de síntesis para estas especies de Ptd-CMP.

A diferencia de bacterias, la detección de Ptd-dCMP en células eucarióticas ha sido generalmente infructuosa (18,20,79). Sin embargo, tanto en mitocondrias de hígado de rata (22) como en neuronas de cerebro de conejo (23) se encontró síntesis de Ptd-dCMP, determinada mediante la incorporación de (³H)dCTP al liponucleótido. En la sección III de esta Introducción se presentarán las evidencias obtenidas en linfocitos humanos estimulados con fitohe-maglutinina (PHA) que demuestran que estas células sintetizan Ptd-dCMP.

Como hemos visto anteriormente, en células eucarióticas el Ptd-CMP se utiliza para la síntesis de Ptd-Gli, cardiolipina y Ptd-Ins (70-72). La síntesis de los dos primeros se realiza fundamentalmente en las mitocondrias (83,84). La Ptd-Gli-P-sintetasa es una enzima integral de la membrana interna de la mitocondria, al igual que la enzima que sintetiza la cardiolipina. Davidson y Stanacev demostraron que este último compuesto se sintetiza a partir de Ptd-Gli y Ptd-CMP (85), lo que constituye una diferencia con la biosíntesis de cardiolipina en bacterias.

La síntesis de Ptd-Ins ocurre fundamentalmente en membranas del RE y está catalizada por la enzima Ptd-CMP:inositol-fosfatidiltransferasa (19*) (10,62,74,86), que ha sido solubilizada de microsomas de cerebro (87) e hígado de rata (88). La enzima de hígado depende fuertemente para su actividad del agregado de fosfolípidos exógenos y se resuelve completamente de otra enzima que cataliza la transferencia de mio-inositol a Ptd-Ins por una reacción de intercambio, independiente de Ptd-CMP (86,88,89). Ambas enzimas tienen distinto pH óptimo y requerimientos iónicos y sólo la primera (19*) participa en la síntesis de novo de Ptd-Ins (89).

Los polifosfoinosítidos Ptd-Ins-4P y Ptd-Ins (4,5)P₂ se sintetizan por fosforilación secuencial del Ptd-Ins. La Ptd-Ins-quinasa (24*) es una enzima Mg²⁺-dependiente que cataliza la formación de Ptd-Ins-4P a partir de Ptd-Ins y ATP (90,91). Se localiza fundamentalmente en la membrana plasmática (92,93) y membranas asociadas como la de los gránulos cromafines de la médula adrenal (94).

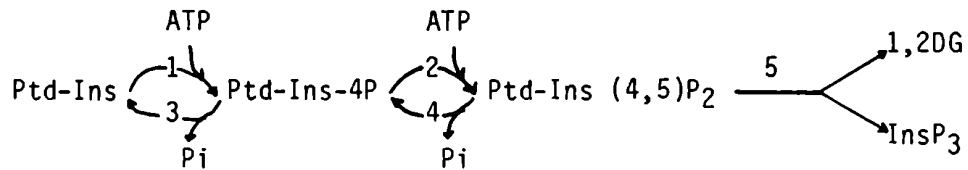
Una segunda quinasa, Ptd-Ins-4P-quinasa (25*), también dependiente de

Mg^{2+} , cataliza la síntesis de Ptd-Ins (4,5) P_2 , usando como dador del grupo fosfato al ATP (95).

En los glóbulos rojos ambas quinasas están localizadas en la membrana plasmática y son activas solamente del lado citoplasmático (96). En el tejido cerebral, sin embargo, la Ptd-Ins-4P-quinasa es una enzima soluble (95).

I.3.3.3.1. Degradación de polifosfoinosítidos.

Como se mencionó anteriormente, los polifosfoinosítidos son muy lábiles lo que dificulta en gran medida su extracción y cuantificación. Existen en las células fosfomonoesterasas que actúan en sentido inverso a las quinasas que fosforilan Ptd-Ins (97,98) por lo cual estos compuestos se hallan en un equilibrio continuo de síntesis y degradación:



Estas quinasas (1,2) y fosfomonoesterasas (3,4) constituyen dos "ciclos fútiles de función desconocida", a través de los cuales los grupos fosfato de las posiciones 4 y 5 del inositol son constantemente agregados y removidos. Esto representa un gasto metabólico muy importante. Como veremos más adelante, la ocupación de determinados receptores por su correspondiente agonista saca al Ptd-Ins(4,5) P_2 del ciclo, activándose una fosfodiesterasa (fosfolipasa C, 5) que lo cliva a D-mio-inositol-1,4,5-trifosfato ($InsP_3$) y sn-1,2DG (99). Como veremos, estos compuestos pueden funcionar como mensajeros intracelulares siendo degradados rápidamente y utilizados para la re-síntesis de Ptd-Ins.

Existen otras fosfodiesterasas capaces de hidrolizar Ptd-Ins y Ptd-Ins-4P; aún no se ha establecido claramente si se trata de distintas isoenzimas. Todas ellas son Ca^{2+} -dependientes y generalmente citosólicas (100), sin embargo en cerebro la actividad ha sido localizada en la membrana plasmática (101).

El metabolismo de fosfoinosítidos es sumamente complejo y es tema de profundos debates. La intención de esta sección es dar un panorama general

del mismo y señalar algunos conceptos.

Como hemos visto, la síntesis de Ptd-Ins ocurre fundamentalmente en el retículo endoplasmático, mientras que la de los polifosfoinosítidos ocurre casi exclusivamente en la membrana plasmática. Esto supone un movimiento de las moléculas de Ptd-Ins desde un sitio hacia el otro. Michell sugirió, en 1975, que esto se llevaría a cabo por proteínas transportadoras de Ptd-Ins (102), por analogía con lo que sucede con el transporte de otros fosfolípidos desde el RE a las mitocondrias y viceversa (103).

Por otra parte, si bien la membrana plasmática puede sintetizar Ptd-A a partir de 1,2DG, la distribución subcelular de la CTP:fosfatidato-citidililtransferasa sugiere que el Ptd-A debería ser similarmente movilizado desde la membrana plasmática al RE para completar la resíntesis de Ptd-Ins. Sin embargo, el transporte de ambos fosfolípidos a través de proteínas transportadoras que funcionen entre la membrana plasmática y el RE no ha sido aún convenientemente demostrado (100).

I.4. Control de la biosíntesis de fosfoglicéridos por drogas anfifílicas.

Los cationes anfifílicos, al interactuar con las membranas biológicas pueden modificar la dirección del metabolismo de glicerolípidos.

Las primeras observaciones datan de 1963 cuando se observó que la clorpromazina (CPZ), un derivado de las fenotiazinas, aumentaba la incorporación de (³²P) a Ptd-A y Ptd-Ins (104). Posteriormente se ha demostrado que otras fenotiazinas, así como antidepresivos de tipo imipramina, anestésicos locales, fenfloramina y sus derivados, morfina, levorfanol, propranolol y otros bloqueantes β -adrenérgicos promueven la síntesis de fosfolípidos ácidos en diversos tejidos (105,106).

Hauser y col. estudiaron el efecto del propranolol sobre la glándula pineal de rata y observaron que por efecto de esta droga se estimulaba la incorporación de (³²P) y (¹⁴C)glicerol a Ptd-A, Ptd-CMP, Ptd-Gli, DPG y Ptd-Ins, mientras que la incorporación de estos precursores a los fosfoglicéridos neutros estaba disminuída (18,106).

Estas observaciones permitieron postular que el mecanismo común de todos estos efectos sería la inhibición de la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa (FFH) que, como vimos, actúa en un punto de ramificación donde la síntesis de

glicerolípidos neutros diverge de los lípidos derivados del Ptd-CMP.

Este mecanismo fue confirmado con ensayos in vitro donde se demostró que muchos de estos compuestos inhiben la actividad de FFH (107,108). En la Figura IV se observa que, como resultado de dicha inhibición, el Ptd-A se utiliza fundamentalmente a través del Ptd-CMP para la síntesis de Ptd-Ins, Ptd-Gli y DPG.

Los cationes anfifílicos promueven la síntesis de novo de fosfolípidos acídicos ya que la mayoría de ellos estimula la incorporación de (^{14}C) o (^3H)glicerol a estos fosfoglicéridos (18,105,109). Esto representa una diferencia con el efecto que producen otros compuestos que, actuando a través de receptores apropiados, estimulan el "turnover" de fosfoinosítidos. En estos casos se observa un aumento en la incorporación de (^{32}P) a Ptd-A y Ptd-Ins sin disminución en la incorporación de marca en los fosfoglicéridos neutros y con poco cambio en la incorporación de glicerol radioactivo (105,108).

A pesar de que las drogas que re-dirigen la síntesis de novo de fosfoglicéridos tienen una variedad de efectos terapéuticos, fisicoquímicamente son muy similares ya que todas poseen una región hidrofóbica y un grupo amino primario o sustituido que lleva una carga neta positiva. Esta naturaleza anfifílica les permite interactuar con los fosfolípidos aniónicos de las membranas celulares.

Se ha demostrado en microsomas de hígado de rata que la inhibición de la FFH por la CPZ es competitiva con respecto al fosfatidato y resulta de la interacción de moléculas de fosfatidato cargadas negativamente con la droga catiónica. La neutralización del Ptd-A con CPZ impediría que el primero sea buen sustrato para la enzima (110).

Paralelamente a la inhibición de la FFH, la CPZ estimuló la actividad de la CTP:fosfatidato-citidililtransferasa. Aparentemente, el efecto sobre esta enzima reside en la capacidad de la CPZ de reemplazar a los iones Mg^{2+} , esenciales para su actividad. Este es un ejemplo de cooperatividad positiva entre drogas catiónicas y cationes bivalentes (110).

Existen ejemplos, sin embargo, donde estas drogas antagonizan los efectos de cationes bivalentes. Por ejemplo, la enzima que cliva el Ptd-Ins en linfocitos es activada por Ca^{2+} e inhibida por CPZ (111). Un resultado similar se obtuvo con propranolol en membranas de retina (112).

Brindley y col. han propuesto que la interacción de drogas anfifílicas catiónicas con el fosfatidato sea la causa que explique algunos efectos farmacológicos de estas drogas (113):

- 1) La inhibición de la FFH y el consiguiente descenso en la velocidad de síntesis de triacilglicéridos puede estar relacionada con las propiedades hipolipidémicas y adelgazantes de la fenfloramina y sus derivados.
- 2) La redirección del fosfatidato hacia la síntesis de fosfolípidos ácidos puede explicar la fosfolipidosis que frecuentemente se observa luego de tratamientos prolongados con altas dosis de muchas de estas drogas. Las mismas estimulan la síntesis de fosfolípidos aniónicos que son luego transportados junto con las drogas a los lisosomas. Allí, la presencia de la droga unida a los lípidos impediría la acción de fosfolipasas que normalmente degradan estos fosfolípidos. La fosfolipidosis se produciría entonces por dos motivos: 1°) una aumentada síntesis de novo de fosfolípidos ácidos y 2°) una deficiente degradación a nivel de los lisosomas (113).

Los cationes anfifílicos generalmente interfieren con fenómenos de membrana como movimiento, fusión, permeabilidad, transporte y función de receptores (114); en todos ellos el Ca^{2+} juega un rol importante y posiblemente varios de estos fenómenos estén mediados por la hidrólisis de fosfoinosítidos.

El efecto antagonista con el Ca^{2+} puede explicarse en parte por la interacción de estas drogas con la calmodulina, lo que modifica las propiedades de esta molécula (115).

Además de inhibir la hidrólisis de fosfoinosítidos en algunos tejidos (111,112), muchos de estos compuestos inhiben la actividad de una proteína-quinasa Ca^{2+} y fosfolípido dependiente (PK-C), que posiblemente esté involucrada en la transducción de mensajes extracelulares (116).

I.5. Metabolismo de los nucleótidos de citidina.

En las secciones precedentes se ha puesto el énfasis en el rol de los nucleótidos de citidina en la biosíntesis de fosfoglicéridos. En efecto, se ha visto que el CTP y el dCTP se utilizan en la síntesis de Ptd-CMP y Ptd-dCMP respectivamente, mientras que el CTP interviene también en la activación de

colina y etanolamina necesaria para la síntesis de Ptd-Col y Ptd-EA.

Los nucleótidos de citidina se utilizan también en la biosíntesis de los ácidos nucleicos. El CTP es uno de los sustratos de la síntesis del ácido ribonucleico (RNA) junto con la adenosina trifosfato (ATP), guanosina trifosfato (GTP) y uridina trifosfato (UTP), que en conjunto constituyen el pool de ribonucleósidos trifosfato (rNTPs) celular.

El dCTP interviene en la biosíntesis del ácido deoxiribonucleico (DNA), siendo los otros deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) que participan en dicha síntesis el dATP, dGTP y dTTP (timidina trifosfato).

Veremos ahora cómo se forman los pools celulares de CTP y dCTP. Existen dos vías de síntesis para cada nucleótido: i) la vía de rescate y ii) la vía de novo.

i) La vía de rescate es aquella que permite la re-utilización celular de los nucleósidos circulantes. En el caso de la deoxicitidina (dCyd) ésta es fosforilada intracelularmente por una quinasa específica: la dCyd quinasa, dando como producto el dCMP (deoxicitidina monofosfato) que es luego fosforilado por otras quinasas menos específicas (pirimidin-quinasas) para dar dCDP y dCTP. La citidina (Cyd) sigue un camino similar.

Ambos nucleósidos entran a la célula por un proceso de difusión facilitada, es decir mediada por un transportador o "carrier". Este sistema es saturable y no requiere energía metabólica para funcionar. Cuando el transportador se satura el nucleósido puede entrar por difusión pasiva.

Existen evidencias que indican que el transporte y el metabolismo de ambos nucleósidos son procesos separados. Por ejemplo, mutantes de células L1210 (células leucémicas murinas) que carecen de dCyd quinasa pueden transportar dCyd (117). Algo similar ocurre en glóbulos rojos humanos, que carecen de las quinasas de nucleósidos pirimidínicos y sin embargo se ha demostrado que los mismos penetran por difusión facilitada (118).

ii) La vía de novo es aquella por la cual el anillo pirimidínico se construye a partir de compuestos más simples. La vía comienza con la condensación de ácido aspártico y carbaminoíl fosfato y a través de sucesivas reacciones se sintetiza uridina monofosfato (UMP). Su producto fosforilado, UTP, es el sustrato para la síntesis de CTP, catalizada por la enzima CTP-sintetasa; la reacción es como sigue:



Las células eucarióticas utilizan glutamina como fuente de grupo amino y, dado que este aminoácido es inestable, los medios de cultivo son usualmente suplementados con este compuesto.

La síntesis de novo de los deoxinucleótidos ocurre por reducción de los ribonucleótidos difosfato y es catalizada por la enzima ribonucleótido-reductasa.

El sistema enzimático que interviene en la reducción de CDP a dCDP es similar en *E. coli* y células eucarióticas y es conocido como sistema de la tioredoxina. La tioredoxina es una proteína azufrada que en presencia de tioredoxina-reductasa y NADPH se reduce. La tioredoxina reducida es utilizada para reducir el hidroxilo de la posición 2 de la ribosa. La reacción es catalizada por la ribonucleótido-reductasa y como productos se obtienen dCDP y tioredoxina. El sistema completo requiere cuatro proteínas: tioredoxina, tioredoxina-reductasa, B1 y B2; estas últimas son dos subunidades de la ribonucleótido reductasa (119).

Con el uso de anticuerpos monoclonales y técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado que esta enzima es citoplasmática y se encuentra fundamentalmente en el retículo endoplasmático (120).

Las células poseen mayor cantidad de rNTPs que de dNTPs. Por ejemplo, el pool de CTP en células L1210 en crecimiento logarítmico es de 280 pmoles/ 1×10^6 células mientras que el pool de dCTP es de 62 pmoles/ 1×10^6 células (121).

Si bien la replicación del DNA requiere cantidades aproximadamente equimolares de los cuatro dNTPs, las células eucarióticas poseen distintas cantidades de los mismos. En general se ha observado que el más abundante es el dCTP y el que está en menor proporción es el dGTP (121-123). Peter Reichard ha estudiado el comportamiento de los pools de dNTPs en distintas líneas celulares en cultivo (122). Sus observaciones indican que 1°) las células que se dividen tienen mayor cantidad de dNTPs que las células en reposo y 2°) el pool que más aumenta en cultivos sincronizados es el de dCTP y su aumento se correlaciona con la síntesis de DNA. Esencialmente a las mismas conclusiones arribaron otros grupos (121,123).

Existen evidencias que indican que el pool de dCTP está

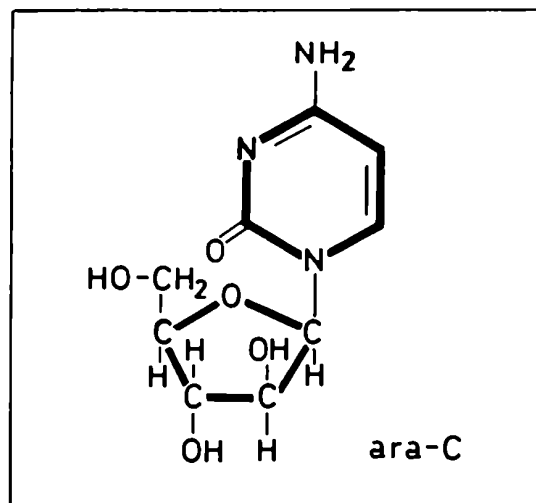
compartimentalizado; con respecto a los otros dNTPs los resultados son conflictivos (124). La compartimentalización del pool de dCTP queda evidenciada con el siguiente ejemplo: Nicander y Reichard incubaron fibroblastos de ratón con cantidades isotópicas de (^3H)timidina (dThd), (^3H)Cyd y (^3H)dCyd y observaron que la velocidad de síntesis de DNA era mayor cuando se utilizaba (^3H)dThd o (^3H)Cyd como precursor que cuando se utilizaba (^3H)dCyd. Si bien la actividad específica del pool de dCTP marcado con (^3H)Cyd o (^3H)dCyd no variaba mucho, la cantidad de (3)dCMP incorporado al DNA era mayor cuando se incubaba con (^3H)Cyd y era similar a la cantidad de (^3H)dTMP incorporada (125).

Estos resultados sugieren que existen dos pools de dCTP, uno de los cuales, el que proviene de la síntesis de novo por reducción del CDP, es el que se utilizaría para la síntesis de DNA. Por otra parte, en el mismo trabajo se concluyó que existiría un sólo pool de dTTP.

I.5.1. Metabolismo de la arabinosil-citosina.

La arabinosil-citosina o 1- β -D-arabinofuranosil-citosina (ara-C) es un análogo de la deoxicitidina que se utiliza como agente antineoplásico por su potente acción inhibitoria sobre la síntesis de DNA. Está bien establecida su utilidad en leucemias agudas, particularmente mieloides, sola o en combinación con otras drogas (126-127). En la Figura V se muestra su fórmula estructural.

Figura V



La arabinosa es un epímero de la ribosa que difiere en la posición del hidroxilo del carbono 2. Este hidroxilo, que está ausente en la dCyd, causa una obstrucción estérica que impide la rotación de la base pirimidínica alrededor de la unión nucleosídica. Como consecuencia, las bases de poliarabinonucleótidos no pueden apilarse correctamente.

Como la mayoría de los antimetabolitos purínicos y pirimidínicos, el ara-C debe ser activado intracelularmente para ejercer su acción antitumoral. Cuando entra a la célula, utilizando el transportador de la dCyd, el ara-C es fosforilado por la dCyd-quinasa para dar ara-CMP (128) que es luego fosforilado por otras quinasas para dar ara-CDP y ara-CTP. Este último es el metabolito activo que inhibe la síntesis de DNA (129).

Por su analogía con el dCTP, el ara-CTP inhibe competitivamente a las DNA polimerasas celulares (130), aunque la constante de afinidad para el inhibidor es muy similar a la K_m para el dCTP (131). La concentración intracelular de dCTP en células leucémicas en crecimiento logarítmico es del orden de $10^{-5}M$; cuando esas células se exponen a muy bajas concentraciones de ara-C, se produce una significativa inhibición de la síntesis de DNA a una concentración intracelular de ara-CTP del orden de $10^{-7}M$ (131). Estos resultados indican que la inhibición de la DNA polimerasa por ara-CTP no es el principal mecanismo por el cual este análogo inhibe la síntesis de DNA in vivo.

Se ha propuesto también que la inhibición de la síntesis de DNA se produce por intercalación del ara-CTP en el DNA (132) y en algunos casos este evento se ha correlacionado con la pérdida de la capacidad de crecimiento celular (133). Sin embargo todavía no hay acuerdo sobre si es esa la causa primaria que lleva a la muerte celular por ara-C.

Dado que la mayoría de las acciones del ara-C se relacionan estrechamente con la biosíntesis y función del DNA, se lo considera un agente específico que actúa en la fase S del ciclo celular (134).

I.5.1.1. Mecanismos de resistencia al ara-C.

Muchos tejidos normales, así como algunos tumores no susceptibles al ara-C tienen altas concentraciones de Cyd-dCyd-deaminasa, enzima capaz de convertir el ara-C a su metabolito no tóxico: arabinosil-uracilo (ara-U). La relación dCyd-quinasa/dCyd-deaminasa es un factor clave para determinar la

susceptibilidad de los tejidos al ara-C (135). Se ha identificado un potente y aparentemente irreversible inhibidor de la deaminasa: tetrahidouridina (136), compuesto que aumenta la vida media plasmática del ara-C. Sin embargo no se ha determinado si la inhibición de la deaminasa provoca un cambio favorable en el índice terapéutico del ara-C. Parece probable que tejidos normalmente protegidos por la Cyd-dCyd deaminasa sufrirían efectos desfavorables si se administra la combinación de ambas drogas.

Otro método para prevenir este tipo de resistencia es diseñando análogos del ara-C con alta actividad de sustrato para la dCyd-quinasa y poca afinidad por la deaminasa. En ese sentido se ha demostrado que con la administración de derivados fosfolipídicos del ara-C: ara-CDP-dipalmitina y N⁴-palmitoil-ara-C se obtienen muy buenos índices terapéuticos en tumores experimentales (137,138). Esto se debe a que, además de ser malos sustratos para la deaminasa, estos compuestos actúan como drogas de liberación prolongada.

Otra causa de resistencia celular al ara-C resulta de mutaciones que conducen a una deficiencia en la actividad de la dCyd-quinasa. De esta manera las células tienen disminuída la capacidad de retención del ara-C y generan poco ara-CTP, el metabolito letal. Se ha identificado una mutante de este tipo en células derivadas de una leucemia promielocítica humana (HL-60) que requiere 1.000 veces más ara-C que las células salvajes para obtener una inhibición del 50% del crecimiento celular (139).

Otras mutaciones que provocan resistencia al ara-C son las que causan alteraciones en la DNA polimerasa- α , enzima responsable de la síntesis replicativa del DNA. Por ejemplo, se ha verificado que la enzima purificada de pacientes con leucemia linfoblástica aguda es más resistente a la inhibición con ara-CTP que la enzima purificada de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (140). Estos hallazgos podrían explicar por qué el ara-C es más efectivo en el tratamiento de las leucemias no linfocíticas.

Finalmente, existe la posibilidad de que mutaciones que lleven a una alteración en el transportador de dCyd provoquen resistencia al ara-C. Este tipo de resistencia, así como algunas de las mencionadas anteriormente, pueden ser corregidas con la administración de altas dosis de ara-C ya que en esa situación este análogo puede entrar por difusión simple.

II. TRANSDUCCION DE SEÑALES EXTRACELULARES MEDIADAS POR LA HIDROLISIS DE FOSFOINOSITIDOS

El comportamiento de las células en diferentes momentos está gobernado por sistemas de señalización que traducen información externa en un limitado repertorio de señales internas, denominados segundos mensajeros.

Los receptores de la superficie celular funcionan como antenas moleculares detectando información externa (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores o luz) que luego es transducida y amplificada por los segundos mensajeros; éstos, a su vez, controlan numerosos procesos celulares tales como metabolismo, secreción, contracción, fototransducción y crecimiento celular.

El interés en el campo de la transducción de señales está creciendo aceleradamente por muchas razones, entre las cuales la posibilidad de que un desbalance de segundos mensajeros sea la responsable de la cancerización celular es de suma importancia.

El sistema de señalización que utiliza AMPc como segundo mensajero es quizás el más conocido.

Existe otro sistema de señalización que involucra el metabolismo de fosfoinosítidos en su mecanismo de transducción.

Las primeras observaciones fueron realizadas por Hokin y Hokin (141) quienes descubrieron que la estimulación del páncreas con acetilcolina provocaba un aumento en la incorporación de (^{32}P) a Ptd-A y Ptd-Ins. En ese mismo tejido verificaron que la incorporación de (^3H)Ins al Ptd-Ins también estaba aumentada (142). Inicialmente no se sabía si la marcación incrementada se debía a un aumento en la síntesis de novo de Ptd-Ins o a un aumento de la velocidad de recambio de este fosfolípido. La respuesta provino del mismo grupo, cuando verificaron que en cortes de cerebro el aumento de incorporación de (^{32}P) y (^3H)Ins al Ptd-Ins no estaba acompañada por un aumento en la incorporación de glicerol radioactivo, indicando que en esas circunstancias había un recambio sólo de la porción fosforil-inositol de la molécula y que la porción diglicérido era re-utilizada para la síntesis de Ptd-Ins (143).

La observación que por efecto de un agonista se estimulaba el catabolismo de Ptd-Ins fue luego generalizada para una gran variedad de tejidos en respuesta a numerosos estímulos extracelulares (99,102,144,145).

Durell y col. sugirieron que este metabolismo estimulado (conocido también como la "respuesta de Ptd-Ins") podría ser parte de la función de receptores (146) mientras que Michell propuso que el metabolismo de fosfoinosítidos estaba involucrado con el modo de acción de aquellos agonistas que elevaban el Ca^{2+} intracelular (102).

Si bien esta hipótesis no es aceptada universalmente (147), las numerosas coincidencias entre los agonistas que movilizan Ca^{2+} y estimulan el turnover de fosfoinosítidos (144), así como los controles de negativos (receptores que no movilizan Ca^{2+} no estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos) han llevado a aceptar que el Ca^{2+} y los fosfoinosítidos están íntimamente conectados.

Berridge y col. demostraron que el nexo que une a los fosfoinosítidos y el Ca^{2+} es el Inositol-1,4,5 trifosfato (InsP_3) (148).

Este compuesto se genera por la hidrólisis de Ptd-Ins (4,5) P_2 en la cara interna de la membrana plasmática por la acción de una fosfodiesterasa que es activada a través de la ocupación de un receptor por su correspondiente agonista.

Originalmente se pensaba que sólo el Ptd-Ins era hidrolizado, pero más recientemente se encontró que los tres fosfoinosítidos pueden ser degradados por una fosfodiesterasa para formar 1,2DG y uno de los inositol fosfatos (Fig. VI). Sin embargo, sólo la hidrólisis de Ptd-Ins(4,5) P_2 genera InsP_3 que funciona como segundo mensajero. Los inositol fosfatos son rápidamente degradados a inositol por inositol-fosfato fosfatasas y este compuesto es utilizado para la re-síntesis de Ptd-Ins. Este compuesto se halla en equilibrio con el Ptd-Ins-4P y el Ptd-Ins(4,5) P_2 a través de un ciclo de quinasas y fosfatasas que mantienen a los polifosfoinosítidos en una muy baja concentración (Ptd-Ins:5-7% frente a Ptd-Ins-4P:1% y Ptd-Ins(4,5) P_2 :0,4% de los fosfolípidos totales).

El 1,2DG puede seguir dos caminos: puede ser hidrolizado por lipasas para dar monoglicérido y luego araquidonato y glicerol o bien ser fosforilado por la 1,2DG quinasa para dar Ptd-A. El Ptd-A es luego convertido a Ptd-Ins a través de la formación de Ptd-CMP, completando de esa manera el "ciclo del Ptd-Ins".

El InsP_3 y 1,2DG funcionan como segundos mensajeros de manera análoga a como lo hace el AMP_c , es decir, i) su producción se inicia por agonistas

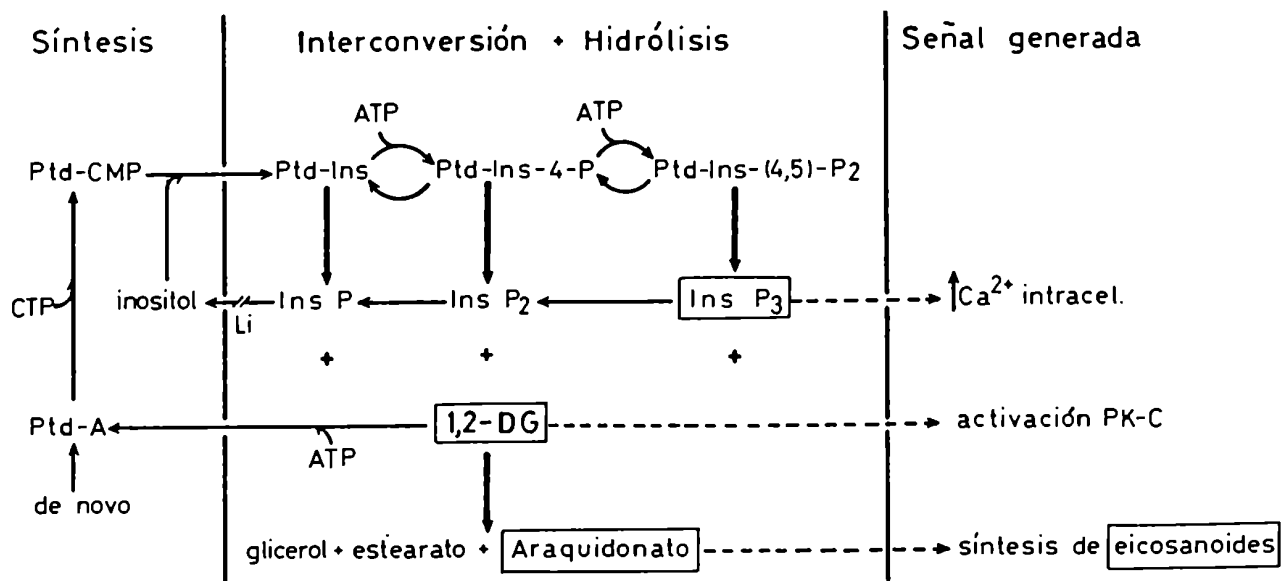


Figura VI: El ciclo del fosfatidil-inositol y producción de segundos mensajeros.

InsP: inositol-1-fosfato, InsP₂: inositol-1,4-bisfosfato, InsP₃: inositol-1,4,5 trifosfato, PK-C: proteína-quinasa C.
 // reacción bloqueada por Li⁺.

específicos, ii) son potentes activadores de otras reacciones celulares actuando en muy baja concentración y iii) son rápidamente degradados a compuestos inactivos. En la Tabla I se presenta un resumen de los tejidos que responden a estímulos externos a través de la hidrólisis de Ptd-Ins (4,5)P₂.

El araquidonato, que se genera en la mayoría de las células pero no en todas, es también considerado un segundo mensajero. Es el precursor obligado de la síntesis de eicosanoides, familia de compuestos que incluye a las prostaglandinas, tromboxano y leucotrienos que median o modulan una gran variedad de funciones celulares (149). Si bien muchos de estos compuestos cumplen con los requisitos de segundos mensajeros, a diferencia de los anteriores tienden a actuar sobre células vecinas más que intracelularmente. Por otra parte, existen numerosas evidencias que indican que el araquidonato puede activar por sí mismo ciertos procesos celulares, particularmente la liberación de GMP_c que acompaña la hidrólisis de fosfoinosítidos en numerosos sistemas celulares (100,102,145).

Existen varias maneras de determinar que el ciclo descrito en la Figura VI tiene lugar. Históricamente, como ya se ha mencionado, se utilizó el aumento en la incorporación de precursores radioactivos al Ptd-A y Ptd-Ins. Con el advenimiento de técnicas más precisas de separación ha sido posible observar aumentos en la marcación de los polifosfoinosítidos. Más recientemente se ha logrado medir directamente la producción de los inositol-fosfatos solubles; esto se ha conseguido gracias al descubrimiento que el Li⁺ inhibe la inositol-1-fosfato fosfatasa (177,178). De esta manera se produce una acumulación de InsP y una disminución de inositol libre lo que impide que el reciclaje de inositol tenga lugar. La amplificación de la acumulación de inositol-fosfatos provocada por el Li⁺ constituye una herramienta muy útil para medir la degradación de fosfoinosítidos (178).

II.1. Formación de Inositol 1,4,5 trifosfato y movilización de Ca²⁺. Perspectiva histórica.

Se sabe desde los tiempos de Ringer, hace más de cien años, que el Ca²⁺ es esencial para la contracción del corazón (150). Comenzando con los clásicos trabajos de Katz sobre la liberación de acetilcolina en terminales nerviosos (151), ha sido aparente que muchas respuestas evocadas por agonistas

Tabla I. Tejidos que responden a estímulos externos con un cambio en la hidrólisis de Ptd-Ins(4,5)P₂ (Ref. 148).

Tejido	Estímulo
Músculo liso de iris de conejo	Acetilcolina*
Cerebro	Acetilcolina*
Parótida	Acetilcolina*, sustancia P*
Páncreas	Acetilcolina*, careuleina*
Hígado	Adrenalina, ATP, vasopresina*, angiotensina, factor de activación plaquetario
Glándula salival de moscarda	Serotonina* (5-hidroxitriptamina)
Plaquetas sanguíneas	ADP, trombina*, factor de activación plaquetario
Ganglio simpático	Vasopresina*
Células de tumor pituitario, GH ₃	Hormona de liberación de tirotrófina
Corteza adrenal	Angiotensina
Islotes pancreáticos	Glucosa
Neutrófilos	F-met-leu-phe
Células leucémicas, HL-60	F-met-leu-phe*
Leucocitos	Leucocidina de pseudomona
Células linfoblastoideas T	PHA
Basófilos leucémicos	Antígeno*
Fibroblastos 3T3	PDGF*, bombesina*, vasopresina*
Fotoreceptores	Fotones*
Huevos de erizo de mar	Espermatozoides

La hidrólisis de Ptd-Ins(4,5)P₂ fue usualmente medida siguiendo cambios en la distribución de (³H)Ins o (³²P). *: sistemas donde se describieron los aumentos en la formación de InsP₃.

PHA: fitohemaglutinina; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; F-met-leu-phe: formilmetionil-leucil-fenilalanina.

utilizan el Ca^{2+} como segundo mensajero. En efecto, se observaba que la respuesta fisiológica requería Ca^{2+} extracelular e incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular derivado de reservorios tanto intracelulares como extracelulares.

En un estudio realizado sobre una gran variedad de tejidos que mostraban la respuesta de Ptd-Ins, Michell notó que el mecanismo de estímulo-respuesta en estos tejidos involucraba al Ca^{2+} como segundo mensajero (102). Teniendo en cuenta que en la mayoría de los tejidos estudiados hasta ese momento la respuesta de Ptd-Ins era parcial o totalmente independiente del Ca^{2+} extracelular y que los ionóforos de Ca^{2+} provocaban respuestas fisiológicas pero no la hidrólisis de Ptd-Ins, Michell propuso la hipótesis de que la hidrólisis de Ptd-Ins antecedió a la elevación de Ca^{2+} celular sugiriendo que la hidrólisis de Ptd-Ins abría "compuertas para Ca^{2+} " en la membrana plasmática (102).

Esta hipótesis fue avalada durante algunos años particularmente por los trabajos de Fain y Berridge en la glándula salival de moscarda (blowfly) donde la estimulación con 5-hidroxitriptamina (serotonina) causaba una pérdida de Ptd-Ins y una entrada de Ca^{2+} a las células epiteliales (152,153).

Hasta hace poco tiempo, la hipótesis de las "compuertas para Ca^{2+} " fue motivo de considerables controversias. Estas se basaban en el hecho de que en algunos tejidos la respuesta de los fosfoinosítidos, usualmente la de Ptd-Ins, es Ca^{2+} -dependiente (154). Asimismo, ionóforos de Ca^{2+} como el A23187 estimulan, en algunos casos, la hidrólisis de fosfoinosítidos, generalmente la de Ptd-Ins, sugiriendo que en dichas situaciones la hidrólisis de fosfoinosítidos debería ser secundaria al aumento de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_c).

El debate se complicó aún más por el hecho de que la(s) fosfoinosítido-fosfodiesterasa(s) son Ca^{2+} -dependientes (ver sección I.3.3.3.1.). Lo que parece surgir de los datos actualmente disponibles es que bajo condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica, la concentración de Ca^{2+} requerida para el clivaje fosfodiesterásico de al menos Ptd-Ins(4,5) P_2 está a nivel o por debajo de la concentración intracelular del Ca^{2+} en reposo (aprox. $0,1 \mu\text{M}$). De esta manera, el Ca^{2+}_c no es un factor limitante para el clivaje de Ptd-Ins(4,5) P_2 (155-156). En ese sentido, un antecedente que apoya esta afirmación lo constituyó el hecho de que en hepatocitos

estimulados con vasopresina, la hidrólisis de Ptd-Ins(4,5)P₂ precede cambios en Ptd-Ins y es independiente del Ca²⁺ extracelular (176).

A pesar de que los detalles de la propuesta inicial de Michell sobre el compromiso del Ptd-Ins en la apertura de "compuertas para el Ca²⁺" en la membrana plasmática eran incorrectas, se ha mantenido el concepto de que una función del metabolismo acelerado de fosfoinosítidos es elevar el Ca²⁺ intracelular y que éste es un nexo esencial en numerosos mecanismos de estímulo-respuesta (157,158).

Se ha demostrado que en aquellos tejidos que responden con la hidrólisis de fosfoinosítidos, la fuente inmediata de Ca²⁺_c es intracelular y proviene del retículo endoplásmico (159-161). Este pool intracelular de Ca²⁺ que es liberado al citosol en el término de segundos, es denominado habitualmente "disparo" o "gatillado" de Ca²⁺ (trigger Ca²⁺). Su liberación es continuada, tiempo más tarde, por un influjo de Ca²⁺ extracelular (157) que mantiene la respuesta a tiempos mayores y tiende a reponer el pool de Ca²⁺_c que inicialmente se agota por el gatillado.

Es obvio que se necesita un mensajero para transferir la información desde el receptor en la membrana plasmática al lugar de liberación de Ca²⁺_c.

Cuando Berridge encontró una muy rápida liberación de InsP₃ al estimular glándulas salivales de moscarda con serotonina (162) sugirió que el InsP₃ era el segundo mensajero para la movilización intracelular de Ca²⁺. Posteriormente se determinó que si el InsP₃ es agregado a células permeabilizadas hay una rápida liberación de Ca²⁺ (163-166). La concentración de InsP₃ requerida para liberar el 50% del Ca²⁺ está en el orden de 0,1-1 μM (163-166). No hay liberación con InsP₂, InsP o con Inositol-1,2-fosfato cíclico (compuesto intermediario del clivaje de Ptd-Ins (167)) (148,163). El Inositol 1,4,5 trifosfato es capaz de liberar Ca²⁺ cuando se agrega directamente a microsomas de páncreas (159), hígado (160) y de un insulinoma de rata (161) y no libera Ca²⁺ de fracciones mitocondriales (159-161).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, más las numerosas evidencias que indican que el sitio principal de clivaje del Ptd-Ins es el retículo endoplásmico (168-171) y que el Ptd-Ins es la fuente principal de 1,2DG y araquidonato (172), Hokin propuso recientemente una secuencia de eventos esquematizada en la Figura VII (100). Según ésta, la interacción de un agonista con

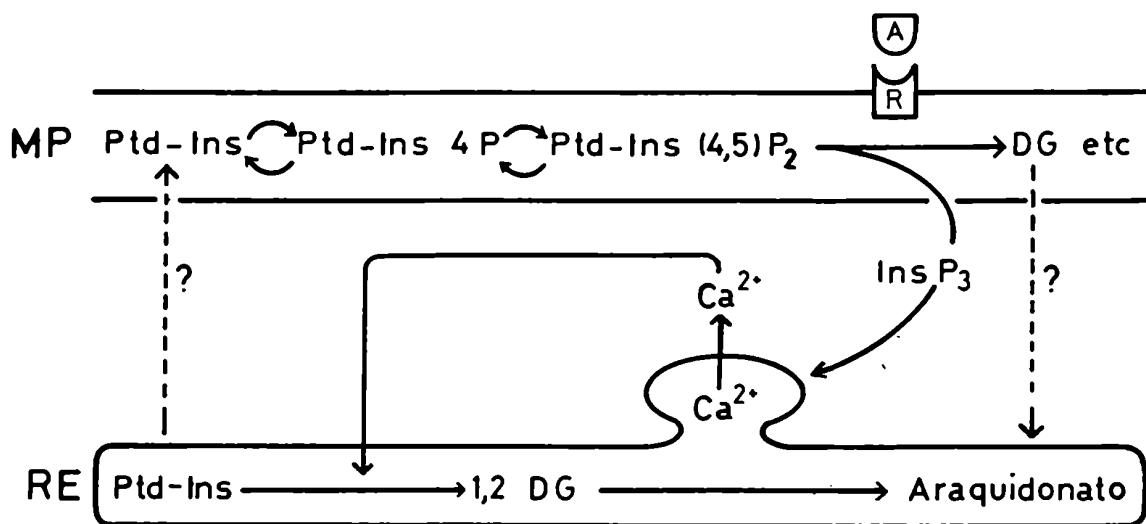


Figura VII: Interacciones entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático ante la llegada de un agonista.

A: agonista; R: receptor; MP: membrana plasmática; RE: retículo endoplasmático.

su receptor provoca la ruptura de Ptd-Ins(4,5)P₂ en la membrana plasmática liberando al medio intracelular InsP₃; éste gatillará la salida de Ca²⁺ del RE que a su vez estimulará la hidrólisis de Ptd-Ins. El 1,2DG así formado es sustrato para una diglicérido-lipasa que libera araquidonato, mientras que el 1,2DG que se genera en la membrana plasmática es posiblemente utilizado para la síntesis de Ptd-A. En ese sentido, se ha encontrado que preparaciones aisladas de membrana plasmática de linfocitos al ser estimuladas con PHA estimulan la incorporación de (³²P)-ATP a Ptd-A (102).

No queda claro aún si el metabolismo de fosfoinosítidos juega algún rol en la entrada de Ca²⁺ extracelular. Se ha propuesto que el Ptd-A generado en la membrana plasmática pueda actuar como ionóforo de Ca²⁺ (173). El ácido lisofosfatídico generado por la acción de una fosfolipasa A₂ también ha sido propuesto como ionóforo en plaquetas (174). Sin embargo, ni el Ptd-A ni el lisoPtd-A se comportan como ionóforos de Ca²⁺ en liposomas de Ptd-Col (175).

II.2. Acumulación de 1,2 Diacilglicerol y activación de la proteín-quinasa C.

El otro producto primario de la hidrólisis diesterásica de los fosfoinosítidos es el 1,2DG. Este compuesto se eleva transitoriamente al estimular la ruptura de los fosfoinosítidos en plaquetas (179), páncreas (172), células cebadas (180), fibroblastos 3T3 (181), células pituitarias (182) y hepatocitos (183).

En 1979, Nishizuka y col. encontraron que en una proteín-quinasa independiente de nucleótidos cíclicos previamente aislada del citosol de cerebro de rata (184) podía ser activada por fosfolípidos aniónicos (de los cuales la Ptd-Ser es indispensable) en presencia de Ca²⁺ (185). En un trabajo siguiente el grupo mostró que cantidades micromolares de 1,2DG disminuían dramáticamente el Km aparente para el Ca²⁺, de tal manera que en esas condiciones la enzima mostraba una máxima actividad con concentraciones basales de Ca²⁺ (186). Este hallazgo implica que un mecanismo de control que aumenta los niveles de 1,2DG (como es la hidrólisis de los fosfoinosítidos) podría activar una proteín-quinasa celular sin una movilización previa de Ca²⁺ o AMPc (187).

La enzima, denominada proteín-quinasa C (PK-C) está presente en todos los tejidos de mamíferos y otros organismos (188). Se ha sugerido que la PK-C es citosólica y que la enzima encontrada en fracciones particuladas está solo

adsorbida a ellas. Sin embargo, en algunos casos se requiere detergentes (0,2-0,4% de Tritón X-100) para removerla (188).

En muchos tejidos su actividad excede ampliamente la actividad de la proteína-quinasa AMPc-dependiente (PK-A) cuando se las ensaya sobre un mismo sustrato. Consiste en una única cadena polipeptídica de 67 KD de peso molecular, con dos dominios funcionales que pueden ser separados por proteasas especiales: uno de ellos es hidrofóbico y el otro es hidrofílico y lleva la actividad catalítica (189,190).

Se ha verificado que drogas anfifílicas del tipo de la CPZ, imipramina, anestésicos locales y otros compuestos que interactúan con fosfolípidos inhiben la actividad de PK-C in vitro, compitiendo con los fosfolípidos pero no con el Ca^{2+} o 1,2DG (116,191). Si bien estos compuestos bloquean la actividad de calmodulina, la PK-C es independiente de CaM (192).

Castagna y col. encontraron que el promotor tumoral TPA (tetradecanoilforbol acetato) puede sustituir al 1,2DG como activador de PK-C, actuando a concentraciones 1.000 veces menor que el 1,2DG y provocando la fosforilación de varias proteínas celulares (193). Estudios de co-purificación sugieren fuertemente que la PK-C es el receptor celular para el TPA (194).

Existen algunas evidencias que indican que parte de la regulación fisiológica de la PK-C implica su unión a la membrana plasmática ya que se ha verificado que el TPA causa una rápida disminución de la enzima citosólica y un correspondiente aumento en la cantidad unida a la membrana plasmática (157,192).

La transferencia de la PK-C del citosol a la membrana plasmática pondría a la enzima en contacto con su activador fisiológico, el 1,2DG, y con los fosfolípidos aniónicos, esenciales para su actividad.

Una pregunta que cabe formularse es si la activación de la PK-C por el TPA es la responsable de la promoción tumoral ejercida por este compuesto. Se sabe que, mientras que el 1,2DG es rápidamente destruido luego de su producción, proveyendo sólo una señal transitoria, los ésteres de forbol no son fácilmente metabolizables lo que implica un estado continuo de estimulación.

El mecanismo de carcinogénesis química es actualmente caracterizado como un proceso multifacético que incluye al menos dos fases: iniciación y promoción (195). La iniciación se lleva a cabo por la aplicación de dosis subcar-

cinogénicas de carcinógenos químicos (ej. dimetilbenzantraceno). Los tumores se desarrollan por la aplicación repetida de otro compuesto no carcinogénico (ej. TPA). Dicho compuesto promueve la cancerización del tejido ya iniciado en el proceso (196). La capacidad tumorigénica de los ésteres de forbol ha correlacionado bien con su capacidad de activar a la PK-C (193,197). Por otra parte, el ácido retinoico y sus derivados han demostrado ser efectivos antipromotores, inhibiendo la tumorigénesis inducida por ésteres de forbol en sistemas epidérmicos de ratón (198). El retinal es un inhibidor de la proteína-quinasa C (199).

II.3. Formación de araquidonato y sus metabolitos

En plaquetas (155), minilóbulos pancreáticos (172) y otros tejidos (200) existe una liberación agonista-dependiente de ácido araquidónico; los estudios llevados a cabo en páncreas sugieren fuertemente que la estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos genera araquidonato vía la acción secuencial de la fosfolipasa C (que produce 1,2DG) y la diglicérido lipasa. Se considera que en la mayoría de las células el araquidonato proviene en un 50-75% de esta vía. El resto proviene de la acción de una fosfolipasa A₂ que actúa sobre distintos fosfolípidos. En plaquetas esta enzima actúa sobre Ptd-Col, Ptd-EA y Ptd-Ins (201).

La fosfolipasa A₂ tiene baja afinidad por el Ca²⁺ por lo que se presume se activaría como consecuencia de la elevación del Ca²⁺_c provocada por la hidrólisis de fosfoinosítidos (100). También se describió una fosfolipasa A₂ que actúa sobre Ptd-A en plaquetas (202). Sin embargo, posteriormente se determinó que la trombina produce liberación de araquidonato antes de detectar algún aumento de Ptd-A (203).

El araquidonato es el precursor obligado para la síntesis de prostaglandinas (PG) y otros eicosanoides (149). Dado que las enzimas que sintetizan estos compuestos están continuamente activas en las células, la producción de eicosanoides está determinada por la cantidad de araquidonato disponible (155,172). Este, a su vez, es función de la concentración de 1,2DG y de la velocidad con que es utilizado por la 1,2DG-quinasa o la 1,2DG-lipasa.

En el páncreas, la elevación de araquidonato producida vía la hidrólisis de fosfoinosítidos es varios órdenes de magnitud mayor que la elevación de

PGE₂ y PGF₂ provocada por el agonista (172). Por esta razón se piensa que el araquidonato tendría otras funciones además de regular la producción de eicosanoides.

Michell notó, en 1975, que en una gran variedad de tejidos que respondían a estímulos extracelulares con la hidrólisis de fosfoinosítidos, los niveles de GMP cíclico estaban también elevados, no así los niveles de AMPc. Se ha encontrado que el araquidonato y otros ácidos grasos activan la guanilato ciclasa (204,205) sugiriendo que este compuesto modula la concentración de GMPc cuando las células son estimuladas por un agonista.

Si bien el Ca²⁺ ha sido involucrado en este efecto, porque la privación del mismo previene el aumento de GMPc y porque los ionóforos de Ca²⁺ producen el mismo efecto que los agonistas sobre este nucleótido (204), parece probable que ese efecto sea la consecuencia de la dependencia de la fosfolipasa A₂ y probablemente también de la DG-lipasa por este catión (100,206).

Se ha postulado que el GMPc generado por la acción del araquidonato funcionaría como una señal negativa para la hidrólisis de fosfoinosítidos (100,192), proveyendo un control por retroalimentación que prevendría la sobre-respuesta de los receptores.

II.4. Interacciones sinérgicas entre la vía del 1,2 diacilglicerol y la del Inositol 1,4,5 trifosfato.

Un sistema de señalización que se bifurca, como el de la hidrólisis de fosfoinosítidos, provee una gran versatilidad para su control.

Como hemos visto, una ruta fosforila proteínas a través de la activación de la PK-C por 1,2DG y la otra ruta activa reacciones dependientes de CaM a través de aumentos en la concentración de Ca²⁺c generados por el InsP₃.

Algunos efectos del Ca²⁺, sin embargo, no están mediados por CaM, como por ejemplo la activación de fosfolipasa A₂ (207).

El sinergismo entre las dos rutas ha sido demostrado estimulando cada vía por separado con sustancias que no interactúan con los receptores específicos. Así, por ejemplo, ionóforos de Ca²⁺ como el A23187 y análogos del 1,2DG como el OAG (1-oleil-2-acetil glicerol) o los ésteres de forbol, que producen aumentos en el Ca²⁺c y activación de PK-C respectivamente, han sido herramientas muy útiles para evaluar el sinergismo de las dos rutas en una

respuesta celular dada.

En la mayoría de los casos, cada agente por separado es incapaz de producir una respuesta fisiológica máxima, aunque sí lo hacen ambos actuando en conjunto (192,208-210). Esta afirmación es válida para los procesos de secreción observados en plaquetas, neutrófilos, hígado, páncreas, médula adrenal y células cebadas (100).

Otro punto de control, que podría explicar la versatilidad de las respuestas fisiológicas, podría ser llevado a cabo por un clivaje independiente de los tres fosfoinosítidos. En el caso de la ruptura de Ptd-Ins o Ptd-Ins-4P habría formación de 1,2DG pero no InsP_3 . Esto enfatizaría las rutas de 1,2DG y araquidonato, y podría justificar la presencia de distintas fosfodiesterasas (Ca^{2+} -dependientes las que clivan Ptd-Ins y Ptd-Ins-4P y Ca^{2+} -independiente la que cliva Ptd-Ins(4,5) P_2 (100).

Se ha observado que la estimulación de ambas rutas metabólicas, ya sea con ionóforos de Ca^{2+} (211) o con ésteres de forbol (211,212), aumenta grandemente la formación de Ptd-Ins4P y Ptd-Ins(4,5) P_2 , estos resultados sugieren que tanto el 1,2DG como el Ca^{2+} podrían funcionar como retroalimentadores positivos de su propia síntesis incrementando la formación de Ptd-Ins(4,5) P_2 , necesario para el funcionamiento del receptor. Este tipo de regulación tiene mucha importancia si se piensa que la concentración de polifosfoinosítidos en la membrana plasmática es sumamente baja.

Un problema que no ha sido aclarado totalmente en la formación de InsP_3 y 1,2DG es cómo los receptores en la membrana plasmática están conectados con la Ptd-Ins(4,5) P_2 fosfodiesterasa. Se ha sugerido que los agonistas inducirían un cambio conformacional en el receptor, lo que perturbaría la membrana lo suficiente como para hacer accesible el Ptd-Ins(4,5) P_2 a la fosfodiesterasa (213). Alternativamente, esta enzima podría estar conectada al receptor a través de una proteína que une GTP, tal como ocurre en el mecanismo que vincula los receptores a la adenilato-ciclasa (214,215).

Las primeras indicaciones que sugirieron que una proteína que une GTP estaría involucrada en la transducción de señales que implican hidrólisis de fosfoinosítidos y movilización de Ca^{2+} fueron las observaciones que el GTP aumenta la afinidad de noradrenalina por receptores α_1 (216) y de carbacol por receptores muscarínicos (217).

Un vínculo más directo surgió de trabajos sobre plaquetas permeabilizadas, donde tanto el GTP como sus análogos no hidrolizables aumentan la sensibilidad del mecanismo secretor al Ca^{2+} (218), aparentemente por formación de 1,2DG (148).

Se ha sugerido que el producto del proto-oncogen celular ras, p21, proteína de membrana capaz de unir e hidrolizar GTP (219,220) pueda funcionar vinculando los receptores con la Ptd-Ins(4,5) P_2 fosfodiesterasa (148). En apoyo a esta hipótesis se ha encontrado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) aumenta la unión de GTP a la p21^{ras} (221), sugiriendo que el producto del gen ras puede interactuar con receptores de membrana.

Cabe agregar que también se ha involucrado a la p21 con la activación de la adenilato-ciclasa en levaduras (222).

Otras interacciones entre los nucleótidos cíclicos y la hidrólisis de los fosfoinosítidos sugieren que ambos mecanismos de transducción están conectados. En plaquetas, por ejemplo, el AMPc tiene un marcado efecto inhibitorio sobre la hidrólisis de fosfoinosítidos (168), generalmente interpretado como una inhibición de la fosfodiesterasa pero igualmente probable como una acción sobre las quinasas o las fosfomonoesterasas que controlan el nivel de Ptd-Ins(4,5) P_2 (148). También se han reportado efectos similares de los ésteres de forbol (presumiblemente actuando como análogos de 1,2DG) sobre la sensibilidad de receptores que activan a la adenilato-ciclasa (223).

II.5. Crecimiento celular y oncogenes.

Se sabe desde hace muchos años que los mitógenos provocan cambios tempranos en el metabolismo de fosfoinosítidos. En efecto, Fisher y Mueller (61) informaron hace más de 15 años que la PHA estimulaba la incorporación de (³²P) a Ptd-Ins y Ptd-A en una población mixta de linfocitos humanos al cabo de 3 min de incubación, mientras que la síntesis del resto de los fosfolípidos celulares comenzaba a verse afectada recién a los 30 min. Por otra parte, la mayoría de los efectos estimulatorios de la PHA como aumento de síntesis de proteínas, transporte de sustancias y síntesis de DNA entre otras, no ocurrían sino al cabo de varias horas y aún días de estimulación (224). Más recientemente se ha observado que dicho evento está precedido por una muy rápida hidrólisis de Ptd-Ins(4,5) P_2 (225).

En concordancia con estas observaciones, se ha señalado que una gran variedad de mitógenos (226,227) y factores de crecimiento (228) estimulan el metabolismo de fosfoinosítidos.

El descubrimiento del InsP_3 como segundo mensajero ha contribuido a la comprensión de aquellos aspectos del crecimiento celular que dependen de la movilización de Ca^{2+} de reservorios intracelulares. Por otra parte, el rol de la PK-C en la transducción de señales extracelulares y su sinergismo con el Ca^{2+} han permitido proponer que el 1,2DG y el InsP_3 funcionan como segundos mensajeros controlando los principales eventos iónicos implicados en la proliferación celular. Dichos eventos se muestran en la Figura VIII.

El 1,2DG generado en el plano de la membrana plasmática actúa estimulando a la PK-C que, como ya mencionamos, es el sitio probable de acción de los promotores tumorales. Dado que los ésteres de forbol pueden activar un sistema intercambiador Na^+/H^+ (229), se ha propuesto que el 1,2DG actúa de la misma manera, incrementando el pH citoplasmático (145,148).

Este sistema intercambiador, que se encuentra en la membrana plasmática está silencioso en células quiescentes, pero puede ser activado por el suero o factores de crecimiento aumentando el flujo de Na^+ hacia la célula y acidificando el medio extracelular (sin bicarbonato); con el uso del indicador fluorescente de pH quin 1 se ha verificado la correspondiente alcalinización del citoplasma (230). Este mecanismo es inhibido por el amiloride y sus derivados, y se ha observado que, en determinadas ocasiones, estos compuestos bloquean la iniciación de la proliferación celular (231).

El incremento de pH celular es un rasgo característico de la acción de mitógenos y factores de crecimiento y se piensa que cumple un importante papel en la estimulación del crecimiento celular (230-232).

El Ca^{2+} ha sido largamente implicado en la proliferación celular (233-235), particularmente por la observación que en linfocitos, el A23187 podía imitar los efectos de la PHA (234,235). Posteriormente se demostró que este ionóforo aumenta también el pH citoplasmático, actuando probablemente sobre las mitocondrias (230).

El incremento de Ca^{2+}_c que ocurre cuando las células son estimuladas con factores de crecimiento (232,236) o durante la fertilización (237) depende de la hidrólisis de $\text{Ptd-Ins}(4,5)\text{P}_2$ que genera InsP_3 y éste a su vez promueve la

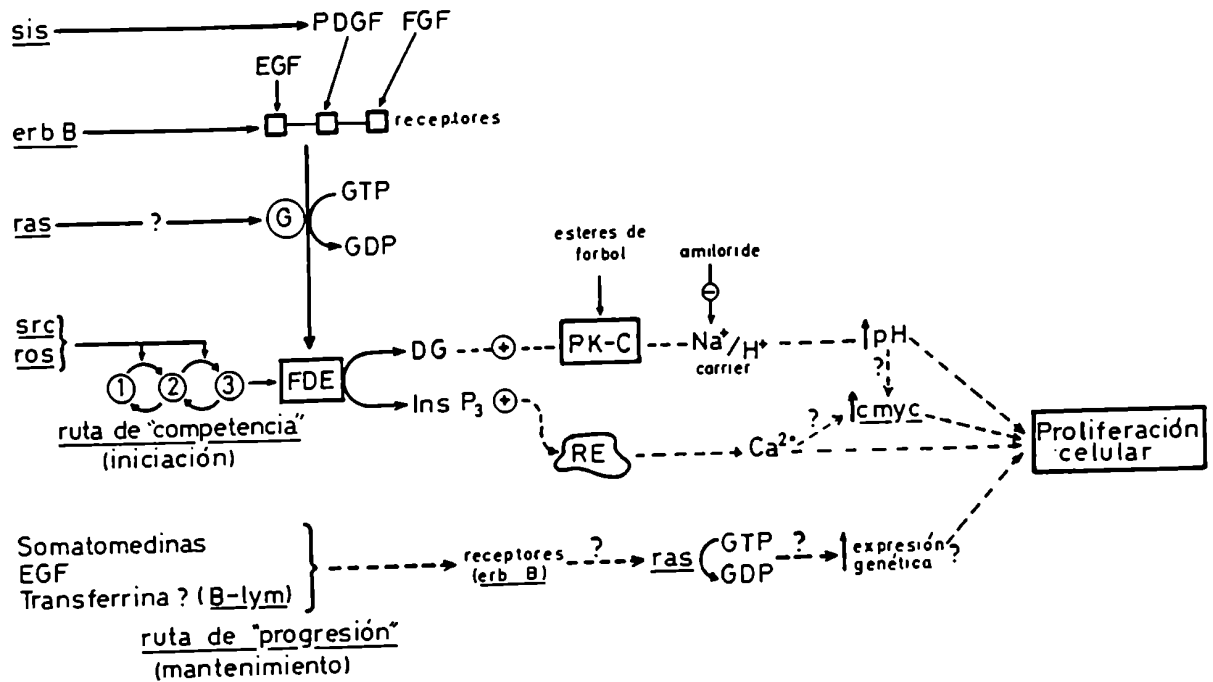


Figura VIII: Mecanismo propuesto de regulación de la proliferación celular por 1,2 DG, InsP₃ y proteínas oncogénicas.

El esquema representa una integración de los modelos propuestos por Berridge (148) y Macara (245).

Las transformaciones químicas se han indicado con líneas llenas, las de regulación con líneas punteadas. Las proteínas oncogénicas están subrayadas.

1: Ptd-Ins, 2: Ptd-Ins-4-P, 3: Ptd-Ins(4,5)P₂; FDE: fosfodiesterasa (fosfolipasa C).

salida de Ca^{2+} de reservorios intracelulares (RE). Esto se ha verificado incubando las células en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la mayoría de los efectores provoca un aumento transiente de Ca^{2+}_c que precede al aumento de pH (236).

La acción de factores de crecimiento (PDGF, bombesina y vasopresina) sobre fibroblastos 3T3 resultan en una aumentada formación de 1,2DG (181) e InsP_3 (238,239).

En fibroblastos de hamster estimulados con trombina se ha observado un efecto similar (240). En este sistema, sin embargo, el efecto mitogénico de la trombina persiste aún cuando se bloquea la liberación de InsP_3 con bajas concentraciones de neomicina. Concentraciones mayores de este antibiótico, que impiden el clivaje de los tres fosfoinosítidos, resultan en una inhibición de la síntesis de DNA. Estos resultados sugieren que la señal de Ca^{2+}_c generada por el InsP_3 no es necesaria para llevar a cabo el efecto mitogénico de la trombina, mientras que la producción de 1,2DG es indispensable. De esta manera la activación de la PK-C jugaría un rol central en la mitogénesis provocada por la trombina.

Un avance fundamental en la comprensión de los fenómenos que conducen a la división celular y su control resultó de la observación que los productos de varios oncogenes pueden estar implicados en esta cascada de eventos (Figura VIII).

1°) El producto del oncogen v-sis es similar, sino idéntico al PDGF (241,242).

La producción de altas concentraciones de este factor podría llevar a una división descontrolada de las células.

2°) El oncogen v-erb-B codifica una proteína muy similar al receptor de EGF pero carece de la porción de la molécula que reconoce al factor (243).

Esto representa un receptor truncado que estaría activado independientemente de la presencia de su ligando.

El EGF estimula el metabolismo de fosfoinosítidos en algunos tejidos (181,235) pero no en otros (244). En base a ésta y otras observaciones Macara propuso que en los tejidos donde el EGF no estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos, actúa en la progresión de la respuesta mitogénica (245) (ver más adelante).

3°) Los productos de los oncogenes v-src (246) y v-ros (247) tienen actividad de lípido-quinasa in vitro e in vivo. El producto de v-ros (pp63^{v-ros}) fosforila Ptd-Ins para formar Ptd-Ins-4P y el producto de v-src (pp60^{v-src}) fosforila también Ptd-Ins-4P y 1,2DG para formar Ptd-Ins(4,5)P₂ y Ptd-A respectivamente. La transformación de fibroblastos con los virus UR₂^{v-ros} y RSV^{v-src} condujo a una formación aumentada de InsP₃ e InsP₂ con el primero (247) así como a una incorporación aumentada de (³²P) a Ptd-Ins-4P, Ptd-Ins(4,5)P₂ y Ptd-A con el segundo (246).

En un trabajo reciente se encontró que la PK-C fosforila in vivo e in vitro a la pp60^{v-src} y a su contraparte celular pp60^{c-src} en un sitio novedoso (serina 12) que no es utilizado por otras serin/treonin-quinazas y se discute la posibilidad que esta fosforilación constituya un factor de regulación negativo para la proteína celular pero no para la proteína transformada (248).

Si bien la pp60 y pp68 tienen actividad de tirosin-quinazas, así como los productos de otros oncogenes y los receptores de PDGF, EGF e insulina, numerosas evidencias indican que este tipo de fosforilaciones no juegan un rol esencial en el control de la proliferación celular (245). Sin embargo, la posible existencia de rutas alternativas a las descritas en la Figura VIII, al menos para el PDGF, no permiten descartar esta posibilidad.

4°) Diversos mitógenos como la Con A en linfocitos (249) y PDGF y FGF (factor de crecimiento derivado de fibroblastos) en fibroblastos (249,250), activan la expresión del proto-oncogen c-myc. En células normales, la expresión de este oncogen ocurre transitoriamente cuando las células entran al ciclo celular (251).

Se ha verificado que los ésteres de forbol y los inóforos de Ca²⁺ producen un aumento en la expresión de c-myc en fibroblastos de ratón y que la combinación de ambos provoca un efecto aditivo (252). Estos resultados sugieren que los dos eventos iónicos generados por la hidrólisis de fosfoinosítidos, aumento de Ca²⁺ y pHc, pueden estar involucrados en la expresión de c-myc (245,252). Macara propuso, además, que el aumento de Na⁺ provocado por la activación del transportador Na⁺/H⁺ podría también jugar un rol en este proceso (245).

Recientemente se ha demostrado que el gen c-myc es transcrito a gran

velocidad en fibroblastos quiescentes en G_0 , aunque los RNA_m son muy inestables y se degradan rápidamente (253). En este trabajo los autores demuestran que los factores de crecimiento regulan la expresión de c-myc a nivel post-transcripcional, probablemente inhibiendo la degradación de los mensajeros.

El producto del gen c-myc es una proteína nuclear de 60KD de peso molecular que tiene la propiedad de unirse al DNA (254). Su función hasta ahora es desconocida pero se podría pensar que su presencia desencadenaría la expresión de otros genes necesarios para la proliferación celular. En ese sentido, cabe mencionar los trabajos realizados en fibroblastos humanos estimulados con PDGF (255). En dicho trabajo los autores demuestran que, si bien el PDGF estimula la hidrólisis de fosfoinosítidos y la expresión de c-myc, la desensibilización de la ruta de la PK-C por exposición prolongada con ésteres de forbol inhibe la inducción de c-myc pero no el efecto mitogénico del PDGF. Dado que la desensibilización con los ésteres de forbol no afectó la actividad de tirosinquinasa del receptor de PDGF, los autores sugieren que esta actividad podría ser clave en la respuesta mitogénica del PDGF llevada a cabo por esta ruta alternativa. El modelo que proponen se encuentra esquematizado en la Figura IX. Este modelo difiere un poco del anterior fundamentalmente por el hecho de que el EGF en fibroblastos humanos estimula la expresión de c-myc (255).

Es interesante señalar que durante la diferenciación de células leucémicas que poseen una alta expresión de c-myc (HL-60 y una línea celular proveniente de una eritroleucemia), se ha observado una disminución precoz en la expresión de este oncogen (256,257), precedido por una disminución en los niveles de 1,2DG (257).

5°) No queda claro aún cuál es el rol del oncogen ras en los mecanismos de transducción que llevan a la proliferación celular. Como mencionamos anteriormente, Berridge ha sugerido que este gen controlaría el vínculo entre los receptores y la polifosfoinosítido-fosfodiesterasa.

Macara propone, por el contrario, que el producto del gen ras intervendría en otra ruta metabólica que conduce al mantenimiento de la respuesta mitogénica. En apoyo a esta hipótesis se ha verificado experimentalmente que el gen ras no induce la expresión del gen c-myc (258).

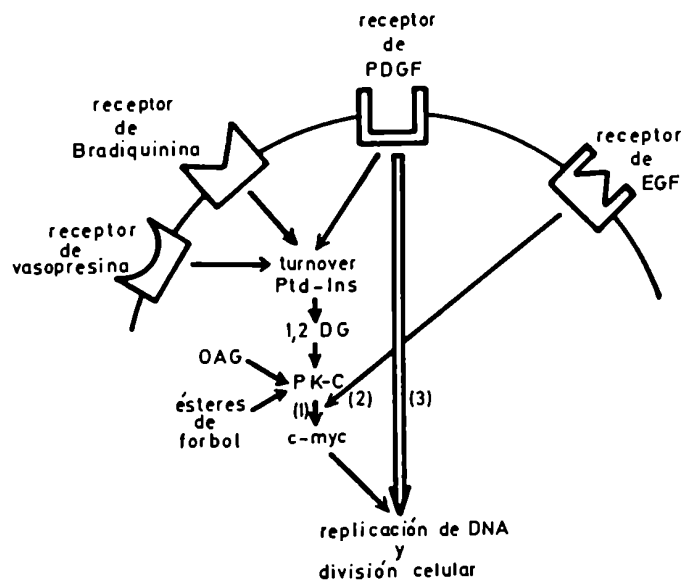


Figura IX: Múltiples vías de inducción de c-myc y proliferación celular en fibroblastos humanos.

Vía 1: Inducción de c-myc por activación de PK-C a través de 1,2DG, ésteres de forbol o 1-oleil-2-acetil glicerol (OAG).

Vía 2: Inducción de c-myc por un mecanismo que no involucra a la PK-C.

Vía 3: Inducción de proliferación celular por un mecanismo que no involucra al turnover de fosfoinosítidos o inducción de c-myc (255).

Tabla II. Respuesta de fibroblastos 3T3 quiescentes a mitógenos

Mitógeno	Efecto sobre el turnover de Ptd-Ins	Efecto sobre intercambio Na ⁺ /H ⁺	Actividad de competencia	Actividad de progresión
Suero	++	++	++	++
PDGF	++	++	++	-
FGF	++ (ref. 252)	++	++	-
Insulina	- (+)	-	-	+
EGF	- (++)	+		+
PGF ₂	++	?	+++	-*
Vasopresina	++	++	+++	-*
Bradiquinina	?	++	+++	-*
Trombina	++	++	+++	-*
Vanadato	+	++	+++	-*
TPA	Imita a 1,2DG	++	+++	-*

++ significa gran aumento, + aumento menor pero significativo, - sin efecto, (+) aumento en algunos tipos celulares, (++) gran aumento en células de carcinoma A431, ? no hay información, * agentes que no han sido estudiados por el método de Stiles y col. (259,260) pero que son sinérgicos con insulina y EGF para estimular la mitosis (Ref. 245).

El modelo de Macara, incluido en la Figura VIII, propone que los factores de crecimiento que estimulan el metabolismo de fosfoinosítidos y expresión de c-myc inician a la célula en la respuesta mitogénica (ruta de competencia) pero las células sólo pueden progresar hacia la síntesis de DNA si están presentes otros factores como las somatomedinas o el EGF que, actuando a través de otro mecanismo permiten la progresión de las mismas hacia la síntesis de DNA (ruta de progresión) (245).

Esta proposición está basada en los resultados obtenidos por Stiles y col. quienes observaron que el efecto mitogénico del suero sobre fibroblastos de ratón 3T3 se debía a la acción sinérgica de dos grupos de factores: un primer grupo, representado por el PDGF otorgaba a las células un estado de "competencia" para replicar su DNA pero las mismas no progresaban hacia la fase S del ciclo celular a menos que se agregaran factores de crecimiento contenidos en un suero pobre en plaquetas. Este segundo grupo de factores, representados por la somatomedina C, tenía muy poca actividad de competencia pero era indispensable para la "progresión" de las células competentes hacia estadios más avanzados que culminaban en la síntesis de DNA (259,260).

En la Tabla II se muestran las características de las respuestas de distintos mitógenos sobre fibroblastos 3T3 y que apoyan el modelo de Macara.

Cabe agregar que los experimentos sobre fibroblastos humanos (Figura IX) se realizaron en presencia de insulina y transferrina (255). La diferencia principal con el modelo de la Figura VIII, es que en este sistema el PDGF induciría "competencia" por un mecanismo distinto a la hidrólisis de fosfoinosítidos.

II.6. Inhibidores de la síntesis de fosfoinosítidos: Efecto terapéutico del Li⁺ en las psicosis maniaco-depresivas.

Las sales de litio han sido y siguen siendo utilizadas extensamente en las enfermedades maniaco-depresivas.

Muchas de las drogas que mejoran o revierten esta sintomatología interfieren con la fisiología de las aminas biógenas, sugiriendo que los cambios anímicos asociados con los estados de depresión o manía pueden estar relacionados con la neurotransmisión mediada por estas sustancias (261).

Una importante contribución a la dilucidación del mecanismo de acción

del Li^+ fue aportada por Allison y Stewart (262), quienes descubrieron que el tratamiento de ratas con este catión disminuía la concentración de mio-inositol libre en la corteza cerebral. Estudios posteriores revelaron que esta disminución estaba asociada a un aumento en la concentración de inositol-1-fosfato resultante de la inhibición de la enzima inositol-1-fosfato fosfatasa (177,178,263-265). Sobre la base de estas observaciones se ha sugerido que el Li ejercería su acción terapéutica por interferencia con el metabolismo de fosfoinosítidos que, se sabe, juegan un importante rol en la función sináptica (265).

Las dos fuentes de inositol-1-fosfato celular son la glucosa (266) y la ruptura de fosfoinosítidos. Al inhibir la enzima Ins-P-fosfatasa, el Li^+ puede inhibir la síntesis de fosfoinosítidos por una limitación en la disponibilidad de mio-inositol necesario para la síntesis de Ptd-Ins (ver Figura VI).

La única otra fuente de mio-inositol proviene del transporte activo a partir de fluidos extracelulares y este mecanismo está bastante limitado en el cerebro (267) y los nervios periféricos (268).

De esta manera, el tejido nervioso es particularmente susceptible a limitaciones en el suministro de mio-inositol y el tratamiento con Li^+ provocará una disminución en la concentración de Ptd-Ins.

Berridge y col. observaron que células de cerebro y glándula salival no estimuladas o estimuladas con bajas concentraciones de serotonina acumulaban muy poco (^3H)Ins-1-P por efecto del Li^+ , mientras que la acumulación aumentaba dramáticamente a medida que se incrementaba la concentración de agonista (178). Estas observaciones los llevaron a proponer que el Li^+ ejercería su acción terapéutica interfiriendo selectivamente con la actividad de aquellas neuronas cuyos receptores están anormalmente estimulados. Es en dichas células donde la demanda de mio-inositol para la resíntesis de Ptd-Ins necesaria para mantener la función de los receptores debe ser necesariamente mayor. El tratamiento prolongado con Li^+ conduciría a una progresiva disminución en la concentración de Ptd-Ins y esto llevaría en suma a una desensibilización de los receptores que funcionan a través de la hidrólisis de fosfoinosítidos (178). Hay evidencias que sugieren que una de las causas que llevan a la depresión es una sensibilidad aumentada de los receptores cerebrales de serotonina (269). Por un mecanismo similar, el Li^+ puede inhibir también la transmisión sináptica.

tica mediada por receptores muscarínico-colinérgicos, α -adrenérgicos, histaminérgicos y peptidérgicos (178). Existen evidencias de que cierta clase de receptores dopaminérgicos, cuya función alterada ha sido vinculada con las psicosis-maniaco-depresivas (270), también están asociados al metabolismo de fosfoinosítidos (271).

III. BIOSINTESIS DE Ptd-dCMP EN CELULAS EUCARIOTICAS.

III.1. Antecedentes inmediatos.

Con el objeto de estudiar los procesos bioquímicos que conducen a la transformación y división celular, Mordoh y Fridlender desarrollaron un sistema de permeabilización que les permitiera comparar la capacidad de síntesis de DNA de linfocitos enteros y núcleos aislados utilizando los mismos precursores radioactivos.

Estos experimentos resultaban imprescindibles para aclarar observaciones previas que indicaban que los núcleos aislados de linfocitos quiescentes o estimulados a proliferar con PHA eran igualmente capaces de incorporar deoxinucleósidos-trifosfatos (dNTPs) al DNA (272). Estas observaciones sugerían que la poca disponibilidad de precursores apropiados en los linfocitos no estimulados podría constituir un paso limitante para la síntesis de DNA. Sin embargo, dado que la velocidad de síntesis en los núcleos aislados de linfocitos estimulados era muy inferior a la obtenida in vivo, también existía la posibilidad de que dichos núcleos tuvieran una menor capacidad de síntesis. Este hecho podría ser atribuido principalmente a dos causas: la pérdida o inactivación durante el aislamiento de algunas sustancias intranucleares requeridas para la replicación del DNA o la falta de factores citoplasmáticos que deberían ser continuamente requeridos para el mismo fin. De esta manera, el desarrollo de un sistema que les permitiera medir la incorporación de dNTPs a células enteras era esencial para intentar contestar estos interrogantes.

El sistema de permeabilización consistía en una solución hipotónica que contenía: HEPES pH 7,9, Cl_2Mg , Cl_2Ca , ATP-Mg, ditiotreitolo y los dNTPs. En estas condiciones, las células podían incorporar los dNTPs a la fracción ácido-insoluble aunque perdían la capacidad de utilizar los deoxinucleósidos para la síntesis de DNA.

En el curso de estos experimentos, Mordoh y Fridlender observaron que el $(^3H)dCTP$ se incorporaba a las células en mayor proporción que el resto de los $(^3H)dNTPs$. La radioactividad recuperada en el precipitado ácido insoluble era mayor en las células estimuladas que en las no estimuladas. Esta reacción necesitaba ATP, Ca^{2+} y Mg^{2+} para obtener una máxima incorporación (Figura X).

Investigando el destino del $(^3H)dCTP$, los autores pudieron demostrar que además de incorporarse al DNA, lo hacía a un producto soluble en solventes

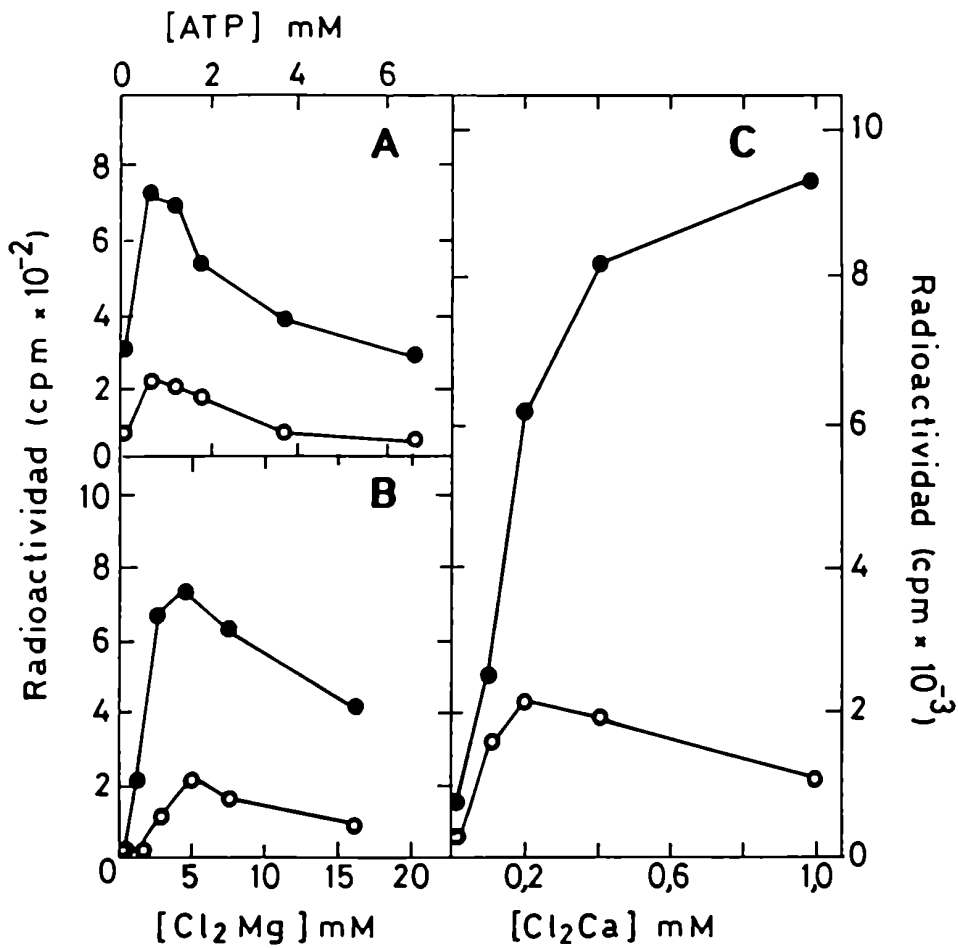


Figura X: Efecto de distintos agregados sobre la incorporación de (³H)dCTP a la fracción ácido-insoluble de linfocitos humanos permeabilizados.

● - ● linfocitos estimulados 72 h con PHA.
 ○ - ○ linfocitos sin estimular.

orgánicos (24).

Dicho compuesto extraído de linfocitos permeabilizados fue más tarde caracterizado por Medrano y Mordoh como fosfatidil-dCMP (25,26). En efecto, la incubación de células intactas con (¹⁴C)glicerol y su posterior permeabilización para permitir la entrada de (³H)dCTP, condujo a la obtención de un producto doblemente marcado que, por hidrólisis alcalina producía (³H)dCMP y (¹⁴C)glicerol-3-fosfato.

El Ptd-dCMP se acumulaba en linfocitos permeabilizados; sin embargo cuando se incubaban células intactas con (³H)deoxicitidina (dCyd) como precursor se recuperaba muy poca radioactividad en la fase orgánica.

Buscando compuestos que modificaran el metabolismo de fosfolípidos, se encontró que la CPZ estimulaba enormemente la incorporación de (³H)dCyd a la fase orgánica. Diversos procedimientos analíticos permitieron concluir que el compuesto sintetizado por las células intactas en presencia de CPZ era idéntico al sintetizado por las células permeabilizadas (26,27).

Como vimos en la sección I.4., la CPZ redirige la síntesis de glicerolípidos ácidos por inhibición de la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa. En estas condiciones se acumula Ptd-A y el resto de los fosfolípidos que derivan de él.

Si bien Ter Schegget y col. habían encontrado que mitocondrias de hígado de rata podían utilizar dCTP para la síntesis de Ptd-dCMP y que éste podía servir como sustrato para la síntesis de Ptd-Gli (22), los experimentos arriba mencionados constituyen la primer evidencia de síntesis de Ptd-dCMP en células eucarióticas intactas.

Los resultados obtenidos con CPZ y el hecho de que el Ptd-A agregado exógenamente a linfocitos intactos favorecía la síntesis de Ptd-dCMP permitió sugerir que la siguiente reacción tenía lugar:



La escasa detección de Ptd-dCMP en células intactas y su acumulación en células permeabilizadas sugerían, además, que el compuesto tenía un alto recambio ("turnover") y que al permeabilizar se perdían ciertos factores necesarios para su utilización; de esta manera el Ptd-dCMP se acumulaba.

En apoyo a esta hipótesis se observó que el agregado de inositol a

células permeabilizadas provocaba una rápida desaparición del Ptd-dCMP acumulado (Figura XI).

Un efecto similar pero de menor magnitud se obtenía si se incubaban linfocitos intactos con CPZ en presencia o ausencia de inositol.

Por otra parte, el agregado de ácido araquidónico estimulaba la síntesis de Ptd-dCMP (26,27) y en experimentos de doble marcación se demostró que éste se incorporaba a Ptd-dCMP y Ptd-Ins (26).

Estos experimentos sugerían, pero no demostraban que el Ptd-dCMP podía ser utilizado como precursor para la síntesis de Ptd-Ins.

III.2. Objetivos de la investigación.

En base a los antecedentes arriba mencionados, existían numerosos puntos que debían ser investigados. Entre ellos se cuentan:

- 1) Precisar el mecanismo de estimulación de la CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP.
- 2) Aportar información sobre la identidad de las enzimas responsables de la síntesis de Ptd-CMP y Ptd-dCMP. Con este propósito se utilizaron agentes que afectan dichas reacciones.
- 3) Determinar el rol del Ptd-dCMP en la biosíntesis de Ptd-Ins y otros fosfolípidos acídicos, así como tratar de establecer una comparación con el conocido rol del Ptd-CMP en esta vía metabólica.
- 4) Investigar las alteraciones de la síntesis del Ptd-dCMP en el curso de la diferenciación celular.
- 5) Teniendo en cuenta que uno de los sustratos para la síntesis del Ptd-dCMP es el dCTP (sustrato también para la síntesis de DNA) se decidió:
 - a) Investigar el efecto del agente antineoplásico arabinosil-citosina (ara-C) sobre la síntesis del liponucleótido.
 - b) Detectar si existe alguna interrelación entre la síntesis del Ptd-dCMP y la de DNA.

Para llevar a cabo estos estudios se utilizaron distintos tipos celulares: timocitos de ratón, por su fácil disponibilidad y por su característica de estar en activa proliferación cuando se los extrae del timo,

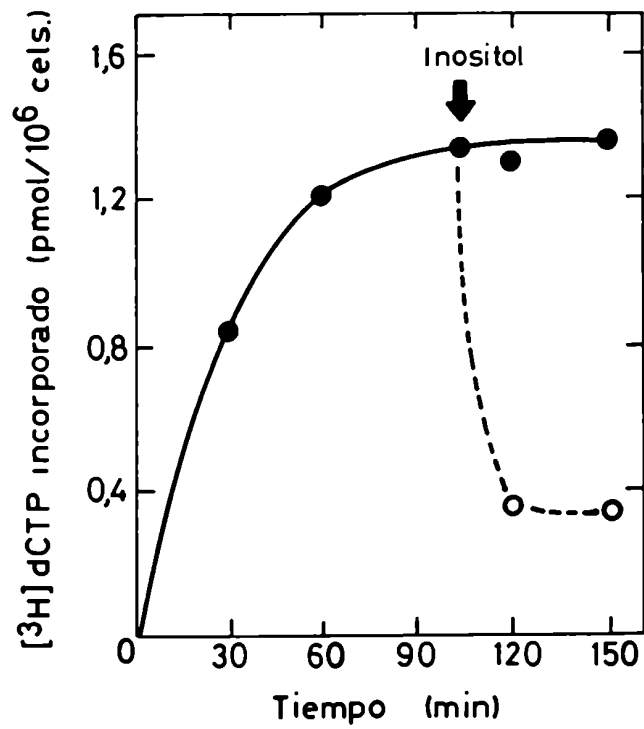


Figura XI: Efecto del inositol sobre Ptd-dCMP sintetizado en células permeabilizadas.

células de Sarcoma 180 variedad ascítica, mieloblastos de pacientes leucémicos y una línea celular derivada de un paciente con leucemia promielocítica aguda (HL-60).

MATERIALES Y METODOS

1. Células y líneas celulares utilizadas

1.1. Timocitos de ratón.

Para la obtención de estas células se utilizaron ratones BALB/c de 13 a 19 días de edad. Luego de sacrificar el animal con éter y extraer el timo, éste fue infiltrado con Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM), suplementado con Hepes 20 mM (pH 7,2), glutamina 1 mM, penicilina 10 U/ml, estreptomina 100 µg/ml (MEM-HEPES) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Los timocitos fueron recogidos en 10 ml de medio de cultivo, centrifugados a 2.000 rpm durante 10 min y resuspendidos en el mismo medio a una concentración de $10-20 \times 10^6$ cél./ml.

1.2. Sarcoma 180 variedad ascítica.

Este tumor experimental fue crecido en la cavidad peritoneal de ratones Swiss adultos. Los animales fueron inoculados intraperitonealmente con 2×10^6 células en un volumen de 0,2 ml de una solución salina de buffer de fosfatos (PBS: ClNa 5 g/l; ClK, 0,2 g/l; PO₄HNa₂ 1,1 g/l; Cl₂Mg. 6 H₂O 0,1 g/l). Al cabo de 7 a 10 días el ratón fue anestesiado y el derrame ascítico, que contenía células en crecimiento logarítmico, fue recogido por paracentesis. Las células fueron diluídas inmediatamente con MEM-HEPES y lavadas dos veces con dicho medio de cultivo para eliminar el líquido ascítico. Finalmente, las células se resuspendieron en MEM-HEPES a una concentración de $6-12 \times 10^6$ cél./ml.

1.3. Mieloblastos de pacientes leucémicos.

Estas células fueron purificadas a partir de muestras de sangre de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Las muestras, ya sea de sangre periférica o de médula ósea, fueron suministradas por la Academia Nacional de Medicina, donde se seleccionaron los pacientes que no hubieran recibido tratamiento quimioterápico previo. En el cuadro siguiente se detalla la nómina de pacientes estudiados indicando sexo, edad y muestra remitida. Cabe señalar que en dos casos (no incluidos en la tabla), las médulas óseas fueron aplásicas, recuperándose insuficiente cantidad de mieloblastos para su estudio.

Paciente	Sexo	Edad	Muestra remitida
1) PT	M	5	Sangre periférica
2) SC	M	53	Médula ósea
3) SMO	M	39	Médula ósea
4) CR	M	8	Médula ósea
5) LC	F	4	Médula ósea

Para el aislamiento de los mieloblastos se procedió de la siguiente manera: aproximadamente 2 ml de médula ósea o 10 ml de sangre periférica heparinizadas fueron diluídas 1/3 con solución fisiológica (NaCl 0,15 M) y sembrados sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque ($\rho = 1,077$). Luego de centrifugar en una centrífuga clínica Sorvall a 2.000 rpm durante 40 min, se tomaron las células de la interfase y se lavaron dos veces con solución salina de Hank's. Finalmente, las células fueron resuspendidas en MEM-HEPES, al que se le agregó 10% FBS. La concentración de células utilizada en los experimentos fue de 6×10^6 cél./ml para los pacientes 1, 4 y 5 y 10×10^6 cél./ml para los pacientes 2 y 3.

1.4. Línea celular HL-60.

Esta línea se estableció en 1977 (273) y deriva de un paciente con leucemia promielocítica. Las células crecen en suspensión y se las cultivó en Medio Esencial Mínimo (MEM α) con 10% de FBS en una estufa a 37°C, gaseada con 5% CO₂. Se las diluyó dos veces por semana con medio fresco para mantener el cultivo en crecimiento logarítmico. El tiempo de generación de éstas células es de aproximadamente 24 h. Usualmente, la concentración de células utilizadas fue de 4×10^6 cél./ml.

2. Inducción de diferenciación de HL-60 a neutrófilos maduros.

Los cultivos se iniciaron con $2,5 \times 10^5$ cél./ml, a los que se agregó ácido retinoico 1 mM disuelto en alcohol absoluto (274). La concentración final usada fue de 1 μ M. Alternativamente, se indujo diferenciación con retinal 10 μ M o DMSO 160 mM (275). Las células fueron incubadas a 37°C-5% CO₂ durante 6 días, diluyéndolas convenientemente con medio de cultivo con inductor al tercer día de inducción. Todas las manipulaciones se realizaron en ambiente de penumbra para evitar la fotodescomposición del inductor (ácido retinoico y retinal).

Con el objeto de verificar la presencia de células diferenciadas, se realizó una coloración de Wright-Giemsa (criterio morfológico) y un ensayo funcional que consiste en estimular la producción intracelular de anión superóxido (O₂⁻) característica de neutrófilos maduros. El anión superóxido se detecta por su capacidad de reducir el nitrobluetetrazolium (NBT), formando un precipitado oscuro de formazán.

2.1. Ensayo de NBT.

El ensayo se realizó con 5×10^5 células resuspendidas en 0,5 ml de PBS que contenía 1 mg/ml de NBT y 1 μ g de tetradecanoil forbol acetato (TPA) como estimulante (276). Las células se incubaron durante 25 min a 37°C, al cabo de los cuales se extendieron sobre un portaobjetos. Una vez secas al aire y fijadas con acetona-formaldehído (10 min a -20°C), se colorearon con Wright-Giemsa. Las células positivas son pequeñas, de núcleo picnótico, segmentado o en cayado y presentan granulaciones negro-azuladas en su citoplasma, correspondientes a los depósitos de formazán. Las células negativas presentan la morfología típicamente blástica, son células más grandes, con núcleo redondeado donde es posible visualizar el nucleolo. Su citoplasma presenta granulaciones azurófilas y no se ven depósitos de formazán.

La observación microscópica se realizó con un microscopio Zeiss modelo Standard, utilizando un objetivo de inmersión (100 x).

2.2. Coloración de Wright-Giemsa.

Se resuspendieron 10×10^6 células a colorear en 0.1 ml de PBS y se extendieron en un portaobjetos limpio y desengrasado. La fijación se realizó por inmersión de los preparados en una solución de acetona-formaldehído, 3

gotas cada 50 ml de acetona (277), durante 10 min. a -20°C . La coloración de Wright se realizó por inmersión de los preparados en una solución de colorante de Wright (0,25% en metanol) diluido 1:3 en buffer fosfato de potasio 0,06 M pH 6,8. Al cabo de aproximadamente 4 min los preparados se lavaron con agua de la canilla y se sumergieron en colorante de Giemsa (Lowens) diluido al 4% en agua por otros 4 min. Al finalizar la coloración se lavó nuevamente con agua corriente.

3. Preparación de fracciones subcelulares.

3.1. Aislamiento y purificación de núcleos.

Se utilizó el método descrito por Fridlender y col. (272) con algunas modificaciones. Se partió de 6×10^8 células de Sarcoma 180, obtenidas como se describió en el punto 1.2. Después de lavarlas dos veces con PBS, las células se resuspendieron en 10 ml de buffer fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5, Cl_2Mg 10 mM y se dejaron 20 min a 4°C . Luego se homogeneizó con 40 golpes de homogeneizador Dounce y se controló la ruptura celular al microscopio óptico. Se procedió luego a centrifugar a $600 \times g$ en una centrífuga refrigerada Sorvall, (modelo RC2B) durante 10 min, y el pellet se resuspendió en igual volumen de una solución que contenía buffer fosfato de potasio 1 mM (pH 7,4), Cl_2Mg 1 mM, sacarosa 0,32 M y 0,2% de Tritón N-101 (buffer Tritón). La fracción se dejó durante 15 min a 4°C , se homogeneizó con 20 golpes de Dounce y se centrifugó a $600 \times g$ durante 10 min. Este procedimiento tiene por objeto eliminar porciones de retículo endoplásmico que quedan adheridos a los núcleos cuando se aíslan por este método. En algunos casos, cuando estos no aparecen "limpios", se repite la operación una vez más, acortando el tiempo de contacto con el detergente. De esta manera se evita dañar la membrana nuclear. Luego del tratamiento con buffer Tritón, la fracción nuclear se lavó con una solución que contenía buffer fosfato de potasio 1 mM (pH 7,0), Cl_2Mg 1 mM y sacarosa 0,32 M.

3.2. Aislamiento de microsomas.

Se utilizó el método descrito por Takenawa y col. (86). Se partió de 4×10^8 células de Sarcoma 180, las cuales fueron resuspendidas en 4 volúmenes de ClK 0,15 M y homogeneizadas con un disruptor celular "Ultraturrax". El homogenato fue centrifugado a $500 \times g$ durante 10 min para eliminar restos celulares y núcleos, y luego a $10.000 \times g$ durante 15 min para sedimentar la fracción mitocondrial. El sobrenadante de $10.000 \times g$ fue centrifugado a $100.000 \times g$ durante 60 min en una ultracentrífuga Spinco. El pellet obtenido luego de esta centrifugación fue resuspendido en Sacarosa 0,25 M y recentrifugado a $100.000 \times g$ durante 60 min. El pellet resultante fue resuspendido en sacarosa 0,25 M a una concentración de proteínas de 3 mg/ml y fue utilizado como "fracción microsomal". Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C . Los microsomas fueron congelados a -70°C hasta el momento de usar.

4. Incorporación de precursores radioactivos a distintos sistemas celulares.

4.1. Medición del transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$.

Usualmente, se resuspendieron $25-30 \times 10^6$ células en 1 ml de PBS-glucosa (1 mg/ml) y se incubaron durante 30 min a 0°C con dCyd $1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ (act. esp. 27,7 Ci/mmol) y distintos agregados. La incubación se detuvo por dilución de la marca con 4 ml de PBS frío. Luego de centrifugar durante 10 min a 2.000 rpm en centrífuga refrigerada, las células fueron lavadas dos veces con 5 ml de PBS frío. Los pellets fueron finalmente solubilizados con Soluene-350 (Packard) y contados con 10 ml de Tolueno-Omnifluor en un contador de centelleo líquido Beckman LS 8100.

4.2. Incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y $(^3\text{H})\text{Cyd}$ a células intactas. Determinación de la radioactividad incorporada a la fase orgánica y a la fase ácido insoluble.

Se resuspendieron 0,5 ml de células en el medio de cultivo y a la concentración indicada en el punto 1 de esta sección ("Células y líneas celulares utilizadas") y se incubaron a 37°C con 3 a 5 μCi de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ ó $(^3\text{H})\text{Cyd}$ (act.

esp. 27 Ci/mmol) durante distintos tiempos con los agregados que se describen al pie de cada figura. La incorporación de los precursores se detuvo por enfriamiento y centrifugación a 2.000 rpm en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2B. El pellet se resuspendió en 0,7 ml de H₂O; después de mezclar y dejar durante 5 min en hielo se agregó 0,1 ml de pirofosfato de sodio 0,1 M, 0,2 ml de DNA desnaturalizado por calor (2,5 mg/ml) y 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Se centrifugó en frío a 4.000 rpm durante 10 min y el precipitado se lavó 2 veces con TCA 5%-pirofosfato de sodio 60 mM. La extracción de lípidos del precipitado se realizó con 0,5 ml de cloroformo/metanol (1:1), ClH 0,1 N (278) calentando durante 3 min a 56°C. Luego de centrifugar durante 15 min en una centrífuga clínica a 3.000 rpm, el sobrenadante fue transferido a un vial. Los primeros experimentos de esta tesis (en timocitos de ratón) fueron realizados midiendo la radioactividad incorporada a la fase orgánica por transferencia de ésta a 10 ml de solución de Bray. Posteriormente se determinó que el secado de la fase orgánica en un vial y el subsiguiente agregado de 10 ml de Tolueno-Omnifluor mejoraban la eficiencia de la medición. En consecuencia, este último método fue utilizado en la mayoría de los experimentos realizados posteriormente.

Cuando fue necesario determinar la incorporación de precursores al DNA o RNA, el precipitado remanente de la extracción lipídica fue disuelto en 0,5 ml de HONa 0,2 N, se agregó 1 ml de H₂O y se reprecipitó con 0,25 ml de ácido perclórico 12,5%. Se centrifugó en frío a 4.000 rpm durante 10 min y el precipitado se solubilizó con Soluene-350 y se transfirió a un vial con 8 ml de Tolueno-Omnifluor; el tubo fue lavado dos veces con 1 ml de solución centelleadora y los lavados se transfirieron al vial.

La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido Beckman LS 8100.

4.3. Incorporación de (³H)dThd a células intactas.

Usualmente 3×10^6 células fueron resuspendidas en 0,5 ml de medio de cultivo e incubadas con 0,5 μ Ci de (³H)dThd (act. esp. 20 Ci/mmol) durante 30 min a 37°C. Luego de centrifugar en frío durante 10 min a 2.000 rpm, se siguió exactamente el mismo procedimiento descrito en el punto anterior, es decir, extracción de lípidos y determinación de la radioactividad en la fracción

ácido-insoluble.

4.4. Incorporación de (³H)dCTP a células permeabilizadas.

Con el objeto de medir la incorporación de (³H)dCTP, las células fueron permeabilizadas con la siguiente mezcla hipotónica: Hepes 50 mM pH 7,2, Cl₂Mg 5 mM, ditiotreitól 1 mM, ATP - Mg²⁺ 0,5 mM, Cl₂Ca 0,2 mM y 3,3 μM (³H)dCTP (3.000 cpm/pmol). Usualmente la concentración de células fue de 3 a 6 x 10⁶ cél/300 μl de mezcla de permeabilización. Cuando fue necesario estimar la síntesis de DNA se agregó a la mezcla dTTP, dATP y dGTP 66 μM. Las células fueron incubadas a 37°C con los agregados que se describen en cada experimento y al finalizar la incubación fueron centrifugadas en frío. La determinación de la radioactividad incorporada a la fase orgánica y a la fracción ácido insoluble se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para las células intactas (punto 4.2.).

Cuando se midió la incorporación de (³H)CTP se agregó 3,4 μM (³H)CTP (act. esp. 2.950 cpm/pmol).

4.5. Incorporación de (³H)dCTP a núcleos.

Se resuspendieron 6 x 10⁶ núcleos de Sarcoma 180 en 300 μl de mezcla de permeabilización completa con los agregados que figuran en cada experimento. Particularmente el ácido fosfatídico fue agregado como suspensión acuosa sonificada con un sonicador Ultrasonic Modelo W-140.

La incubación de los núcleos se realizó a 37°C. Al finalizar el experimento, los mismos se centrifugaron en frío y los pellets nucleares fueron procesados para extraer los lípidos y el DNA de la misma manera como se realizó con las células intactas (punto 4.2.).

4.6. Incorporación de (³H)ara-c a células intactas.

Se resuspendieron 14 x 10⁶ timocitos en 0,5 ml de MEM-HEPES que contenía 10% FBS dializado y 5 μCi de (³H)ara-C (act. esp. 15 Ci/mmol). Las células se incubaron en presencia o ausencia de clorpromazina (CPZ) 60 μM durante distintos tiempos a 37°C. La incorporación de marca se detuvo por centrifugación en frío a 2.000 rpm. La extracción de los lípidos se realizó como se describió en

el punto 4.2.

4.7. Incorporación de (³H)Ins a células intactas.

Se resuspendieron 10 - 16 x 10⁶ timocitos en 0,5 ml de PBS que contenía Cl₂Ca 1 mM y Cl₂Mg 1 mM y se incubaron a 37°C con 5 µCi de (³H)Ins (act. esp. 3,9 Ci/mmol) en presencia o ausencia de CPZ 60 µM. Al finalizar la incubación las células se centrifugaron y se extrajeron los lípidos como se describió en el punto 4.2.

5. Identificación de (³H)dCMP en los sobrenadantes de incubación.

La identificación de (³H)dCMP en los sobrenadantes de incubación fue realizada por cromatografía descendente en papel Whatman N° 1 usando como solvente ácido acético 1M/acetato de amonio 1M pH 7,4/etanol (13:2:37,5). Los sobrenadantes fueron concentrados con aire y sembrados con standards internos de dCMP, dCDP y dCTP (10 mM). Estos fueron posteriormente detectados por iluminación con luz ultravioleta usando una lámpara "Mineralite". La radioactividad en la tira fue localizada utilizando un radiocromatógrafo Packard, modelo 7201. Para cuantificar la radioactividad se cortó el papel en la zona que co-cromatografió con el dCMP usado como standard y se contó con 3 ml de Tolueno-Omnifluor en el contador de centelleo líquido.

6. Identificación y purificación de Ptd - (³H)dCMP.

6.1. Identificación cromatográfica de Ptd - (³H)dCMP proveniente de timocitos intactos y permeabilizados.

Se resuspendieron 50 x 10⁶ timocitos en 3 ml de MEM-HEPES 10% FBS y se incubaron en presencia o ausencia de CPZ 60 µM y 30 µCi de (³H)dCyd.

La misma cantidad de timocitos fue permeabilizada con 3 ml de mezcla de permeabilización ya descrita y se incubaron en presencia o ausencia de CPZ 60 µM y 30 µCi de (³H)dCTP. Todas las células fueron incubadas durante 30 min a 37°C.

Luego de extraer los lípidos como se describió en el punto 4.2. pero utilizando 2 ml de cloroformo/metanol 1:1 ClH 0,1N, las fases orgánicas fueron

fraccionadas en alícuotas de 5.000 cpm, secadas bajo nitrógeno y guardadas a -20°C hasta el momento de cromatografiar.

La cromatografía se realizó con placas de Silicagel G (Merck) activadas 30 min a 100°C . Se usaron dos mezclas de solventes:

I) cloroformo/metanol/ác. acético/agua 50:25:7:3

II) cloroformo/metanol/ác. acético/agua 25:2:9:1

La cantidad estimada de producto que debía sembrarse se resuspendió en un mínimo volumen de cloroformo/metanol 1:1 C1H 0,1 N. El desarrollo de la cromatografía duró aproximadamente 3 h al cabo de las cuales las placas se dejaron secar al aire. La identificación de los compuestos radioactivos se realizó dividiendo la placa en segmentos de 1 cm, cortándolos e introduciéndolos dentro de viales que contenían 10 ml de solución centelleadora de Bray. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Isocap-300, Nuclear Chicago.

6.2. Separación cromatográfica de Ptd - $(^3\text{H})\text{dCMP}$ y Ptd - $(^3\text{H})\text{CMP}$.

Se resuspendieron 30×10^6 células de Sarcoma 180 en 1,5 ml de mezcla de permeabilización ya descrita, conteniendo CPZ $60 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$ $(^3\text{H})\text{dCTP}$ (4.000 cpm/pmol) o $3 \mu\text{M}$ $(^3\text{H})\text{CTP}$ (4.000 cpm/pmol) y se incubaron durante 1 h a 37°C .

Luego de extraer los lípidos como en el punto anterior las fases orgánicas fueron evaporadas a sequedad con N_2 y cromatografiadas en placas de Silicagel G (Eastman Kodak) impregnadas con ácido bórico 0,4 M. El solvente de corrida que se usó fue cloroformo/metanol/agua/amoníaco 70:38:2:8.

Este sistema permite la completa separación de los dos liponucleótidos (22) ya que el anión borato se compleja con hidroxilos vecinos reteniendo el Ptd-CMP en el origen pero no el Ptd-dCMP. El pico correspondiente a Ptd - $(^3\text{H})\text{dCMP}$ fue raspado de la sílica y eluido con cloroformo/metanol/agua 1:1:0,3. Esta fracción fue llevada a sequedad con N_2 y guardada a -20°C hasta el momento de usar.

Cuando se quiso cuantificar la cantidad de ambos liponucleótidos, se siguió un protocolo similar con las siguientes variantes:

1°) Se hicieron 2 extracciones con 1 ml de cloroformo/metanol 1:1, C1H 0,1 N para aumentar el rendimiento de la extracción.

- 2°) La cromatografía se realizó en ausencia de ácido bórico con el objeto de purificar el Ptd-CMP, que de la otra forma sale contaminado con los lípidos que quedan en el origen.
- 3°) Los picos correspondientes a Ptd-(³H)CMP y Ptd-(³H)dCMP se eluyeron como se describió arriba y se llevaron a sequedad con N₂. Para determinar el contenido de fósforo, las muestras se resuspendieron en Tritón X-100 y se procedió como se describe en el punto 9.4.

7. Síntesis de fosfatidil-inositol en la fracción microsomal.

7.1. Condiciones de incubación.

Se incubaron 0,1 ml de microsomas, obtenidos como se describió en el punto 3.2., en 0,5 ml de un medio que contenía buffer glicil-glicina 50 mM pH 8,6, Cl₂Mg 20 mM, (³H) mio-inositol 150 μM (act. esp. 33 Ci/mol) y Tritón X-100 0,1%, de acuerdo con el método de Takenawa y col. (86). Cuando correspondía, se agregó Ptd-(³H)dCMP purificado, resuspendido en Tritón X-100 1% y sonificado con el objeto de obtener una dispersión homogénea. Luego de 30 min a 37°C la reacción se detuvo por el agregado de 1,88 ml de cloroformo/metanol 1:2 y los lípidos fueron extraídos por el método de Hajra y col. (279), modificado por Brindley y col. (107). Brevemente, a la fase cloroformo-metanólica se le agregó 0,623 ml de cloroformo y 0,775 ml de H₂O; después de centrifugar se lavó la fase inferior con 2 ml de una fase superior sintética que contenía: 50 ml de cloroformo, 50 ml de metanol, 20 ml de H₂O, 25 ml de ClK 2 M - PO₄H₃ 0,2 M, 2 ml de ClH 12 N, 0,16 ml de glicerol y 50 mg de glicerol-3-fosfato. El lavado se repitió dos veces más y posteriormente se midió por conteo de una alícuota en Tolueno-Omnifluor, la radioactividad incorporada a la fase inferior lavada.

7.2. Identificación cromatográfica del producto de reacción.

Los extractos lipídicos de la reacción, llevados a sequedad con N₂ y resuspendidos en el mínimo volumen de cloroformo, fueron sembrados en una placa de Silicagel G (Eastman Kodak) impregnada con ácido bórico 0,4 M y cromatografiados con cloroformo/metanol/agua/amoníaco 70:38:2:8. Se sembró tam-

bién un standard externo de fosfatidil-inositol que fue posteriormente revelado con ácido fosfomolibdico 4% en etanol. El desarrollo de color se obtuvo por calentamiento de la placa a 80°.

8. Determinación de la viabilidad celular.

8.1. Método de exclusión del azul tripan.

El método se basa en la capacidad de células viables de excluir el colorante azul tripan. Las células muertas, por tener alteraciones en la membrana plasmática se vuelven permeables al colorante, tiñéndose de color azul.

El método consiste en incubar 0,3 ml de células (5×10^5 cel./ml) con 0,1 ml de azul tripan (0,4% en PBS). Se deja 5 min a temperatura ambiente y se cuenta en un hemocitómetro el número total de células y el número de células vivas (no teñidas).

El microscopio utilizado fue Zeiss, modelo Standard RA.

8.2. Método de formación de colonias en agar semisólido.

El método se basa en que las células viables de un cultivo proliferante son capaces de formar colonias cuando se las cultiva en un medio semisólido. Cualquier factor que afecte la capacidad de reproducción, llevará a la muerte celular y por lo tanto a una reducción en el número de colonias formadas.

Este método fue usado para estudiar el efecto de la CPZ sobre la línea celular HL-60.

El ensayo se realizó en cajas de plástico tipo Falcon de 35 x 10 mm. Se preparan dos soluciones:

- a) Capa inferior: Agar Difco 3% diluido al 0,5% con MEM α -10% FBS.
- b) Capa superior: Agar Difco 3% diluido al 0,35% con MEM α -10% FBS al que se agregan las células (1×10^5 cél/0,1 ml).

El ensayo se inició incubando células HL-60 en crecimiento exponencial (4×10^5 cél/ml) con distintas concentraciones de CPZ (0 a 10 mM) durante 1 h a 37°C en estufa gaseada (95% aire - 5% CO₂). Paralelamente se preparó la capa

inferior y se colocó 1 ml por placa. Se dejó solidificar. Cuando terminó la incubación, las células se lavaron con PBS y se las resuspendió en MEM α -10% FBS. Seguidamente se preparó la capa superior, a la que se agregaron las células; se plaqueó 1 ml de capa superior conteniendo las células sobre la capa inferior (1×10^5 células) y una vez controlada al microscopio la ausencia de grumos, se las puso a crecer en la estufa gaseada. Al cabo de 10-14 días se contaron las colonias de más de 30 células. Para ello se utilizó un microscopio Wild de contraste de fases, invertido.

9. Métodos varios.

9.1. Tratamiento de los productos de incubación con DNAsa.

Se incubaron 35×10^6 timocitos, resuspendidos en 2,5 ml de MEM-HEPES-10% FBS con CPZ 60 μ M y 5 μ Ci de (3 H)dCyd durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación las células fueron lavadas con PBS, resuspendidas en 2,5 ml de Tris-ClH 50 mM pH 7,5 y sonicadas durante 20 seg a intensidad 5 con un homogeneizador Politrón (Kinematica-Suiza). Luego de la sonicación, la muestra fue dividida en dos fracciones de 1,25 ml. Una de ellas recibió Cl₂Mg 10 mM y 100 μ g/ml DNAsa I mientras que la otra recibió un volumen equivalente de agua. Ambas fracciones fueron incubadas durante 3 h a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 0,2 ml de DNA desnaturalizado por calor (2,5 mg/ml) y 5 ml de TCA 10%. La extracción de lípidos y determinación de la radioactividad en la fase orgánica y en la fracción ácido-insoluble se realizó como se describió en el punto 4.2. de esta sección.

9.2. Incubación de células con anticuerpos monoclonales.

Se permeabilizaron 2×10^6 células HL-60 con 0,3 ml de la mezcla descripta en el punto 4.4 a la que se agregó GTP 1 mM. Luego de 20 min a 4°C se agregó el anticuerpo y las células fueron rápidamente congeladas y descongeladas con N₂ líquido verificándose al microscopio la lisis celular. Al cabo de 15 min a 4°C se agregó DTT 1 mM (que fue omitido en la primera etapa) y 3 μ M (3 H)dCTP y se incubó 30 min a 37°C. El material lipídico se obtuvo como se describió en el punto 4.2.

Los anticuerpos utilizados fueron obtenidos de rata. El anti-p21 (280) fue gentilmente obsequiado por el Dr. Mariano Barbacid y el anti-HLA usado como control por el Dr. Oscar Burrone (281).

9.3. Determinación de la concentración de proteínas.

Se utilizó el método de Lowry y col. (282), usando seroalbúmina bovina como solución de referencia.

9.4. Determinación del contenido de fósforo de fosfolípidos.

Se utilizó el método de Bartlett (283) que se basa en una modificación del método de Fiske-SubbaRow para aumentar la sensibilidad de la reacción.

Las muestras se mineralizaron con 0,3 ml de SO_4H_2 10N calentando en estufa a 150-160°C durante 3 h, luego se agregaron dos gotas de H_2O_2 y se volvió a calentar 1,5 h. La reacción de color se realizó con 0,45 ml de H_2O , 0,4 ml de molibdato de amonio 2,5% y 50 μl del reactivo de Fiske-SubbaRow; se mezcló bien y se calentó en un baño de agua a 100°C durante 7 min con bolitas de vidrio cubriendo los tubos. La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 800 $\text{m}\mu$ utilizando un espectrofotómetro Coleman, Modelo 6/20.

Dado que las muestras venían resuspendidas en Tritón X-100, el mismo fue incluido en la curva de calibración. Esta se realizó utilizando un buffer de fosfatos 10 mM pH 7 (rango 0,02-0,1 μmol) que fue mineralizado junto con las muestras.

9.5. Preparación de DNA coprecipitante.

Se utilizó DNA de timo de ternera disuelto en Tris-ClH 50 mM pH 7,5 a una concentración de 2,5 mg/ml. Se llevó a 100°C durante 30 min y luego se enfrió rápidamente en baño de hielo.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

ESTUDIO DEL EFECTO DEL ARA-C SOBRE LA SINTESIS DEL Ptd-dCMP.

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en timocitos de ratón ya que es un sistema experimental de más fácil disponibilidad que los linfocitos humanos, se obtiene gran cantidad de células en poco tiempo y no es necesario estimular con mitógenos ya que las células que se extraen del timo están en activa proliferación. Sin embargo, para algunos experimentos se utilizaron además células de Sarcoma 180 en suspensión porque resultaron ser más apropiadas para los estudios que debían efectuarse.

Los primeros experimentos que se realizaron tuvieron el objeto de verificar que el sistema de los timocitos de ratón se comportaba de manera similar a como lo hacían los linfocitos humanos con respecto a la síntesis de Ptd-dCMP.

I.1. Síntesis de Ptd-dCMP en timocitos de ratón. Efecto de la CPZ.

En la Tabla 1 se observa que en timocitos intactos la síntesis de Ptd-dCMP, medida como incorporación de (³H)dCyd a la fase orgánica, sólo es detectada en presencia de CPZ. Un resultado similar se obtuvo cuando se midió la síntesis de Ptd-CMP, utilizando (³H)Cyd como precursor (Tabla 1 expto. 3). Cuando los timocitos son permeabilizados, es posible detectar síntesis de Ptd-dCMP a partir de (³H)dCTP en ausencia de CPZ. Al igual que en linfocitos, la droga tiene un efecto óptimo a una concentración de 60 μ M (Figura 1).

Con el objeto de verificar que la radioactividad remanente en el precipitado de TCA, luego de extraer los lípidos con cloroformo-metanol, es esencialmente DNA, se realizó una incubación con DNAsa de las células preincubadas con (³H)dCyd y CPZ. Como se observa en la Tabla 1, expto. 2, luego del tratamiento enzimático el 96% de la radioactividad remanente en el precipitado de TCA fue hidrolizada, mientras que la radioactividad recuperada en la fase orgánica disminuyó sólo un 14%. De esta manera se puede considerar que la contaminación cruzada del compuesto lipídico en el precipitado de TCA y del DNA en la fase orgánica es despreciable.

Un resultado interesante, que será analizado con mayor profundidad en el

Condiciones experimentales	Exp. N°	Precursor	Agregados	Extracción c/cloroformo-metanol	
				Extraíble	No extraíble
				cpm	
Células Intactas	1	(³ H)dCyd	Nada CPZ 60 μM	51 1.818	17.624 10.773
	2	(³ H)dCyd	CPZ 60 μM CPZ 60 μM; DNAsa I	13.300 11.427	52.535 1.991
	3	(³ H)Cyd	Nada CPZ 60 μM	27 1.292	44.445 18.441
Células permeabilizadas		(³ H)dCTP	Nada CPZ 60 μM	5.156 6.878	n.d. n.d.

Tabla 1: Síntesis de Ptd-dCMP en timocitos de ratón.

El experimento 1 se realizó incubando 10×10^6 timocitos en 0.5 ml de MEM-HEPES 10% FBS en presencia o ausencia de clorpromazina (CPZ) 60 μM y 5 μCi de (³H)dCyd. Las células fueron incubadas durante 30 min. a 37°C. La fracción extraíble y no extraíble con cloroformo-metanol se determinó como figura en Métodos.

El experimento 2 se realizó con 35×10^6 timocitos resuspendidos en 2.5 ml de Tris 50 mM pH 7.5 y a los que se agregó CPZ 60 μM y 5 μCi de (³H)dCyd. Luego de 30 min. a 37°C las células fueron sonicadas y divididas en dos fracciones, una de las cuales fue tratada con 100 μg de DNAsa I, como se indica en el punto 9.1. de Materiales y Métodos. Luego se obtuvieron las fracciones extraíble y no extraíble en cloroformo-metanol. El experimento 3 se realizó como el experimento 1, salvo que se usó como trazador (³H)Cyd. Se utilizaron 10×10^6 timocitos/ml y se incubó 60 min. a 37°C. El experimento con células permeabilizadas se realizó incubando 25×10^6 timocitos permeabilizados con 3,3 μM (³H)dCTP durante 30 min. como se describe en Métodos. n.d.: no determinado.

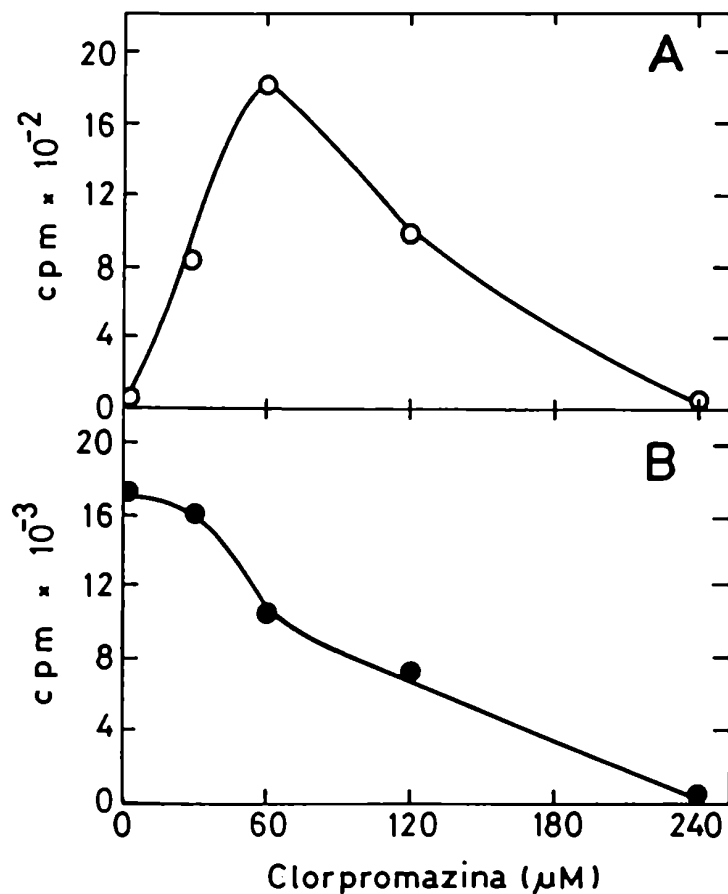


Figura 1: Efecto de cantidades variables de CPZ sobre la síntesis de fosfatidil-dCMP (A) y DNA (B).

Se resuspendieron 5×10^6 timocitos en 0,5 ml de MEM-HEPES 10% FBS y se incubaron con concentraciones variables de CPZ y 5 μ Ci de (³H)dCyd durante 30 min. a 37°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lisadas y el material lipídico (o - o) y el DNA (● - ●) fueron extraídos y medidos como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

capítulo III, es la inhibición en la síntesis de DNA y RNA provocada por la CPZ (Tabla 1 y Figura 1B).

I.2. Identificación de los compuestos lipídicos sintetizados en timocitos intactos y permeabilizados.

Como ya se presentó en la Introducción, en linfocitos humanos se demostró fehacientemente que el compuesto extraído con cloroformo-metanol de células intactas y permeabilizadas, marcadas con $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y $(^3\text{H})\text{dCTP}$ respectivamente, era Ptd-dCMP. Los siguientes experimentos se realizaron con el propósito de confirmar la similitud de los compuestos lipídicos sintetizados por timocitos intactos y permeabilizados en presencia y ausencia de CPZ. Para ello se cromatografiaron las fases orgánicas en placas de Silicagel G utilizando dos sistemas de solventes distintos. Como se observa en la Figura 2A, la movilidad de los compuestos en el solvente A fue idéntica, con un R_f de 0,88. En la Figura 2B se muestra que en el solvente más ácido los mismos compuestos cromatografían con R_f s muy similares. La poca cantidad de cuentas incorporadas a la fase orgánica en los timocitos incubados sin CPZ impidió detectar pico alguno.

I.3. Efecto del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA en timocitos intactos.

Dado que la síntesis de Ptd-dCMP y DNA comparten un mismo sustrato, el dCTP, se quiso investigar si inhibidores de la síntesis de DNA afectaban la síntesis del liponucleótido. Para ello se eligió el antimetabolito 1- β -D-arabinofuranosil citosina (ara-C), análogo de la deoxitidina que se usa como agente antineoplásico debido a su potente efecto inhibitorio sobre la síntesis de DNA. Cuando el ara-C entra a la célula es fosforilado por la deoxicitidina quinasa para dar ara-CMP (128) y luego por otras quinasas generando ara-CTP, el metabolito activo de la droga (129). El ara-CTP puede competir con el dCTP a nivel de la DNA polimerasa (130) o bien puede intercalarse en el DNA, bloqueando su elongación (132).

Para estudiar el efecto del ara-C sobre la síntesis del Ptd-dCMP, los timocitos fueron incubados con $(^3\text{H})\text{dCyd}$ en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$ ya que, como se vio anteriormente, el agregado de esta droga permite la detección del lipo-

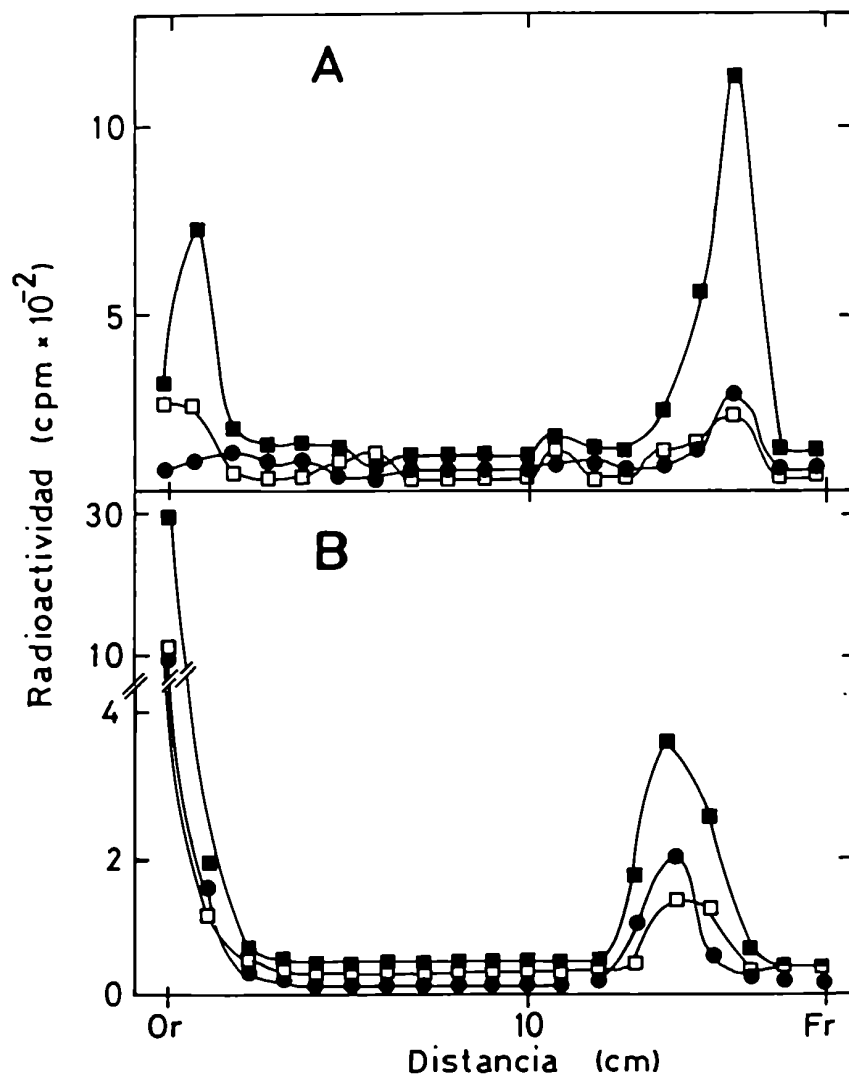


Figura 2: Cromatografía de los compuestos lipídicos sintetizados por timocitos intactos y permeabilizados en presencia y ausencia de CPZ.

La cromatografía se realizó en placas de silicagel como se describe en el punto 6.1 de Materiales y Métodos.

PANEL A: Solvente de corrida C:H:AcH:H₂O 50:25:7:3

PANEL B: Solvente de corrida C:H:AcH:H₂O 25:2:9:1

●-● Timocitos intactos incubados con (³H)dCyd en presencia de CPZ.

□-□ Timocitos permeabilizados incubados con (³H)dCTP en ausencia de CPZ.

■-■ Timocitos permeabilizados con (³H)dCTP en presencia de CPZ.

nucleótido en células intactas.

En la Figura 3 se puede observar que cuando se incuban timocitos en las condiciones mencionadas en presencia de ara-C 0,72 mM durante distintos tiempos, la incorporación de (³H)dCyd en la fase orgánica disminuye hasta un 28% con respecto a un control sin droga. En la Figura 4 se observa que este efecto es dosis-dependiente, con una DI₅₀ de 0,18 mM para el Ptd-dCMP mientras que la síntesis de DNA fue inhibida a concentraciones mucho menores (DI₅₀ = 0,03 mM).

Con el objeto de verificar la especificidad del efecto inhibitorio, las células fueron incubadas con (³H)Cyd. La Figura 5 muestra que la incorporación de radioactividad en la fase orgánica y en el precipitado (presumiblemente Ptd-CMP y RNA) no fueron afectadas por el ara-C, confirmando que el mismo es un análogo de la dCyd y no de la Cyd. Es importante señalar que este experimento demuestra, además, que es posible inhibir selectivamente la síntesis de uno de los dos liponucleótidos.

En el curso de experimentos destinados a modificar la síntesis de Ptd-dCMP en células de Sarcoma 180, se encontró que el ara-C en muy bajas concentraciones es capaz de estimular la síntesis de dicho liponucleótido (Figura 6A). Esencialmente el mismo resultado se obtuvo cuando se probaron los timocitos de ratón (Figura 7). Como se observa en ambas figuras, el ara-C es capaz de estimular la incorporación por encima de los valores obtenidos con CPZ; más aún, en ausencia de esta droga el ara-C también estimula la síntesis de Ptd-dCMP cuando se la agrega al medio de cultivo en bajas concentraciones (Figura 6A). En las Figuras 6B y 7 se observa simultáneamente una marcada inhibición de la síntesis de DNA aún a bajas concentraciones de ara-C.

La explicación que proponemos es que, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de DNA provocada por la droga, el pool de (³H)dCTP aumentaría, pudiendo ser utilizado para la síntesis de Ptd-dCMP. Si bien no fue posible demostrar experimentalmente este hecho, resultados obtenidos por otros autores avalan esta hipótesis (284,285).

I.4. Efecto del ara-C sobre la hidrólisis del Ptd-dCMP.

La observación de que altas concentraciones de ara-C inhibían la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP plantearon varias alternativas, siendo una de ellas que la droga aumentara la degradación del liponucleótido. Para medir

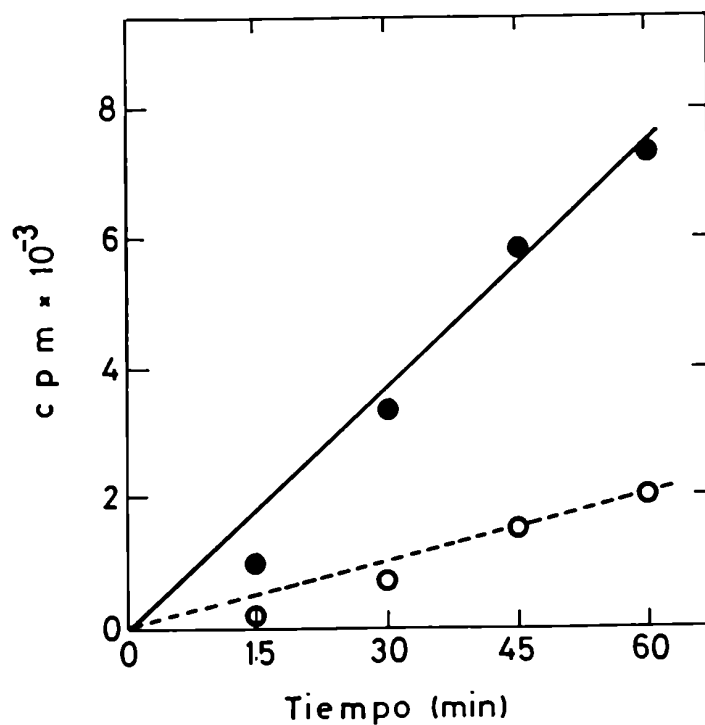


Figura 3: Efecto del ara-C sobre la incorporación de (³H)dCyd en el Ptd-dCMP. Curva de tiempo.

Se resuspendieron $5,8 \times 10^6$ timocitos en 0,5 ml de MEM-HEPES 10% FBS en presencia (o - - o) o ausencia (● - ●) de ara-C 0,72 mM. Las células fueron incubadas a 37°C durante tiempos en presencia de CPZ 60 μ M y 5 μ Ci de (³H)dCyd. El material lipídico fue extraído como se describe en el punto 4.2 de Materiales y Métodos.

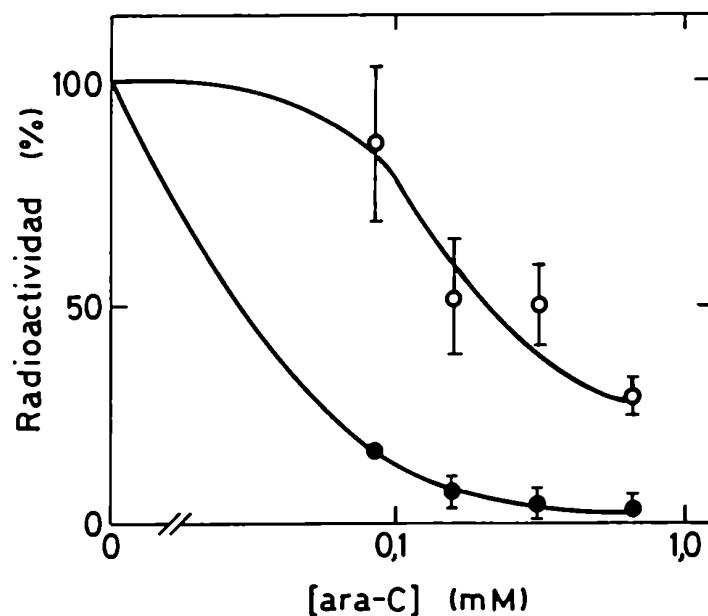


Figura 4: Efecto de distintas concentraciones de ara-C sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ en Ptd-dCMP (○) y DNA (●).

Se incubaron $5 - 10 \times 10^6$ timocitos durante 1 h a 37°C en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y cantidades variables de ara-C (0.09 - 0.72 mM). El material lipídico y el DNA fueron obtenidos como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos y las barras indican el error standard.

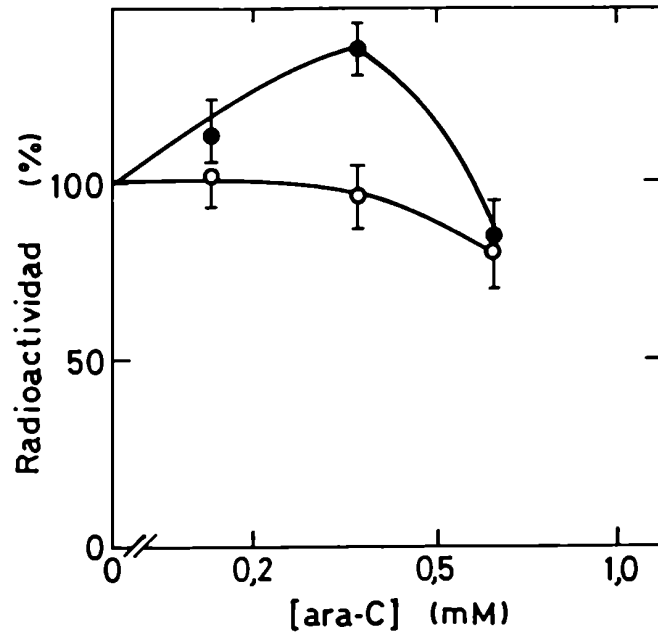


Figura 5: Efecto de distintas concentraciones de ara-C sobre la incorporación de (³H)Cyd en Ptd-CMP (o) y RNA (●).

Se incubaron 10×10^6 timocitos durante 1 h a 37°C en presencia de CPZ 60 μ M, 5 μ Ci de (³H)Cyd y cantidades variables de ara-C (0.09 - 0.72 mM). El material lipídico y RNA fueron obtenidos como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 4 experimentos y las barras indican el error standard.

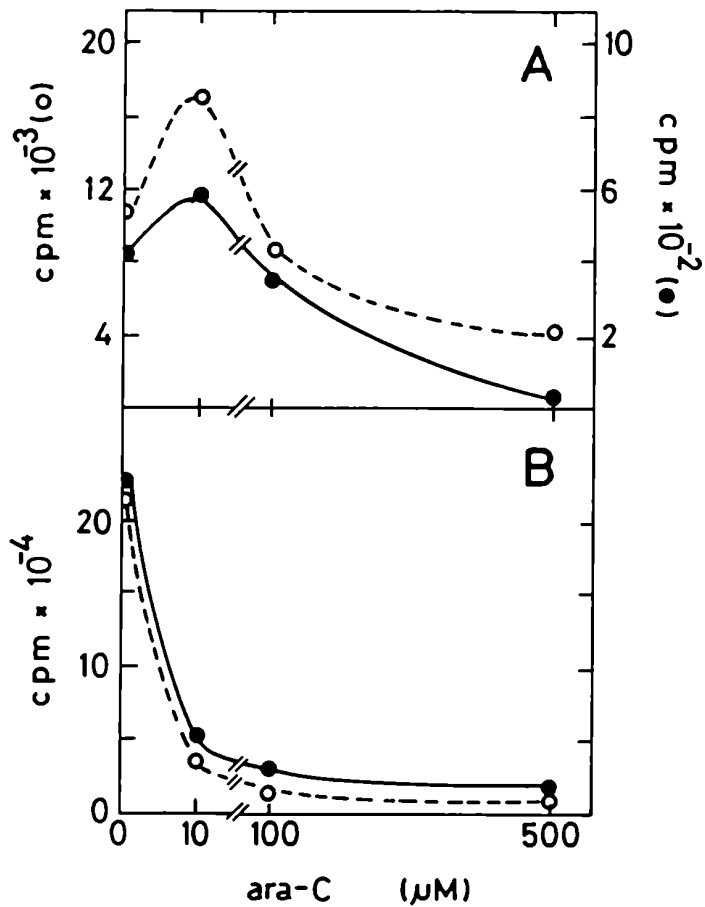


Figura 6: Efecto estimuladorio del ara-C sobre la incorporaci3n de (³H)dCyd en Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en c3lulas de Sarcoma 180.

Se incubaron 6×10^6 c3lulas de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia (o -- o) o ausencia (\bullet — \bullet) de CPZ $60 \mu\text{M}$ con $3 \mu\text{Ci}$ de (³H)dCyd y cantidades variables de ara-C (10 - 500 μM) durante 1 h a 37°C . Al cabo de la incubaci3n el material lip3dico y el DNA fueron extra3dos como se describe en el punto 4.2. de Materiales y M3todos.

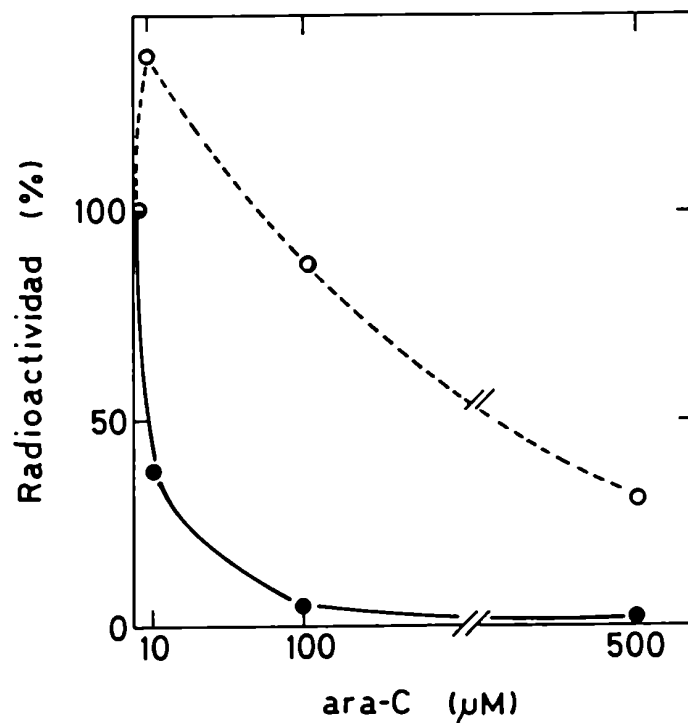


Figura 7: Efecto estimulador del ara-C sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ en Ptd-dCMP (o) y DNA (●) en timocitos de ratón.

Se incubaron 10×10^6 timocitos en 0,5 ml de MEM-HEPES que contenía 10% FBS en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y cantidades variables de ara-C (1 - $500 \mu\text{M}$). Las células fueron incubadas durante 1 h a 37°C al cabo de la cual se extrajo el material lipídico y DNA, tal como figura en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

este efecto se diseñó el siguiente experimento. Se incubaron células de Sarcoma 180 con CPZ $60 \mu\text{M}$ y $(^3\text{H})\text{dCyd}$ durante 30 min. con el objeto de sintetizar $\text{Ptd-}(^3\text{H})\text{dCMP}$, luego las células se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo fresco con o sin ara-C. Se retiraron alícuotas a distintos tiempos y se midió la cantidad de $\text{Ptd-}(^3\text{H})\text{dCMP}$ remanente en la fase orgánica. En la Figura 8 se observa que, si bien el $\text{Ptd-}(^3\text{H})\text{dCMP}$ se degrada espontáneamente, el ara-C no modifica la velocidad con que lo hace.

1.5. Efecto del ara-C sobre el transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$.

Es sabido que el ara-C utiliza, para entrar a la célula, transportadores que habitualmente son utilizados por nucleósidos naturales entre los que se encuentra la dCyd. Era posible, entonces, que el ara-C interfiriera con la entrada del precursor radioactivo utilizado para medir la síntesis del Ptd-dCMP . En la Figura 9 se observa que esto es así. En efecto, a las concentraciones de ara-C que inhiben la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ al liponucleótido, se observa inhibición del transporte del precursor. El transporte fue medido a 0°C para detener el metabolismo celular y estudiar solamente lo que sucede a nivel de la membrana plasmática.

Dado que el ara-C es fosforilado intracelularmente generando ara-CTP, metabolito que inhibe la síntesis de DNA, se investigó la posibilidad de que este compuesto afectara también la síntesis de Ptd-dCMP .

1.6. Efecto del ara-CTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA.

Con el objeto de medir el efecto del ara-CTP sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCTP}$ al Ptd-dCMP , las células tímicas fueron permeabilizadas como se describió en el punto 4.4. de Materiales y Métodos. Este sistema permite que los nucleósidos trifosfato penetren a la célula y a la vez permite descartar la posibilidad de que los compuestos interactúen a nivel de la entrada a la célula.

En la Figura 10 se observa que el ara-CTP inhibió en forma dosis-dependiente la síntesis de Ptd-dCMP y DNA. Aquí también se observa que el DNA fue más sensible que el liponucleótido al efecto inhibitorio del ara-CTP ($\text{DI}_{50} = 0,02$ y $0,11 \text{ mM}$ respectivamente). Este resultado fue confirmado en

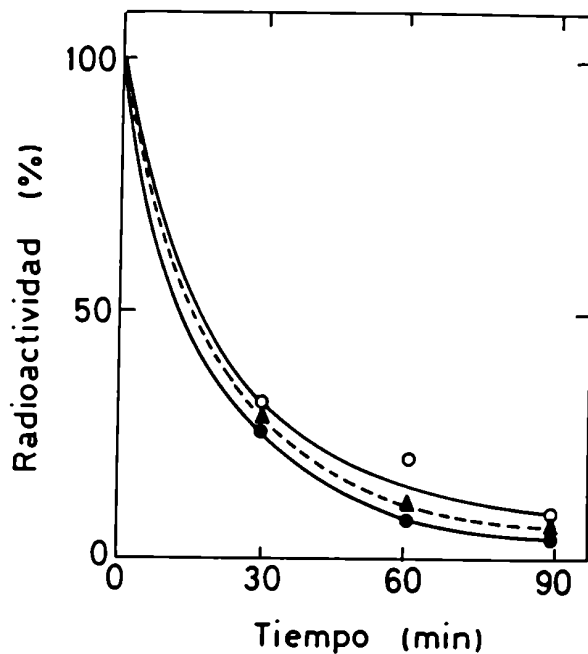


Figura 8: Efecto del ara-C sobre la hidrólisis de Ptd-dCMP.

Se resuspendieron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HERES y se incubaron durante 30 min a 37°C en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$. La incubación se detuvo por el agregado de 5 ml de medio de cultivo frío y las células se centrifugaron y se lavaron con 5 ml de medio. Luego del lavado, las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio de cultivo sin agregados (● - ●), con ara-C $8,3 \mu\text{M}$ (o - o), ara-C $580 \mu\text{M}$ (▲ - ▲) y se reincubaron a 37°C durante distintos tiempos. Al finalizar el experimento se obtuvo el material lipídico como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

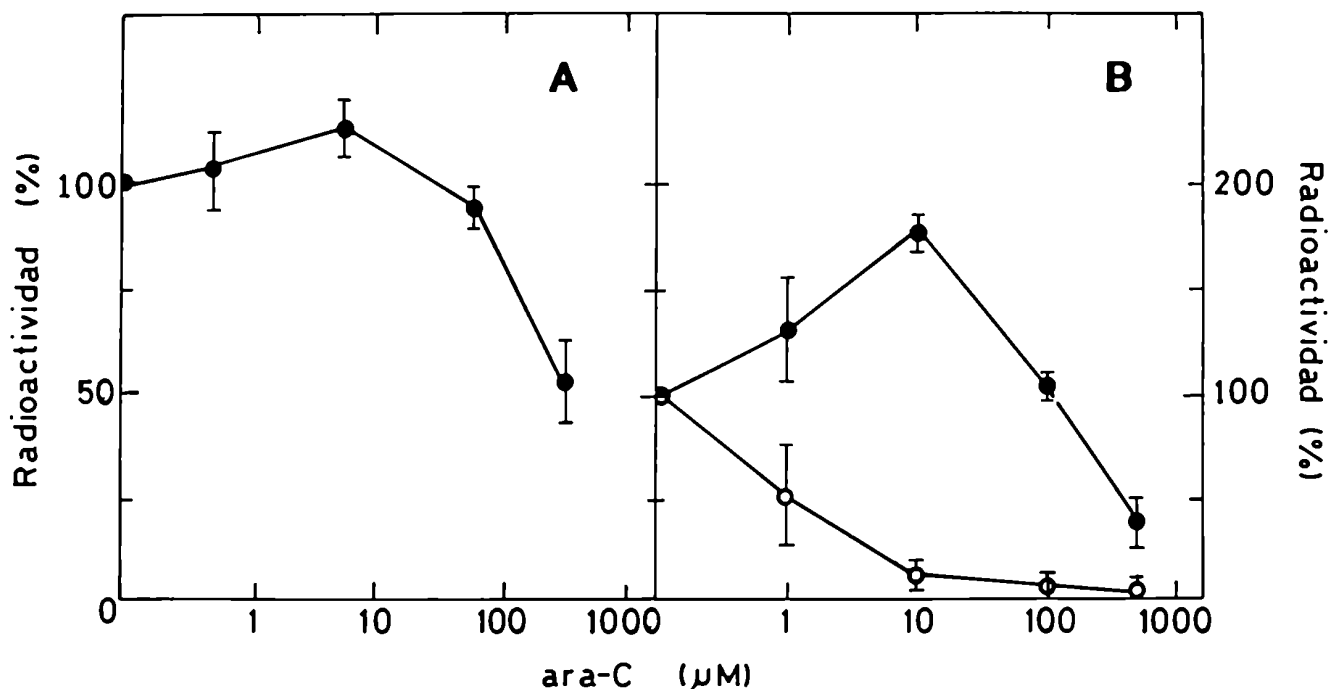


Figura 9: Comparación del efecto del ara-C sobre el transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ (A) y sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA (B).

- A) Se incubaron $25 - 30 \times 10^6$ células de Sarcoma 180 con $(^3\text{H})\text{dCyd}$ $1 \mu\text{M}$ en las condiciones descritas en el punto 4.1. de Materiales y Métodos, con cantidades variables de ara-C. Luego de 30 min a 0°C las células fueron lavadas extensamente y la radioactividad fue medida disolviendo los pellets celulares con Soluene 350.
- B) Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 con CPZ $60 \mu\text{M}$, $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y cantidades variables de ara-C durante 30 min a 37°C . Al cabo de la incubación se extrajo el material lipídico (● - ●) y el DNA (o - o) como figura en Materiales y Métodos.

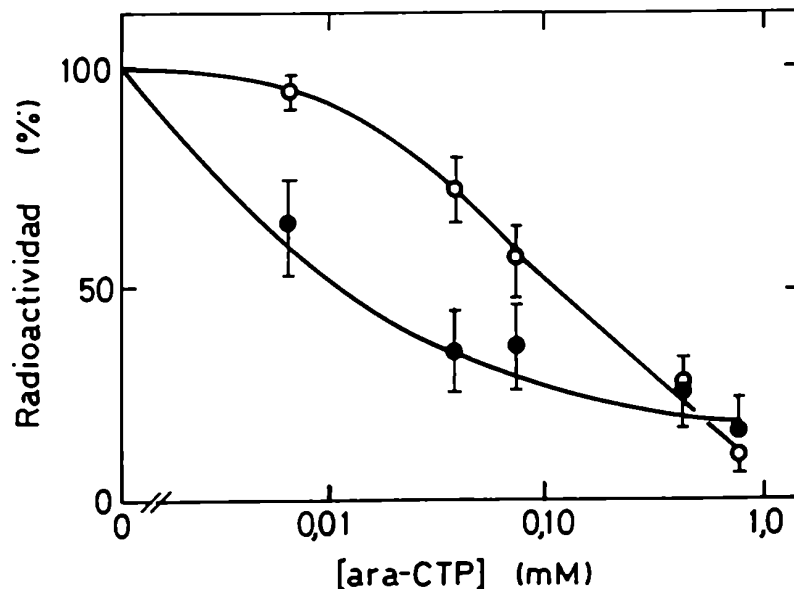


Figura 10: Efecto del ara-CTP sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCTP}$ en Ptd-dCMP (○) y DNA (●).

Se permeabilizaron 10×10^6 timocitos con una mezcla de permeabilización sin dNTPs tal como se describe en el punto 4.4. de Materiales y Métodos. A la mezcla de incubación se agregó CPZ $60 \mu\text{M}$ y cantidades variables de ara-CTP. Las células fueron incubadas durante 30 min a 37°C , luego de los cuales se obtuvieron el material lipídico y el DNA como figura en Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos y las barras indican el error standard.

núcleos de Sarcoma 180, donde también se encontró que el ara-CTP inhibe la síntesis de Ptd-dCMP y DNA (Tabla 2).

I.7. Incorporación de (³H)ara-C a la fase orgánica.

Con el propósito de investigar si el ara-C actúa en esta vía metabólica a través de un intermediario lipídico, se midió su incorporación a la fase orgánica. Para ello se incubaron timocitos de ratón resuspendidos en medio de cultivo con suero dializado, con el objeto de eliminar los nucleósidos ya que estos podían interferir con la entrada de (³H)ara-C a la célula.

En la Figura 11 se observa que en presencia de CPZ se recupera un compuesto lipídico marcado radioactivamente, posiblemente fosfatidil-araCMP. Este resultado está indicando que el fosfatidil-araCMP se sintetiza por un mecanismo similar al que conduce la síntesis de Ptd-dCMP.

I.8. Efecto del dipiridamol sobre el transporte de (³H)ara-C.

Es bien sabido que el dipiridamol es un potente inhibidor del transporte de nucleósidos a la célula (117,286). Experimentos realizados en el laboratorio demostraron que esta inhibición también ocurre a 0°C.

Dado que el ara-C compite con la deoxicitidina por la entrada a la célula, quisimos estudiar el comportamiento del dipiridamol con respecto al transporte de ara-C. Para ello elegimos dos dosis de ara-C, 0,5 µM y 250 µM.

En la Figura 12 podemos comparar el efecto del dipiridamol sobre el transporte de (³H)dCyd y el de ara-C. Como se observa, esta droga inhibe en un 95% el transporte de (³H)dCyd mientras que el efecto sobre ara-C es menor (77% para 0,5 µM y 48% para 250 µM). Esto está de acuerdo con lo encontrado por otros investigadores (287). Ellos postulan que el ara-C se incorpora por transporte facilitado en un 80-87% a una concentración de 1 µM, mientras que a 200 µM lo hace en un 68-80%. Este transporte facilitado se realiza utilizando el transportador de la deoxicitidina mientras que el exceso de ara-C entra por difusión pasiva y por lo tanto su entrada no es bloqueada por dipiridamol.

Este resultado sugiere también que las concentraciones intracelulares de ara-CTP alcanzables con altas dosis de ara-C son mucho mayores que las que se alcanzan con dosis convencionales y permite explicar el éxito que ha tenido la

Núcleos aislados	Radioactividad recuperada en	
	Ptd-dCMP (cpm)	DNA
Sin agregados	1.114	1.438
Ptd-A 1 mM	8.740	1.530
Ptd-A 1 mM + ara-CTP 0.5 mM	5.103	312

Tabla 2: Efecto del ara-CTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA en núcleos aislados de células de Sarcoma 180.

Los núcleos fueron obtenidos como se describe en el punto 3.1. de Materiales y Métodos. Se incubaron 5×10^6 núcleos en 0,3 ml de mezcla de permeabilización completa que contiene $3,3 \mu\text{M}$ (^3H)dCTP y los agregados que figuran en la tabla. El ácido fosfatídico (Ptd-A) fue agregado como una dispersión acuosa sonicada. Luego de 30 min a 37°C se extrajo el material lipídico y el DNA como figura en el punto 4.5. de Materiales y Métodos.

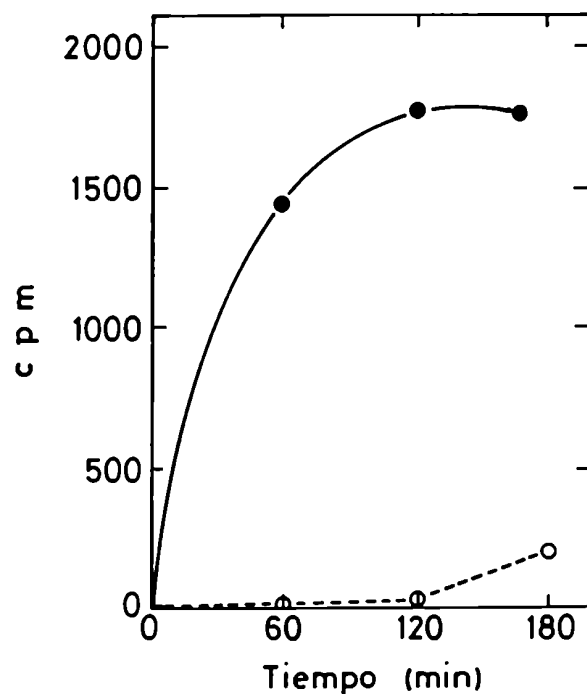


Figura 11: Curva de tiempo de la incorporación de $(^3\text{H})\text{ara-C}$ a la fase orgánica.

Se resuspendieron 14×10^6 timocitos en 0,5 ml de MEM-HEPES que contenía 10% FBS dializado. Las células se incubaron con 5 μCi de $(^3\text{H})\text{ara-C}$ en presencia (●) o ausencia (○) de CPZ 60 μM durante tiempos variables a 37°C. El material lipídico fue extraído como se describe en Materiales y Métodos.

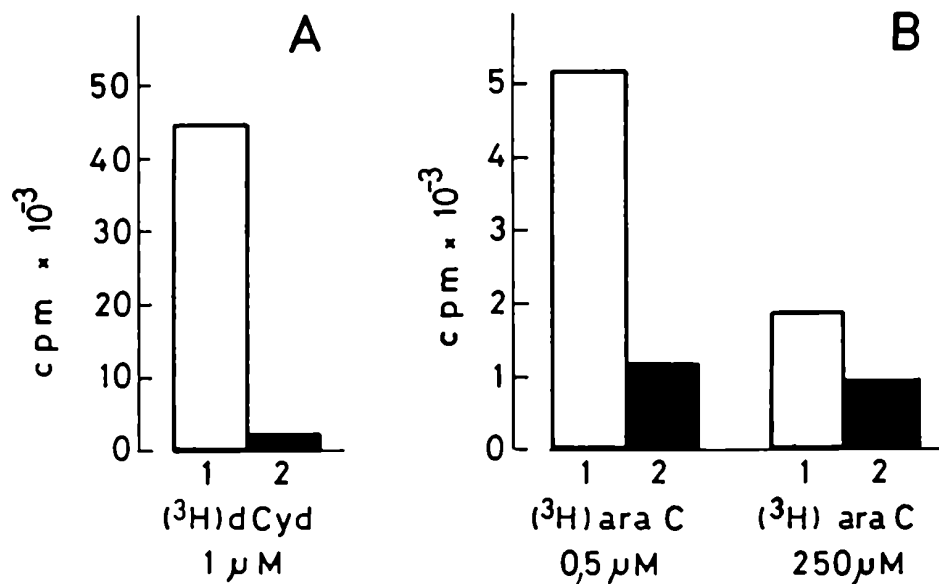


Figura 12: Efecto del dipiridamol sobre el transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y $(^3\text{H})\text{ara-C}$ en Sarcoma 180.

Figura 12A: Se incubaron 22×10^6 células en 1 ml de PBS-Glucosa (1 mg/ml) con dCyd 1 μM (1 μCi de $(^3\text{H})\text{dCyd}$) en presencia o ausencia de dipiridamol 10 μM. (1) sin agregados; (2) dipiridamol.

Figura 12B: Se incubaron 30×10^6 células en el mismo medio con 0.5 o 250 μM ara-C (1 μCi de $(^3\text{H})\text{ara-C}$) en presencia o ausencia de dipiridamol 10 μM. (1) sin agregados; (2) dipiridamol.

Las incubaciones se llevaron a cabo a 0°C durante 30 min. La medición de la radioactividad incorporada a las células se realizó como se describe en el punto 4.1. de Materiales y Métodos.

quimioterapia con altas dosis de ara-C (HD-ara-C) en una gran proporción de pacientes.

I.9. Modelo propuesto para explicar el efecto del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

En base a los resultados obtenidos en este capítulo se han diseñado dos modelos que explican el modo de acción del ara-C a bajas y altas concentraciones.

En la Figura 13A está esquematizado lo que sucede cuando se incuban células con (³H)dCyd en presencia de 1 a 10 μM ara-C. Ambos nucleósidos penetran a la célula por un proceso de difusión facilitada, utilizando probablemente el mismo transportador, ya que estudios cinéticos de transporte indican que ambos nucleósidos poseen los mismos valores de Km y Vmax. (288). Una vez dentro de la célula, la dCyd quinasa citoplasmática fosforila ambos nucleósidos dando los respectivos nucleósidos monofosfato y luego, por la acción de otras quinatas se sintetizan dCTP y ara-CTP. Concentraciones intracelulares de ara-CTP del orden de 10⁻⁷ M son suficientes para inhibir la síntesis de DNA (289). Como consecuencia de dicha inhibición, la concentración intracelular de dCTP aumentaría. Existen en la literatura numerosas evidencias de que el ara-C es capaz de aumentar dicho pool. Roberts y col. encontraron elevados los pools de dCTP y dTTP como consecuencia de la administración de 1.200 mg/Kg de ara-C en ratones portadores de células leucémicas L1210 (284). Graham y Whitmore, en experimentos *in vitro*, encontraron que la incubación de células L de ratón con ara-C 30 μM y (³H)dCyd provocaba, luego de 2 h de incubación, un incremento de 3 veces en la concentración de (³H)dCTP (285).

Dado que el dCTP es sustrato para la síntesis de Ptd-dCMP, un aumento en su concentración intracelular provocaría un incremento en la síntesis del liponucleótido. Este efecto se observa independientemente de los niveles endógenos de ácido fosfatídico, el otro sustrato para la síntesis de Ptd-dCMP, aunque en presencia de CPZ, que aumenta los niveles de dicho fosfolípido por inhibición de la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa, la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP es mayor (Figura 6A). Estos resultados sugieren que, posiblemente, ambos sustratos se hallan en concentraciones limitantes en células intactas. Este hecho permitiría explicar, al menos en parte, el bajo

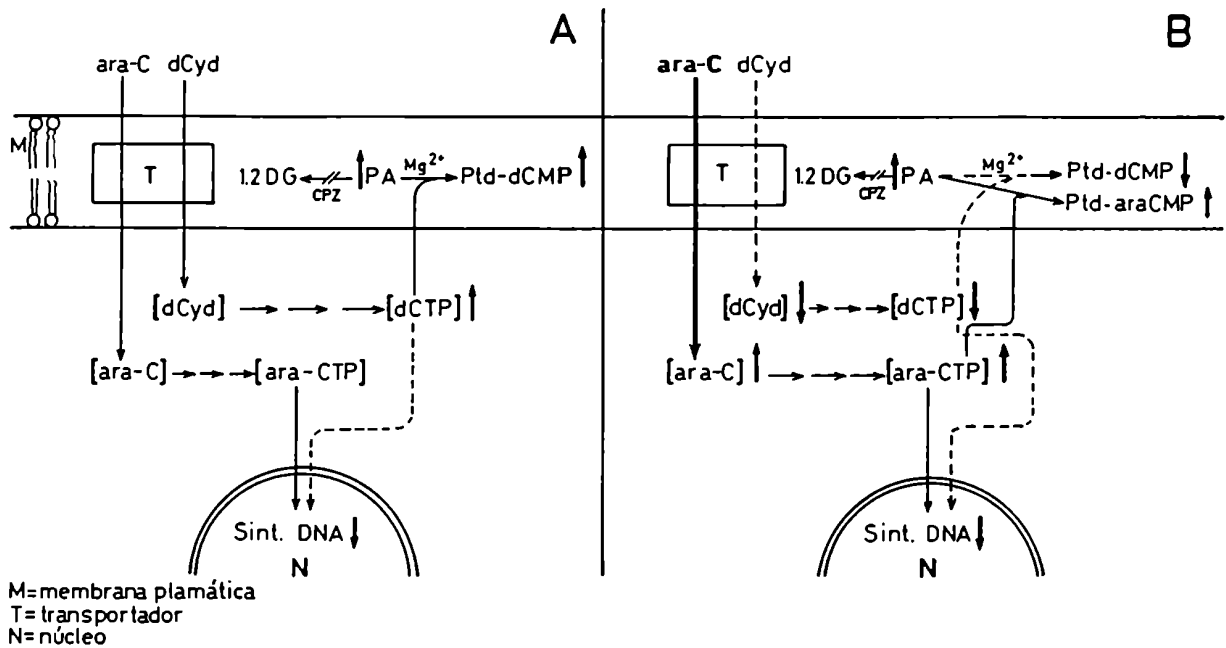


Figura 13: Mecanismo de acción del ara-C sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

A - Efecto de bajas concentraciones de ara-C.
B - Efecto de altas concentraciones de ara-C.
1,2 DG 1,2 diglicérido.
P A ácido fosfatídico.
Las líneas punteadas indican etapas inhibidas.

↑ concentración aumentada.

↓ concentración disminuída.

◆ bloqueo enzimático.

nivel de Ptd-dCMP detectado cuando se incuban las células con (^3H)dCyd en ausencia de drogas que aumenten la concentración de alguno de sus sustratos.

Cuando se incuban células en presencia de altas concentraciones de ara-C ($\Delta 100 \mu\text{M}$) la situación cambia. Esto está esquematizado en la Figura 13B. En primer lugar, se observa una inhibición del transporte de (^3H)dCyd que se produce por competencia de las moléculas de ara-C por el transportador de dCyd. Es necesario tener en cuenta que en todos los experimentos el único aporte de dCyd proviene del suero donde la concentración aproximada de este nucleósido es del orden de $1 \mu\text{M}$ (290). La inhibición en el transporte de (^3H)dCyd hace que la concentración de (^3H)dCTP intracelular baje, no así la concentración de ara-CTP, que alcanza niveles suficientes para inhibir, además de la síntesis de DNA, la síntesis de Ptd-dCMP. Los experimentos realizados con células permeabilizadas y núcleos sugieren que el ara-CTP inhibe la síntesis de Ptd-dCMP por competencia con el dCTP por la enzima que transfiere este nucleótido al ácido fosfatídico. El experimento de la Figura 11 sugiere que el ara-CTP actuaría como sustrato de dicha enzima ya que el (^3H)ara-C se incorpora a un compuesto soluble en solventes orgánicos. Más aún, esta incorporación sólo es detectada en presencia de CPZ, sugiriendo un mecanismo similar a aquél que conduce a la detección de Ptd-dCMP en células intactas.

Si bien en el esquema no fue indicado para simplificar su comprensión, el ara-C se incorpora a la fase orgánica aún a bajas concentraciones pero lo hace con muy baja eficiencia, de tal forma que el efecto neto es un incremento en la síntesis de Ptd-dCMP provocado por el aumento en la concentración de (^3H)dCTP.

El modelo propone que el Ptd-dCMP se sintetiza en la membrana plasmática, lo que también representa una simplificación ya que sabemos que los núcleos pueden sintetizar Ptd-dCMP (Tabla 2). Si bien en esta organela la síntesis estaría localizada a nivel de membrana (como ocurre con la síntesis de todos los fosfolípidos), es difícil discriminar si ocurre en la membrana externa, prolongación del retículo endoplasmático, o si ocurre en la membrana nuclear propiamente dicha. Por otra parte, estudios realizados en el laboratorio señalaron a la fracción de membranas sedimentadas a baja velocidad y a la fracción nuclear, como los lugares donde se localiza el 75% del Ptd-dCMP sintetizado por las células. Los microsomas contenían el 2% mientras que el resto

de la radioactividad se distribuía entre mitocondrias y fracción soluble (26).

En el Capítulo IV se presentarán las evidencias que demuestran el rol del Ptd-dCMP como precursor en la biosíntesis de fosfatidil-inositol. Es interesante destacar que Raetz y col. (291) sintetizaron químicamente ara-CDP-DL-dipalmitina y demostraron que sólo un 30% puede ser sustrato para la enzima fosfatidil-inositol sintetasa en microsomas de hígado de rata y que no puede ser convertido a fosfatidil-glicerofosfato por mitocondrias del mismo origen ni a fosfatidil-serina en extractos de *Escherichia Coli*. Los resultados presentados en este Capítulo permiten postular un nuevo mecanismo de acción de la droga antineoplásica ara-C. Dicho mecanismo implicaría la inhibición parcial de la biosíntesis de fosfolípidos celulares.

Los resultados presentados no permiten discernir si la inhibición de la síntesis de Ptd-dCMP juega algún rol en el efecto citotóxico del ara-C.

Existen datos en la literatura que indican que el ara-C puede interferir con otros procesos además de la síntesis de DNA. Chu ha reportado que esta droga se incorpora a RNA (292) y Hawtrey y col. mostraron que el ara-C inhibe la síntesis de glicolípidos y glicoproteínas en células embrionarias de hamster (293).

Recientemente el grupo de David Woodcock, utilizando técnicas de microcinematografía, microfluorimetría de flujo y estudio de la morfología cromosómica llegó a la conclusión que el daño primario que lleva a las células tratadas con ara-C a la muerte no se debe a su intercalación en el DNA, sino a una re-replicación aberrante del DNA que conduce a severas alteraciones en la estructura cromosómica (294). Este proceso ocurre cuando la replicación del DNA se inhibe directamente por acción sobre la DNA polimerasa o indirectamente por inhibición de la síntesis de proteínas.

CAPITULO II

SINTESIS DE Ptd-dCMP EN CELULAS DE ORIGEN MIELOIDE

II.1. Efecto del ara-C sobre mieloblastos de pacientes leucémicos.

Recientemente han surgido trabajos en la literatura en apoyo del tratamiento con altas dosis de ara-C, particularmente en pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) resistentes a dosis convencionales de la droga (295,296). Como se señaló en el capítulo anterior, el éxito de esta terapia podría deberse a que usando altas dosis de ara-C se pueden eludir los mecanismos normales de transporte de este nucleósido, que potencialmente pueden estar alterados en células resistentes.

Dado que la concentración que alcanza el ara-C en plasma en el curso de los tratamientos con altas dosis (297) son factibles de inhibir al Ptd-dCMP, resultó de interés estudiar la síntesis de Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos de pacientes con LMA y el efecto in vitro del ara-C sobre ambas vías metabólicas. El objetivo inicial fue investigar cuál de estas vías está alterada en las células resistentes y si esto se modifica con el tratamiento de altas dosis.

II.1.1. Efecto del ara-C sobre la incorporación de (³H)dCyd a Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos de pacientes con LMA.

El estudio se realizó con 5 pacientes con diagnóstico de LMA que no hubieran recibido tratamiento quimioterápico previo, con la idea de proseguir el estudio con aquellos pacientes que presentaran resistencia a las dosis convencionales de ara-C con las que serían tratados.

Los datos de estos pacientes, así como la fuente de mieloblastos utilizada, figuran en el punto 1.3. de Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Tabla 3, no se detectó síntesis de Ptd-dCMP, aún en presencia de CPZ, en 3 de los pacientes estudiados (N° 1, 2 y 4). En los pacientes 1 y 2, un amplio rango de concentraciones de ara-C fue inefectivo para estimular la síntesis del liponucleótido observada a bajas concentraciones de droga en timocitos y Sarcoma 180. Este efecto sí se observa en los mieloblastos del paciente N° 4.

A diferencia de los anteriores, los mieloblastos de los pacientes N° 3

ara C (μM)	Ptd-dCMP (cpm)					DNA (cpm)				
	P.1	P.2	P.3	P.4	P.5	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅
0	22	3	0	0	61	2118	2081	11900	4146	23319
0+CPZ 60 μM	41	21	1176	6	1760	368	477	6095	180	17223
1+	38	13	N.D	104	2146	200	152	N.D	356	4056
5+	65	15	N.D	184	1770	101	205	N.D	108	1884
10+	35	16	953	168	1778	82	152	650	95	1460
50+	208	2	N.D	61	1520	44	74	N.D	61	1330
100+	2	12	366	67	920	17	58	430	49	980
200+	22	8	336	4	600	25	40	315	42	747

Tabla 3: Efecto del ara-C sobre la incorporación de (³H)dCyd a Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos humanos.

Se incubaron $3 - 6 \times 10^6$ mieloblastos humanos en 0,5 ml de MEM-HEPES 10% FBS en presencia de CPZ 60 μM , cantidades variables de ara-C y 3 μCi de (³H)dCyd durante 1 h a 37°C. Al finalizar la incubación el material lipídico y el DNA fueron extraídos como se describe en el punto 4.2 de Materiales y Métodos. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

y 5 se comportaron como normalmente lo hacen otras células en proliferación estudiadas, es decir que la CPZ estimuló la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP y que el ara-C incrementó dicho efecto a bajas concentraciones (paciente N° 5) y lo inhibió a concentraciones altas en ambos casos.

Por otra parte, la síntesis de DNA en los mieloblastos de todos los pacientes fue sensible al efecto inhibitorio del ara-C. Este dato tuvo una buena correlación con el tratamiento clínico en el sentido de que ninguno de los pacientes presentó resistencia clínica a la droga. En efecto, tres de los pacientes estudiados entraron en remisión luego de la administración de dosis convencionales de ara-C (75 mg/m²/día s.c, 8 ciclos de 4 días) mientras que los otros dos murieron durante la inducción de la remisión.

Cabe señalar que la CPZ inhibió en todos los casos la síntesis de DNA, y que la magnitud de dicha inhibición fue altamente significativa, siendo interesante destacar que fue mayor en los casos en que no aumentaba la síntesis de Ptd-dCMP.

II.1.2. Efecto del ara-CTP sobre la incorporación de (³H)dCTP a Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos de pacientes con LMA.

El efecto del ara-CTP sobre la incorporación de (³H)dCTP se estudió en los mieloblastos de los pacientes N° 1, 2 y 5. Para medir este efecto los mieloblastos fueron permeabilizados para permitir el pasaje de los nucleósidos trifosfato (dNTPs). En la Tabla 4 se observa que los mieloblastos permeabilizados del paciente N° 1 sintetizaron Ptd-dCMP a pesar de que en las células intactas no se detectó síntesis del mismo. Esta síntesis fue parcialmente inhibida con 200 µM ara-CTP (18% de inhibición). En el paciente N° 2 no se detectó síntesis del liponucleótido en este sistema aunque el agregado de CPZ estimuló la incorporación de (³H)dCTP a la fase orgánica (440 cpm). En el paciente N° 5, al igual que en células intactas, hubo síntesis de Ptd-dCMP y ésta fue inhibida por ara-CTP (24% de inhibición).

Con respecto a la síntesis de DNA, fue llamativa la baja incorporación de radioactividad en este sistema en todos los pacientes estudiados. Se podría especular que los mieloblastos, al permeabilizarse, pierden algún factor importante para la síntesis de DNA.

ara-CTP (μ M)	Ptd-dCMP (cpm)			DNA (cpm)		
	Pac N° 1	Pac N° 2	Pac N° 5	Pac N° 1	Pac N° 2	Pac N° 5
0	2616	69	5607	63	8	379
1	2577	83	n.d.	97	12	n.d.
50	2897	55	n.d.	85	6	n.d.
100	2589	91	n.d.	117	4	n.d.
200	2138	81	4264	53	0	294

Tabla 4: Efecto del ara-CTP sobre la incorporación de (3 H) dCTP al Ptd-dCMP y DNA en mieloblastos permeabilizados.

Se incubaron $3 - 5 \times 10^6$ mieloblastos con 0,3 ml de mezcla de permeabilización en presencia de 3 μ Ci de (3 H)dCTP y distintas concentraciones de ara-CTP durante 1 h a 37°C. Al finalizar la incubación se extrajo el material lipídico y el DNA como figura en Materiales y Métodos. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

II.1.3. Transporte de (³H)ara-C en mieloblastos del paciente N° 3.

Este experimento se realizó con el objeto de detectar posibles fallas en el transporte del quimioterápico. En la Figura 14 se observa que el (³H)ara-C se incorpora a los mieloblastos alcanzando un máximo a los 20 min. de incubación, a partir de los cuales la incorporación disminuye abruptamente. Probablemente esto suceda porque a 0°C no funcionan las quinasas y el nucleósido no fosforilado no es retenido por la célula. En la Tabla 3 se observa que en este paciente el ara-C actuó muy bien *in vitro* tanto sobre la síntesis de DNA como sobre la síntesis de Ptd-dCMP, luego de 1 h de incubación a 37°C.

En base a los resultados obtenidos podemos clasificar a los mieloblastos de LMA en dos grupos distintos en lo que se refiere a síntesis de Ptd-dCMP y DNA. En el primer grupo (pacientes N° 3 y 5) se encuentran aquellos mieloblastos que incorporan (³H)dCyd al Ptd-dCMP en presencia de CPZ. Estas células tienen, a su vez, una activa síntesis de DNA (Tabla 3).

En el segundo grupo (pacientes N° 1, 2 y 4) se encuentran aquellos mieloblastos que no incorporan el precursor radioactivo en la fase orgánica en presencia de CPZ. Este grupo de mieloblastos tiene comparativamente menor síntesis de DNA que los anteriores. Un resumen de estos resultados se presenta en la Figura 15.

Cabe señalar que ninguno de los pacientes estudiados presentó resistencia celular al ara-C, con una DI₅₀ para la síntesis de DNA que osciló entre 1 y 10 μM. Estos pacientes tampoco desarrollaron resistencia posterior al tratamiento quimioterápico empleado con lo cual ninguno fue seleccionado para un tratamiento con altas dosis de ara-C.

Al cabo de un año de estudio, tres de los pacientes habían fallecido (N° 2 y 3 durante la inducción de la remisión y N° 4 un año después). Con respecto a los otros dos, el paciente N° 1 entró en remisión continua y no volvió al centro asistencial y el paciente N° 5 recayó un año después del tratamiento y actualmente no se conoce su situación.

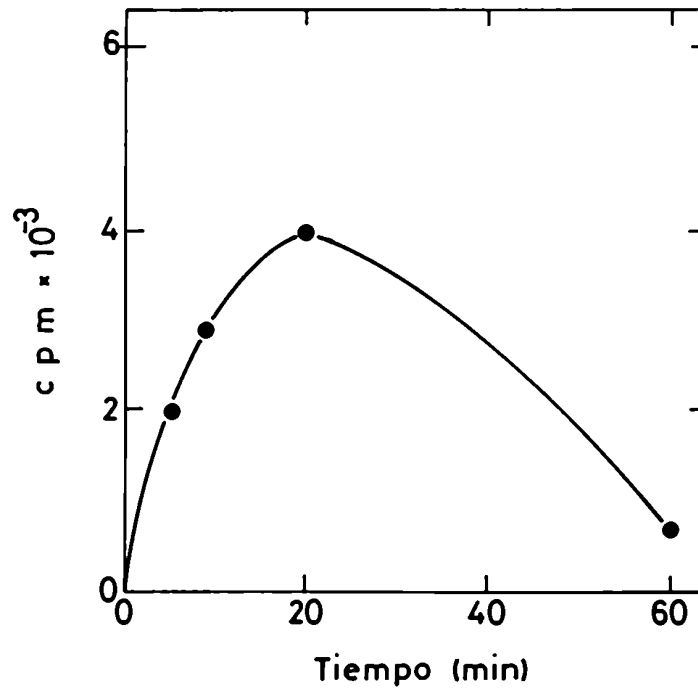


Figura 14: Transporte de (³H) ara-C en mieloblastos humanos.

Se incubaron 30×10^6 células en 1 ml de PBS-glucosa (1 mg/ml) con $50 \mu\text{M}$ ara-C ($1 \mu\text{Ci}$ de (³H)ara-C) durante tiempos variables a 0°C . La medición de la radioactividad incorporada se realizó como se describe en Materiales y Métodos.

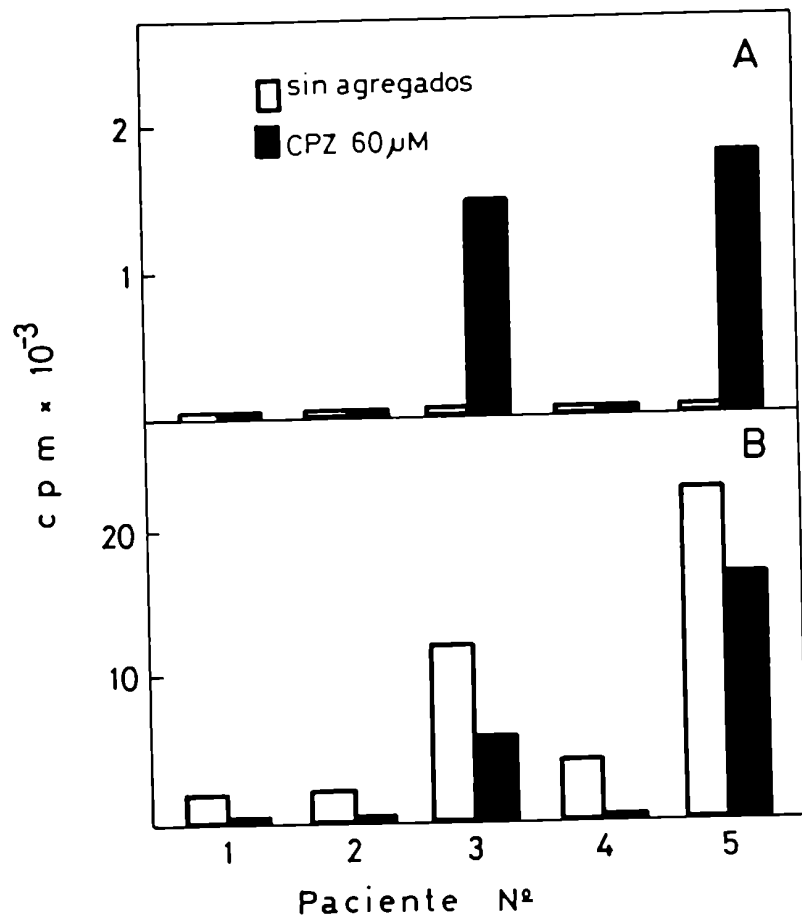


Figura 15: Síntesis de Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en mieloblastos humanos.

Este gráfico se construyó en base a los experimentos que figuran en la Tabla 3.

II.2. Síntesis de Ptd-dCMP en la línea celular HL-60.

Los resultados obtenidos con mieloblastos humanos, sugiriendo la presencia de distintas poblaciones celulares en cuanto a la síntesis de Ptd-dCMP y DNA motivó la elección de la línea HL-60 como modelo experimental para estudiar la síntesis de este liponucleótido en distintas condiciones de cultivo. Esta línea fue establecida en 1977 a partir de leucocitos de sangre periférica de un paciente con leucemia promielocítica aguda (273). Las células en cultivo poseen características morfológicas y tinciones histoquímicas específicas de las células mieloides, como ser el Sudan Black, la cloroacetato esterasa y la mieloperoxidasa (273). El 90% de las células se encuentra en el estadio de promielocitos, mientras que el 10% restante corresponde a células más maduras, con morfología de mielocitos, metamielocitos y neutrófilos en cayado y segmentados.

Las células HL-60 manifiestan un fenotipo transformado, cuyas características principales son anomalías en el cariotipo, proliferación continua en cultivo sin necesidad de agregar factores de crecimiento, tumorigenicidad en ratones atímicos (ratones "nude") y similitud morfológica, histoquímica y cariotípica con las células leucémicas del paciente que le dieron origen (298).

Una característica distintiva de esta línea celular es su capacidad de ser inducida a diferenciar a distintos tipos celulares dependiendo de la naturaleza del inductor. Así por ejemplo, el ácido retinoico y sus derivados (274), el dimetil sulfóxido (DMSO) y otros compuestos planares y una variedad de compuestos polares (275) son capaces de inducir una diferenciación terminal mieloide, mientras que los ésteres de forbol inducen una diferenciación de tipo monocítica (299). Las células así diferenciadas poseen las características morfológicas y funcionales de neutrófilos y monocitos maduros. Por ejemplo, dichos neutrófilos pueden hacer fagocitosis, quimiotaxis y poseen la habilidad de reducir el nitroblue tetrazolium (NBT) (300,301). El propósito de este estudio fue investigar la síntesis de Ptd-dCMP en las células indiferenciadas y en las células inducidas a diferenciar a neutrófilos maduros.

II.2.1. Síntesis de Ptd-dCMP y DNA en HL-60 en proliferación.

La síntesis de Ptd-dCMP y DNA fue estimada incubando células en crecimiento exponencial con (³H)dCyd y midiendo su incorporación a la fase orgánica y a la fase ácido-insoluble.

En la Figura 16A se puede observar que la síntesis de Ptd-dCMP es difícilmente detectada en ausencia de CPZ aún si se aumenta la cantidad de células. El agregado de esta droga produce un fuerte incremento de los niveles del liponucleótido que es dependiente de la cantidad de células utilizadas. La síntesis de DNA, por el contrario, fue significativamente inhibida por CPZ (Figura 16B). Este resultado es similar al obtenido con los mieloblastos humanos, donde sorprendió la gran sensibilidad de estas células a la inhibición de la síntesis de DNA por CPZ. Es probable que esto esté reflejando un rasgo común a toda la serie mieloide.

La Figura 17 muestra la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP y DNA en función del tiempo de incubación. Teniendo en cuenta que el experimento se realizó en presencia de CPZ (para estas células la concentración óptima es también de 60 μ M) se puede observar que esta droga produce una disminución en la viabilidad celular a tiempos relativamente cortos, llegando a una inhibición del 80% luego de 60 min. de incubación. Los timocitos de ratón, luego de 60 min. a 37°C en presencia de CPZ 60 μ M tienen una viabilidad del 70% y las células de Sarcoma 180 incubadas en las mismas condiciones tienen una viabilidad del 90%. Una observación general es que el tiempo que tarda la reacción para llegar al plateau depende de la viabilidad, por lo tanto las curvas como las de la figura 17 difieren para los distintos tipos celulares.

II.2.2. Síntesis de Ptd-dCMP y DNA en HL-60 inducidas a diferenciar.

La inducción de diferenciación se realizó con ácido retinoico (RA) 1 μ M que, como ya se mencionó, produce una diferenciación granulocítica. En la Figura 18 se observan las células HL-60 en crecimiento exponencial y luego de 6 días de agregado el inductor. Las fotografías muestran claramente un corrimiento del cultivo hacia formas más maduras, que dan positiva la reacción de NBT (4% de células positivas en el control frente a 82% en las tratadas),

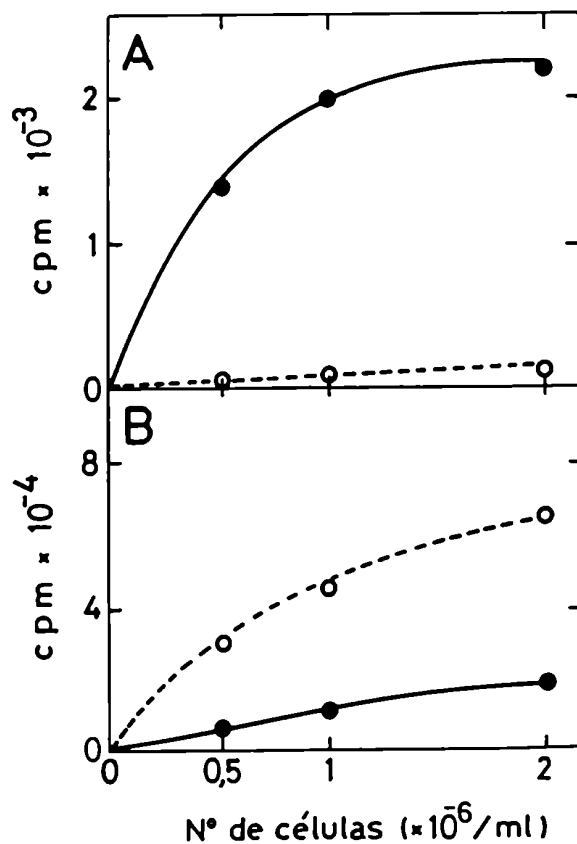


Figura 16: Síntesis de Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en HL-60 en crecimiento. Efecto de CPZ.

Se incubaron cantidades variables de HL-60 en crecimiento exponencial en 1 ml de MEM α -10% FBS con 2 μ Ci de (3 H)dCyd en presencia ($\bullet - \bullet$) o ausencia (o --- o) de CPZ 60 μ M durante 2 h a 37°C. El material lipídico y el DNA se obtuvieron como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

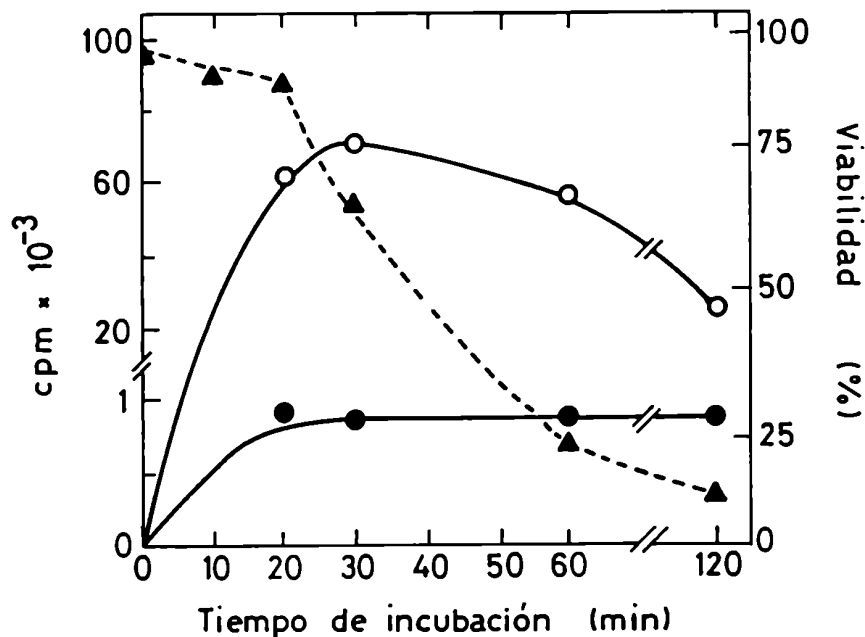


Figura 17: Incorporación de (3H)dCyd al Ptd-dCMP y DNA en HL-60 en función del tiempo de incubación.

Se incubaron 2×10^6 células en crecimiento exponencial con 0,5 ml de MEM α -10% FBS en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ durante distintos tiempos a 37°C . Al finalizar el experimento, el material lipídico ($\bullet - \bullet$) y el DNA ($\circ - \circ$) fueron obtenidos como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos. Paralelamente se determinó la viabilidad de las células a los distintos tiempos de incubación utilizando el método de exclusión del azul tripan, descrito en el punto 8.1. de Materiales y Métodos ($\blacktriangle---\blacktriangle$).

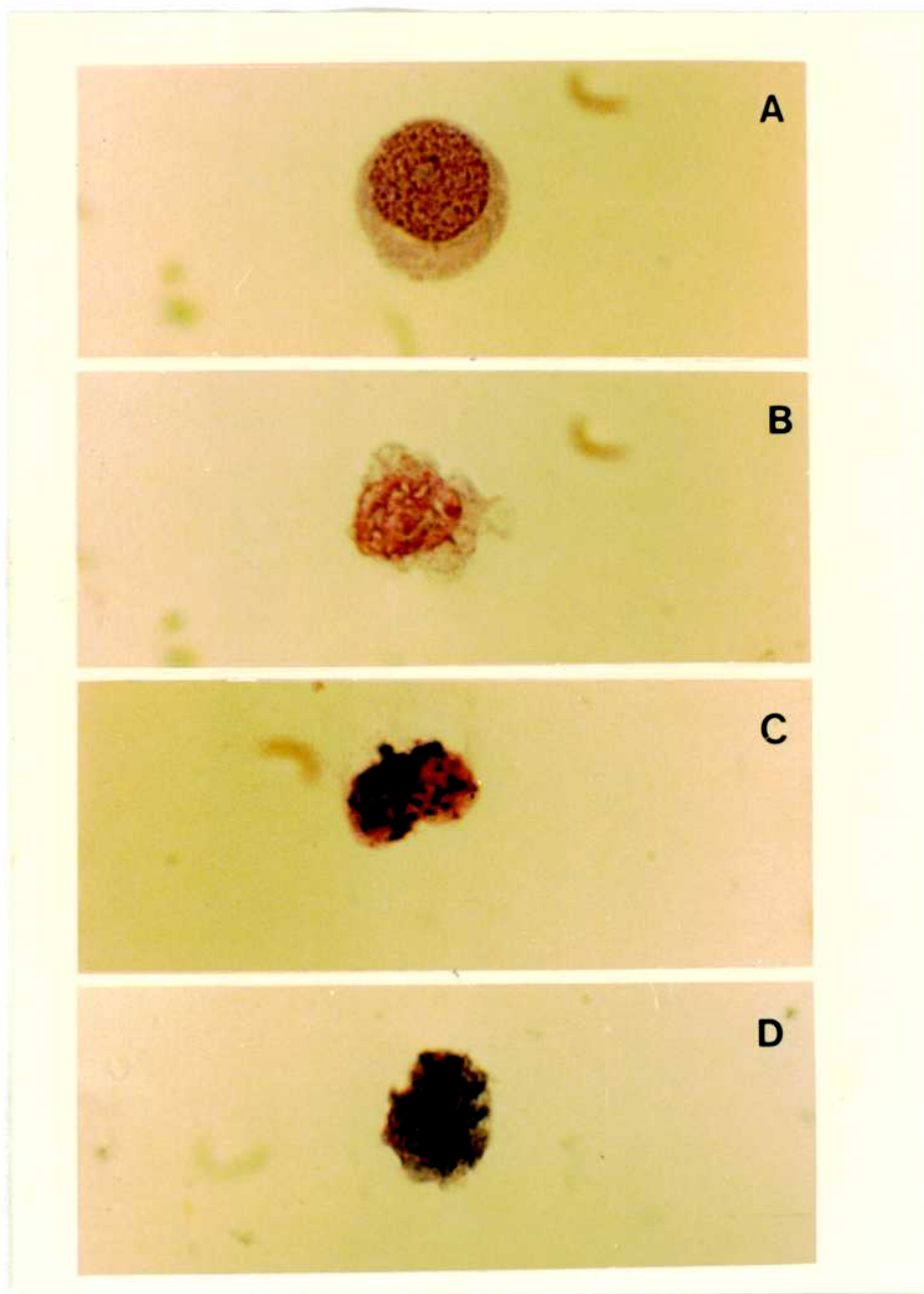


Figura 18: Fotografías de células HL-60.

A) Célula en crecimiento exponencial.

B-C-D) Células diferenciadas con ácido retinoico $1 \mu\text{M}$ (6 días de inducción).

Las fotografías fueron tomadas de células a las que se les realizó un ensayo de NBT y que posteriormente fueron teñidas con Wright-Giemsa (Materiales y Métodos, puntos 2.1. y 2.2.).

visualizándose los depósitos negros de formazán.

Cuando se midió la síntesis de Ptd-dCMP en estas células tratadas con RA, se observó que las células habían perdido la capacidad de acumular el liponucleótido en presencia de CPZ (Figura 19A). Se puede observar también que el RA no produce un efecto directo sobre la síntesis de Ptd-dCMP, al menos durante 2 h de incubación.

La síntesis de DNA en estas células fue muy baja comparada con las células en crecimiento exponencial utilizadas como control (la incorporación desciende un 70-80%). La síntesis residual fue inhibida por CPZ (Figura 19B).

Resultados similares se obtuvieron cuando la inducción se realizó con retinal 10 μ M (Figura 20).

Con el objeto de determinar si la falta de acumulación del liponucleótido en presencia de CPZ era específica para el deoxiderivado, se midió la síntesis de Ptd-CMP en idénticas condiciones. En la Tabla 5 se muestra que las células inducidas a diferenciar tampoco acumulan Ptd-CMP en presencia de CPZ; la síntesis de RNA baja un 50% con respecto a las células no inducidas y la síntesis residual es fuertemente inhibida por CPZ.

En dicha tabla se comparan los resultados obtenidos cuando se incuban células con (3 H)dCyd y (3 H)Cyd. Es necesario tener en cuenta que la radioactividad incorporada depende de la actividad específica de cada nucleótido dentro de la célula. Dado que no conocemos el tamaño de los pools de CTP y dCTP en HL-60 no se pueden sacar conclusiones con respecto a los niveles relativos de ambos liponucleótidos a partir de estos resultados.

La falta de síntesis de ambos liponucleótidos en las células inducidas a diferenciar plantea la posibilidad de que durante este proceso se haya reprimido la síntesis de la(s) enzima(s) que sintetiza(n) los liponucleótidos.

II.2.3. Síntesis de Ptd-dCMP en células diferenciadas permeabilizadas.

Con el objeto de obtener más información referente a la falta de efecto de la CPZ en HL-60 diferenciadas, las mismas fueron permeabilizadas y la síntesis de Ptd-dCMP fue medida utilizando (3 H)dCTP como precursor. En la Tabla 6 se puede apreciar que, en estas condiciones, las células diferenciadas sintetizan Ptd-dCMP y la CPZ estimula dicha síntesis. Es decir, se comportan como HL-60 sin diferenciar. Estos resultados permiten descartar la hipótesis

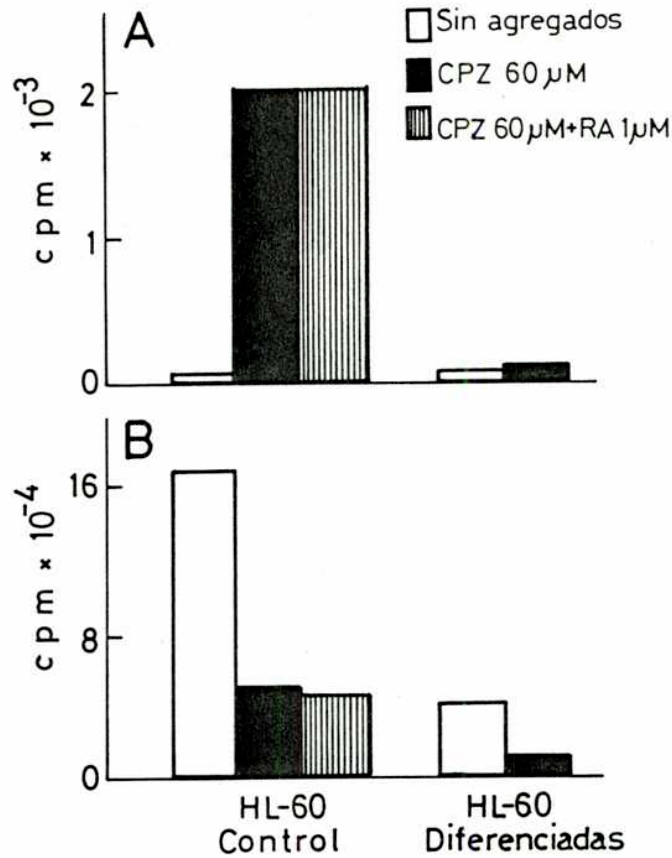


Figura 19: Síntesis de Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en HL-60 en crecimiento y diferenciadas con ácido retinoico.

Dos cultivos de HL-60, uno en crecimiento exponencial y otro inducido a diferenciar con ácido retinoico (RA) 1 μM 6 días antes fueron incubados con 3 μCi de (³H)dCyd en presencia o ausencia de CPZ 60 μM durante 2 h a 37°C. Como control se incubaron células en crecimiento exponencial con RA 1 μM en las mismas condiciones. El material lipídico y el DNA se obtuvieron como se detalla en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

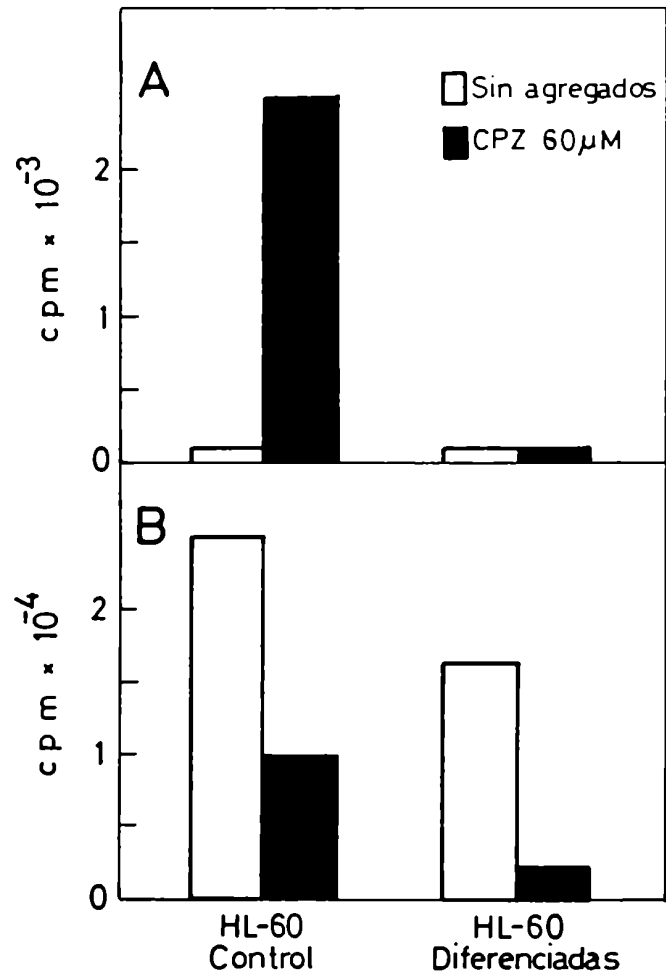


Figura 20: Síntesis de Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en HL-60 en crecimiento y diferenciadas con retinal.

Dos cultivos de HL-60, uno en crecimiento exponencial y otro inducido a diferenciar 6 días antes con retinal 10 μM fueron centrifugados y resuspendidos a una concentración de 4×10^6 cél/ml con MEMα-10% FBS. Se incubaron 0,5 ml de células con 3 μCi de (³H)dCyd en presencia o ausencia de CPZ 60 μM durante 2 h a 37°C. El material lipídico y el DNA se obtuvieron como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

Condición Experimental	CPZ 60 μ M	Ptd-dCMP cpm	DNA cpm	Ptd-CMP cpm	RNA cpm
HL-60 control		32	197.014	630	45.896
	+	1.797	63.748	9.584	27.903
HL-60 diferenciadas		36	45.890	256	22.840
	+	108	9.868	188	2.140

Tabla 5: Incorporación de (³H)dCyd y (³H)Cyd en HL-60.

Dos cultivos de HL-60, uno en crecimiento exponencial y otro inducido a diferenciar 6 días antes con ácido retinoico 1 μ M, fueron centrifugados y resuspendidos a una concentración de 4×10^6 /ml con medio de cultivo fresco (MEM α -10% FBS). Se incubaron 0,5 ml de células con 3 μ Ci de (³H)dCyd o (³H)Cyd en presencia y ausencia de CPZ 60 μ M durante 2 horas a 37°C. El material lipídico y ácido-insoluble se obtuvieron como se describe en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

Condición experimental		CPZ 60 μ M	Ptd-dCMP cpm	DNA cpm
HL-60 enteras	control	- +	42 2.714	106.814 47.913
	diferenciadas	- +	0 129	38.254 12.692
HL-60 permeab.	control	- +	1.643 7.126	142 350
	diferenciadas	- +	2.528 9.618	347 379

Tabla 6: Síntesis de Ptd-dCMP y DNA en HL-60 enteras y permeabilizadas.

Dos cultivos de HL-60, uno en crecimiento exponencial y otro inducido a diferenciar con RA 1 μ M 6 días antes, fueron divididos en dos partes: una de ellas se centrifugó y resuspendió en MEM α -10% FBS y se incubó con 3 μ Ci de (³H)dCyd en presencia o ausencia de CPZ 60 μ M y la otra parte se permeabilizó con medio de permeabilización completo descrito en el punto 4.4. de Materiales y Métodos y se incubó con 3 μ Ci de (³H) dCTP en presencia o ausencia de CPZ 60 μ M. Luego de 1 h a 37°C se extrajo el compuesto lipídico y el DNA. Se usaron 2 x 10⁶ células para cada determinación.

de la represión genómica ya que demuestran que la(s) enzima(s) que sintetiza(n) los liponucleótidos está(n) presente(s) en la célula diferenciada.

Un hecho que llama la atención es la baja síntesis de DNA en HL-60 permeabilizadas, aún cuando al medio de permeabilización se le agregaron todos los dNTPs. Un resultado similar se obtuvo con los mieloblastos de los pacientes leucémicos. Además, en el paciente N° 1 se encontró que, si bien los mieloblastos extraídos de médula ósea no acumulaban Ptd-dCMP en presencia de CPZ, sí lo hacían cuando se los permeabilizaba.

II.2.4. Transporte de (³H)dCyd en HL-60.

Habiendo demostrado que las células diferenciadas poseen la maquinaria para la síntesis de los liponucleótidos, la falta de detección de los mismos en presencia de CPZ podría estar reflejando una alteración en la membrana plasmática que conduciría a un transporte reducido de los nucleósidos precursores. Con el objeto de comprobar esta hipótesis se midió el transporte de (³H)dCyd en células proliferantes y diferenciadas.

En la Figura 21 se puede observar que en las células diferenciadas el transporte de (³H)dCyd está totalmente bloqueado, explicando, al menos en parte, la falta de detección del Ptd-dCMP en las células intactas.

II.2.5. Efecto de la CPZ sobre la capacidad clonogénica de HL-60.

En los puntos anteriores se ha señalado la gran sensibilidad de estas células al efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA. En la Figura 17 se ha mostrado que al cabo de 30 min en contacto con la droga, las células se vuelven permeables al colorante vital azul tripan. Sin embargo, y dado que la CPZ provoca alteraciones en la membrana plasmática, se hizo necesario probar que las células perdieron la capacidad de dividirse utilizando un método más directo. Dicho método es el ensayo clonogénico, que evalúa la capacidad de formar colonias de células en cultivo.

El ensayo se realizó incubando HL-60 en presencia de distintas concentraciones de CPZ durante 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo se removió la droga y las células se plaquearon en agar semisólido, cuidando que queden

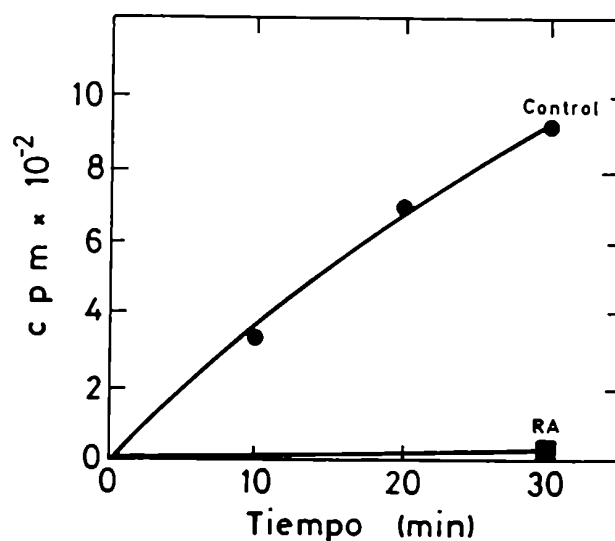


Figura 21: Transporte de (³H)dCyd en HL-60.

Las células se incubaron a una concentración de 10×10^6 /ml en PBS conteniendo glucosa 1 mg/ml y (³H)dCyd 1 μ M durante distintos tiempos a 4°C. La incorporación se frenó por el agregado de 5 ml de PBS frío y las células se lavaron con 6 ml del mismo medio. Los pellets fueron solubilizados con 0,5 ml de Soluene 350 y contados con 1,0 ml de Tolueno-Omnifluor. (● - ●) HL-60 control, (■) HL-60 diferenciadas con ácido retinoico 0,5 μ M. El experimento se realizó al séptimo día de inducción.

separadas en la placa. Al cabo de 2 semanas se contaron las colonias de más de 30 células.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 22. Se puede observar que concentraciones crecientes de CPZ disminuyen la capacidad de formar colonias llegando a cero con 60 μ M. Sin embargo, la viabilidad de las células luego de 1 h de incubación con la droga se mantuvo cercana al 100% con concentraciones ≤ 6 μ M descendiendo un 70% con 60 μ M. Este experimento demuestra que la CPZ es capaz de inhibir la proliferación celular y que el ensayo clonogénico es un método muy sensible para evaluar dicho efecto ya que con CPZ 6 μ M, aún cuando las células están viables utilizando el criterio del azul tripan, han perdido la capacidad de dividirse en un 80%.

II.3. Discusión.

Los experimentos con mieloblastos purificados de pacientes con LMA, realizados con el objeto de estudiar el metabolismo de Ptd-dCMP y correlacionarlo con la posible aparición de resistencia al ara-C, revelaron un comportamiento heterogéneo con respecto a la síntesis de Ptd-dCMP y DNA.

Con respecto a la síntesis de Ptd-dCMP se observó que algunos pacientes sintetizaron el liponucleótido en presencia de CPZ, en cuyo caso el mismo fue inhibido con concentraciones altas de ara-C y estimulado con concentraciones bajas, mientras que otros pacientes no respondieron a la CPZ. A pesar de ello, en un caso el ara-C pudo estimular la síntesis del liponucleótido (paciente N° 4). La síntesis de DNA fue mayor en las células de aquellos pacientes que respondían a la CPZ acumulando el Ptd-dCMP. En todos los casos, el agregado de la misma, como así también de ara-C, provocó una importante inhibición de la síntesis de DNA.

La esporádica disponibilidad de muestras de pacientes con LMA, que no siempre cursan con aumentada cantidad de mieloblastos en médula ósea, nos impulsó a continuar el estudio en una línea celular derivada de un paciente con Leucemia Promielocítica (HL-60). Estas células ofrecen la particularidad de diferenciarse a granulocitos maduros por acción de diversos inductores.

Los resultados obtenidos con estas células demostraron que la síntesis de Ptd-dCMP estimulable por CPZ sólo es detectada en los cultivos no diferenciados. Cuando estas células fueron inducidas a diferenciar a otras que, por

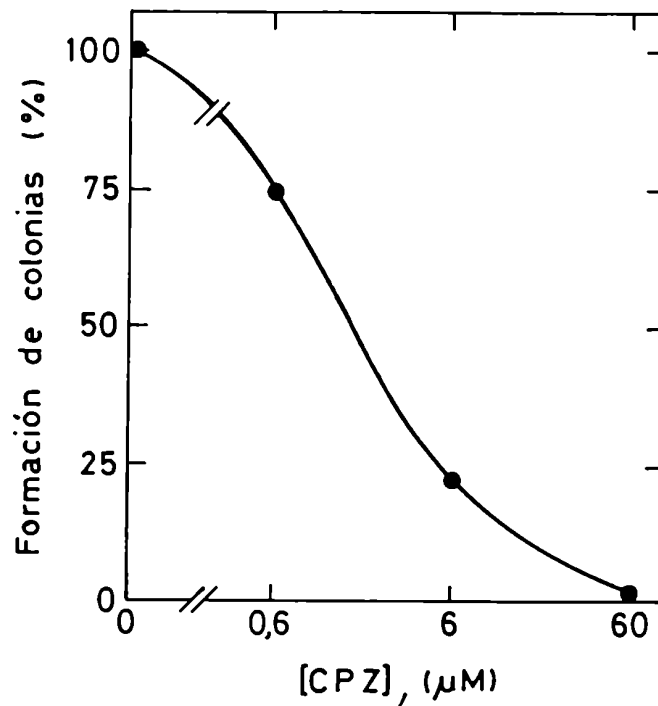


Figura 22: Efecto de CPZ sobre la capacidad de formación de colonias de HL-60.

Se incubaron 4×10^5 células HL-60 en crecimiento exponencial con distintas concentraciones de CPZ durante 1 h a 37°C . Luego de remover la droga y resuspender las células en medio de cultivo fresco las mismas fueron plasmadas en agar semisólido tal como se describe en el punto 8.2. de Materiales y Métodos. Al cabo de 10-14 días a 37°C - 5% CO_2 se contó el número de colonias formadas. Cada punto representa el promedio de 2 experimentos realizados por triplicado.

criterios morfológicos y funcionales se comportaban como neutrófilos maduros, verificamos que perdían la capacidad de acumular el liponucleótido en presencia de CPZ. En estas condiciones la síntesis de Ptd-CMP también se vio inhibida. Hemos descartado la posibilidad de que durante la diferenciación se haya inhibido la síntesis de alguna enzima relacionada con el metabolismo de los liponucleótidos ya que la permeabilización de las células diferenciadas permitió detectar síntesis de Ptd-dCMP.

Se ha verificado que las células diferenciadas poseen un transporte disminuido de (³H)dCyd al cabo de 6 días de inducción, lo que permitiría explicar, al menos en parte, la baja incorporación de radioactividad al Ptd-dCMP en presencia de CPZ. Es posible que, además de la alteración en el transporte de los precursores, otros factores estén impidiendo la acumulación de los liponucleótidos en las células diferenciadas.

Durante la redacción de esta Tesis, el grupo de Ian Macara publicó un trabajo realizado con células Friend (línea de células eritroleucémicas que pueden ser inducidas a diferenciarse a eritrocitos maduros) donde los autores describen una disminución precoz en los niveles de 1,2 diglicérido e inositol-trifosfato 2 horas después de comenzada la inducción de la diferenciación (255). Este descenso precedió a la disminución de expresión del proto-oncogen c-myc, y los autores sugieren que los niveles de 1,2 diglicérido, a través de la proteína-quinasa C, podrían regular la expresión de dicho oncogen, así como controlar la diferenciación de estas células. En este sentido, en dicho trabajo se muestra que el agregado de un éster de forbol (que mimetiza al 1,2 diglicérido y activa a la PK-C) o de diglicéridos sintéticos, bloquean la diferenciación de las células Friend (255).

En base a estas observaciones, sería muy interesante dilucidar si los cambios en la acumulación de liponucleótidos detectados en HL-60 preceden a la alteración en el transporte de precursores y, de ser esto así, qué rol juegan en la inducción de diferenciación de estas células.

A la luz de los resultados obtenidos con la línea HL-60, los resultados obtenidos con Mieloblastos de pacientes con LMA (Figura 15) podrían ser agrupados en dos poblaciones: la primera (pacientes N° 3 y 5) correspondería a células no diferenciadas, con alta síntesis de DNA y Ptd-dCMP y la segunda (pacientes N° 1, 2 y 4) correspondería a células más diferenciadas, con sín-

tesis de DNA más baja que las anteriores, donde no es posible detectar síntesis de Ptd-dCMP en presencia de CPZ.

Al igual que en HL-60 diferenciadas, cuando las células del paciente N° 1 fueron permeabilizadas, acumularon Ptd-dCMP, tal como lo hacen las células no diferenciadas.

Las implicancias de agrupar a los mieloblastos de LMA de acuerdo a estos criterios surgirá de analizar un mayor número de muestras y de poder comparar los resultados con la evolución de los pacientes.

Otra observación interesante fue la alta sensibilidad de las células HL-60 y mieloblastos de pacientes a la clorpromazina. Este hecho podría ser aprovechado para el tratamiento de este tipo de tumores. En este sentido, es interesante destacar que estudios epidemiológicos realizados entre 1950 y 1970 revelaron que la incidencia de tumores en pacientes con enfermedades mentales fue sustancialmente menor que en la población general (302,303). Curiosamente, el año 1955 señala la introducción de CPZ en las prácticas psiquiátricas y su uso en gran escala. De hecho, varias publicaciones atribuyeron a esta droga regresiones de distintos carcinomas en enfermos mentales (304,305).

Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca del mecanismo de acción de la CPZ. Boder y col. observaron que esta droga inhibe la mitosis de células animales, sugiriendo que interactúa con el sistema de microtúbulos del huso mitótico (306).

CAPITULO III

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CLORPROMAZINA SOBRE LA SÍNTESIS DE Ptd-dCMP Y DNA.

A lo largo de los capítulos anteriores se ha descripto que la CPZ estimula la síntesis de Ptd-dCMP e inhibe la síntesis de DNA en diversos sistemas celulares. En este capítulo se analizará con más profundidad la acción de la CPZ sobre ambas vías metabólicas tratando de dilucidar los mecanismos intervinientes en cada caso.

Este estudio se llevó a cabo en células de Sarcoma 180 ya que, como se mencionó anteriormente, fueron las más resistentes al efecto citotóxico de la CPZ. En la Figura 23 se presentan los resultados obtenidos cuando se incuban estas células con (^3H)dCyd y (^3H)Cyd en presencia de cantidades variables de CPZ. Se puede observar que la droga estimula la síntesis de Ptd-dCMP y Ptd-CMP con una concentración óptima de $60\ \mu\text{M}$ para ambos liponucleótidos. Se ha postulado que en microsomas de hígado de rata la CPZ inhibe competitivamente la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa y estimula la enzima CTP:fosfatidato citidilil-transferasa cuando la concentración de Mg^{2+} es suficientemente baja, aunque un exceso de CPZ inhibe de manera no-competitiva esta enzima (110). Sin embargo, la concentración de droga utilizada en estos estudios osciló entre 0,2 y 3 mM, con lo cual es posible que el efecto observado en células intactas responda, además, a otros mecanismos.

Paralelamente a la estimulación de la síntesis de ambos liponucleótidos, la CPZ inhibió la síntesis de DNA y RNA en forma dosis-dependiente; se puede observar en la Figura 23B que el efecto citotóxico de la droga en estas células se manifiesta a concentraciones mayores de $60\ \mu\text{M}$ y que la inhibición de la síntesis de DNA y RNA ocurre aún cuando no hay alteraciones apreciables en la membrana plasmática, evaluadas por el método de azul tripán.

III.1. Efecto de la CPZ sobre la hidrólisis de Ptd-dCMP.

En la Figura 8 (Capítulo I) se presentó un experimento que muestra que el Ptd-(^3H)dCMP no permanece estable en la célula sino que, una vez sintetizado, se degrada espontáneamente recuperándose cada vez menos radioactividad en la fase orgánica en función del tiempo de incubación.

Dado que este resultado no permite dilucidar qué tipo de transformación

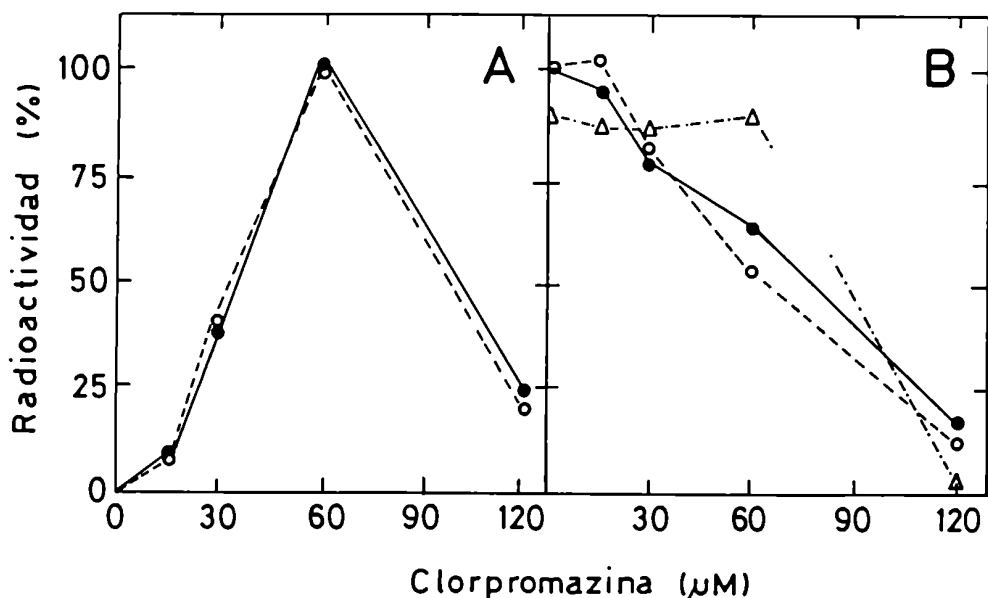
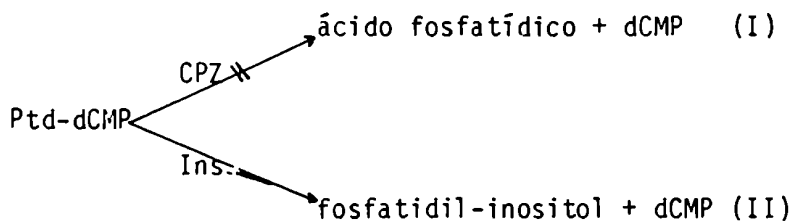


Figura 23: Efecto de CPZ sobre la síntesis de liponucleótidos (A) y ácidos nucleicos (B) en células de Sarcoma 180.

Se resuspendieron 3×10^6 células en 0,5 ml de MEM-HEPES y se incubaron durante 30 min a 37°C en presencia de $2 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{Cyd}$ o $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y cantidades variables de CPZ. El material lipídico y los ácidos nucleicos fueron obtenidos como se describe en el punto 4.2 de Materiales y Métodos. La cantidad de Ptd-dCMP (● - ●) y Ptd-CMP (o -- o) están expresadas como porcentajes de la máxima incorporación (29.539 cpm y 18.946 cpm respectivamente). En una incubación paralela, se estimó el efecto de la CPZ sobre la viabilidad celular utilizando el método de exclusión del azul tripan (Δ -.- Δ) (Materiales y Métodos, punto 8.1.).

sufre el Ptd-dCMP, se diseñó el experimento cuyos resultados se muestran en la Figura 24. El experimento consiste en incubar células con (^3H)dCyd y CPZ durante un tiempo para permitir que se acumule Ptd-(^3H)dCMP. Luego las células se lavan con abundante medio de cultivo y se las resuspende en medio fresco con distintos agregados. Se puede apreciar que la CPZ bloquea casi completamente la degradación del liponucleótido, explicando, al menos en parte, el mecanismo por el cual provoca la acumulación de Ptd-dCMP en células intactas. En el gráfico también se observa que el agregado de inositol estimula la hidrólisis de Ptd-(^3H)dCMP aún en presencia de CPZ. Este resultado indica que CPZ e inositol actúan sobre distintas reacciones de hidrólisis:



La reacción I, que llamaremos degradación, es fuertemente inhibida por la CPZ, probablemente actuando sobre una liponucleótido-fosfohidrolasa; la reacción II, que llamaremos de transformación, se estimula en presencia de inositol. En el experimento descrito, la CPZ inhibió en cierta medida la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins. Resultados similares fueron obtenidos por Zborowski y Brindley (307), quienes midieron el efecto de la CPZ sobre el metabolismo de Ptd-CMP en microsomas de hígado de rata. Ellos encontraron que la CPZ inhibe la transformación de Ptd-CMP a Ptd-Ins cuando la incubación se realiza en presencia de concentraciones limitantes de Mg^{2+} mientras que la estimula en exceso del catión. Además verificaron que la CPZ bloquea la degradación de Ptd-CMP independiente de inositol.

En dos experimentos realizados en timocitos de ratón comprobamos que la incubación de estas células con PBS conteniendo Mg^{2+} 1 mM permite una incorporación de (^3H)Ins a la fase orgánica que fue muy incrementada en presencia de CPZ (Figura 25).

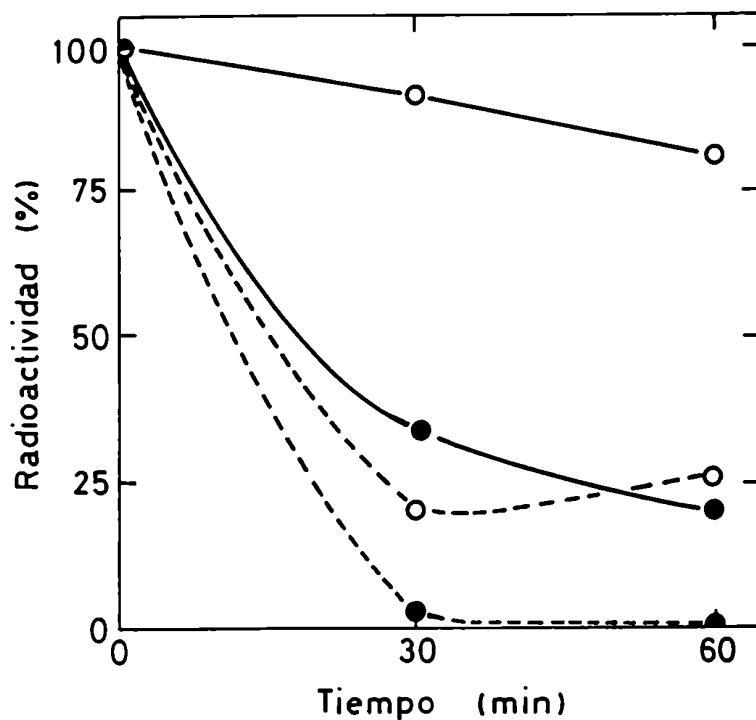


Figura 24: Efecto de la CPZ sobre la hidrólisis de Ptd-dCMP.

Se resuspendieron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES y se incubaron durante 30 min a 37°C en presencia de $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y CPZ $60 \mu\text{M}$. La incubación se interrumpió por el agregado de 5 ml de medio de cultivo frío y las células se centrifugaron y lavaron una vez con 5 ml de medio. Las células se resuspendieron luego en 0,5 ml de medio con (o - o) CPZ $60 \mu\text{M}$; (o--o) CPZ $60 \mu\text{M}$ e Inositol 10 mM ; (● -- ●) Inositol 10 mM ; (● - ●) sin agregados, y se reincubaron a 37°C por diferentes tiempos. Al final del experimento se realizó la extracción de los lípidos y se determinó la radioactividad presente en dicha fracción como se describió en el punto 4.2. de Materiales y Métodos.

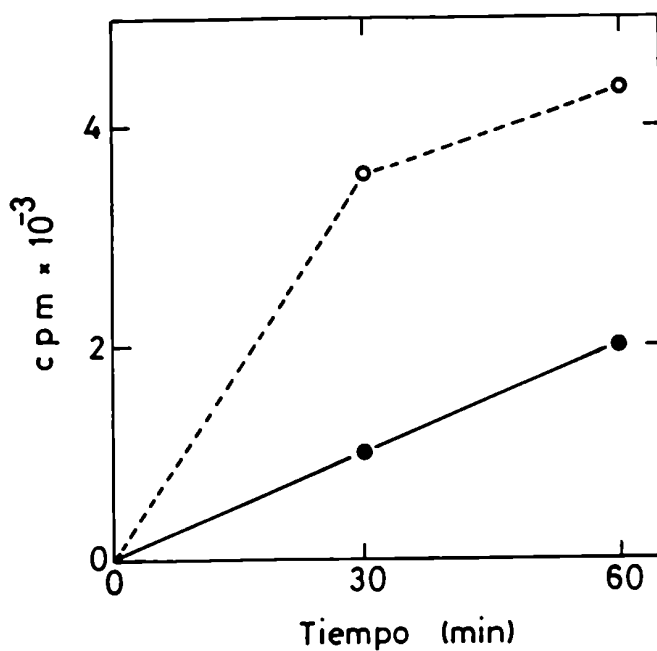


Figura 25: Efecto de CPZ sobre la incorporación de ³H)Ins en timocitos de ratón.

Se incubaron 16×10^6 timocitos en 0,5 ml de PBS conteniendo Ca^{2+} 1 mM y Mg^{2+} 1 mM durante distintos tiempos, a 37°C en presencia (o---o) o ausencia (● - ●) de CPZ 60 μM y 5 μCi de (³H)Ins (act. esp. 3.9 Ci/mmol). La fase orgánica se obtuvo igual que para los liponucleótidos.

III.2. Reversibilidad del efecto de CPZ.

Con el objeto de estudiar la reversibilidad del efecto de la CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA se realizó el siguiente experimento: se incubaron células de Sarcoma 180 con CPZ 60 μ M durante 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo la droga se removió por centrifugación y las células fueron lavadas con abundante medio de cultivo. Posteriormente se las resuspendió en medio fresco en presencia o ausencia de CPZ. La síntesis de Ptd-dCMP y DNA se determinó dando pulsos de (³H)dCyd antes y después de lavar. Como control se incubaron células en ausencia de CPZ durante todo el experimento.

En la Figura 26A se observa que inmediatamente después que la CPZ es removida (0-15 min), la síntesis de Ptd-dCMP cae, llegando al nivel de las células control al cabo de 60 min. de incubación. También se observa que el agregado de medio fresco promueve una mayor estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP en presencia de CPZ. Posiblemente esto se deba a que al cabo de la primera hora de incubación, se hayan agotado ciertos factores necesarios para la síntesis del liponucleótido que son repuestos al agregar medio de cultivo fresco.

En la Figura 26B se observa que el efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA sólo fue parcialmente revertido luego de la remoción de la droga.

III.3. Factores que afectan la síntesis de Ptd-dCMP en diferentes sistemas.

Se realizó un estudio paralelo de la síntesis de Ptd-dCMP en células intactas, células permeabilizadas y núcleos aislados de Sarcoma 180 (fotografías: Figura 27). Los resultados, mostrados en la Tabla 7, indican que la síntesis del liponucleótido es fácilmente detectada en células permeabilizadas y núcleo, mientras que en células intactas se observa poca incorporación.

El efecto de CPZ fue mayor en células intactas que en células permeabilizadas, teniendo muy poco efecto en núcleos aislados.

El Ptd-A agregado exógenamente estimuló la síntesis de Ptd-dCMP aunque en menor proporción que la CPZ en células intactas y permeabilizadas, no así

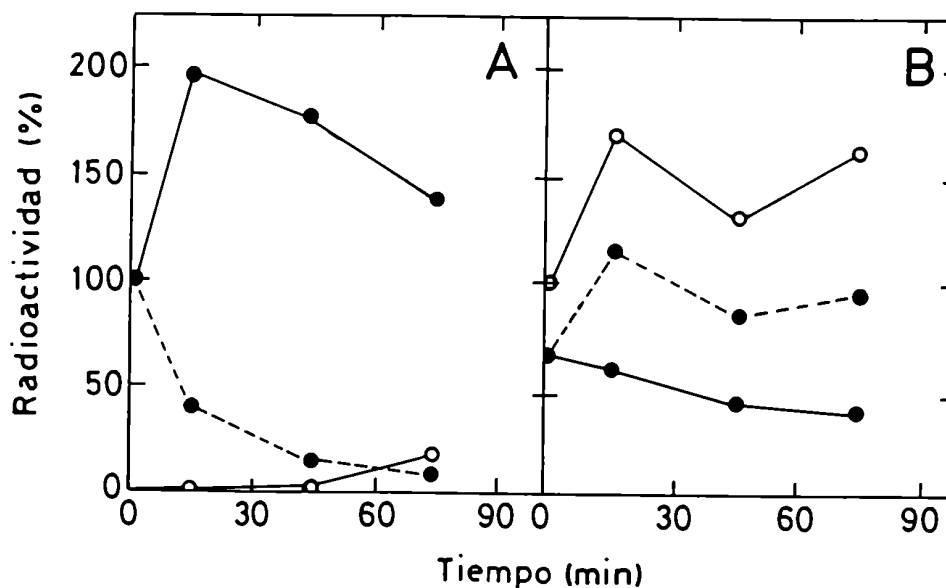


Figura 26: Reversibilidad del efecto de CPZ.

Se incubaron dos alícuotas de células de Sarcoma 180, resuspendidas a una concentración de 6×10^6 /ml, durante 1 h a 37°C una de ellas en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$. Al cabo de ese tiempo las células fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en medio fresco. La fracción que recibió CPZ fue dividida en dos alícuotas y se volvió a agregar CPZ $60 \mu\text{M}$ a una de ellas. Las células fueron reincubadas a 37°C y se dieron pulsos de 15 min con $3 \mu\text{Ci}$ $(^3\text{H})\text{dCyd}$ a los tiempos indicados en la figura. (o - o) sin agregados, (● - ●) incubadas 1 h con CPZ, lavadas y reincubadas con CPZ, (● --- ●) incubadas 1 h con CPZ, lavadas y reincubadas sin CPZ. Al final del experimento se determinó la radioactividad en la fase orgánica (A) y en el DNA (B) como se describió en Materiales y Métodos. La radioactividad indicada a tiempo cero representa la radioactividad incorporada antes de lavar. Los resultados están expresados como porcentaje de los valores obtenidos para la alícuota con (A) o sin CPZ (B). Cada punto representa el promedio de tres experimentos distintos.

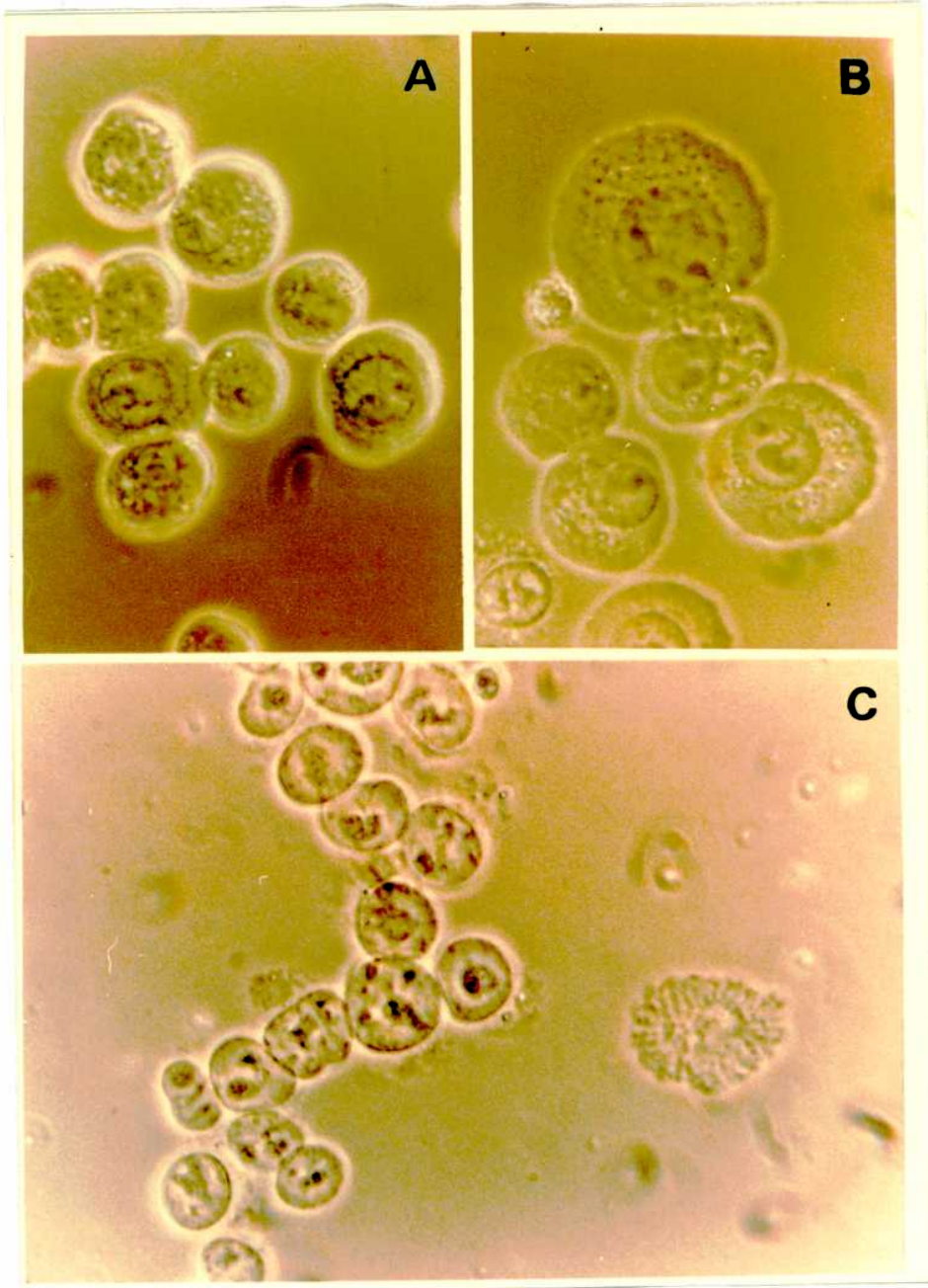


Figura 27: Fotografías de células y núcleos aislados de Sarcoma 180

- A) Células resuspendidas en MEM-HEPES.
- B) Células resuspendidas en medio de permeabilización.
- C) Núcleos aislados.

Las fotografías fueron tomadas con una cámara Zeiss adosada a un microscopio de contraste de fases Zeiss. Aumento 1.000X.

Condición experimental	Síntesis de Ptd-dCMP en		
	Células intactas (cpm)	Células permeabilizadas (cpm)	Núcleos aislados (cpm)
Sin agregados	377	3.181	1.198
CPZ 60 μ M	11.757	6.992	1.822
Ac.fosfatídico 1 mM	1.830	4.244	7.949
CPZ 60 μ M + ác.fosfatídico 1 mM	8.247	7.222	6.887
Ac.fosfatídico 1 mM+ Inositol 10 mM	n.d.	n.d.	1.005

Tabla 7: Factores que afectan la síntesis de Ptd-dCMP en diferentes sistemas.

Células de Sarcoma 180, lavadas dos veces con medio de cultivo, se dividieron en 3 alícuotas: una fue resuspendida en MEM-HEPES (células intactas); la segunda fue permeabilizada como se describe en el punto 4.4. de Materiales y Métodos y la tercera fue lisada para obtener la fracción nuclear (ver punto 3.1. de Materiales y Métodos). Las incubaciones se llevaron a cabo con 5×10^6 células o núcleos durante 30 min a 37°C. Los compuestos se agregaron a las concentraciones indicadas en presencia de 3 μ Ci de (3 H)dCyd o (3 H)dCTP. El ácido fosfatídico se agregó como dispersión acuosa (10 mM) sonicada. El material lipídico se obtuvo como se describió en Materiales y Métodos. Los valores representan el promedio de dos experimentos diferentes. n.d.: no determinado.

en núcleos aislados, donde el Ptd-A estimuló casi siete veces la síntesis de Ptd-dCMP. Este efecto fue prevenido por el agregado de inositol. La combinación de ambas drogas no fue aditiva.

La interpretación de estos resultados es que el Ptd-dCMP, por tener un alto turnover, no puede ser detectado en células intactas a menos que el metabolismo celular sea alterado, ya sea por el agregado de drogas o por permeabilización. La CPZ estimula la síntesis de Ptd-dCMP por al menos dos mecanismos: por un lado bloquea la hidrólisis del liponucleótido y por otro lado aumenta los niveles endógenos de ácido fosfatídico inhibiendo la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa. Esta sería la razón por la cual el efecto observado con CPZ es mayor que con ácido fosfatídico agregado exógenamente. El hecho que la combinación de ambas drogas no produzca un efecto aditivo sugiere una utilización preferencial de moléculas de ácido fosfatídico unidas a membrana por parte de la enzima que sintetiza el liponucleótido, como es el caso de las moléculas que se generan por acción de la CPZ. Esta interpretación está avalada por los resultados obtenidos por Van Heusden y Van der Bosch con CTP;fosfatidato citidilil-transferasa de origen microsomal (78).

Con respecto a las células permeabilizadas, evidencias indirectas indican que la CPZ no bloquea la hidrólisis en dicho sistema, y, dado que aún así estimula la síntesis de Ptd-dCMP, es de suponer que está actuando a través del aumento de ácido fosfatídico endógeno. Es posible que por estas razones el efecto de CPZ en células permeabilizadas de diversos sistemas siempre fue menor que en células intactas. Es necesario agregar que esta observación puede ser debida, además, al Ca^{2+} presente en la mezcla de permeabilización, como se verá en el próximo punto.

Los resultados obtenidos con ácido fosfatídico y CPZ en núcleos aislados sugieren una diferente distribución subcelular de las enzimas responsables del metabolismo de Ptd-dCMP. Recientemente se ha reportado que en retina bovina la actividad de fosfatídico-fosfohidrolasa es máxima en microsomas y mínima en núcleo (308); ésta podría ser la causa del pobre efecto estimulador de la CPZ en dicha fracción subcelular.

III.4. Rol del Ca^{2+} en el efecto estimulador de CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Los primeros estudios realizados en linfocitos humanos permeabilizados revelaron que la síntesis de Ptd-dCMP requería Ca^{2+} (24). Por otra parte, las fenotiazinas han demostrado ser potentes inhibidores del receptor intracelular del Ca^{2+} : la calmodulina (CaM) (115). Para que estas drogas se unan a la CaM se necesita Ca^{2+} . La interacción del Ca^{2+} con CaM cambia la conformación de la proteína, exponiendo regiones lipofílicas a las que se unen las fenotiazinas impidiendo que las reacciones mediadas por el sistema Ca-CaM tengan lugar (309,310).

Con el objeto de investigar el rol del Ca^{2+} en el efecto estimulador de la CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP, se permeabilizaron células de Sarcoma 180 en presencia o ausencia de Ca^{2+} exógeno y se midió el efecto de CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP. En la Tabla 8A se muestran los resultados de este experimento. Se puede observar que i) en ausencia de Ca^{2+} exógeno la CPZ estimuló la síntesis de Ptd-dCMP, ii) el Ca^{2+} estimula la reacción y iii) los efectos del Ca^{2+} y CPZ no son aditivos.

Dado que la CPZ podría estar movilizándolo Ca^{2+} endógeno que diera cuenta del efecto observado, se agregó un exceso de EGTA, quelante de Ca^{2+} que puede entrar fácilmente en las células permeabilizadas. Los resultados obtenidos (Tabla 8B) indican que i) la CPZ estimula la síntesis de Ptd-dCMP en ausencia total de Ca^{2+} , ii) el EGTA fue efectivo para bloquear el efecto estimulador del Ca^{2+} y iii) una parte del efecto estimulador de la CPZ se bloquea en presencia de EGTA. Esta conclusión surge de comparar las cuentas corregidas debidas a la CPZ en ausencia de EGTA (1) con las cuentas corregidas debidas a la CPZ en presencia de EGTA (2):

$$(1) 8.025 - 2.130 = 5.895 \text{ cpm}$$

$$(2) 3.327 - 687 = 2.640 \text{ cpm (55\% de inhibición)}$$

Este efecto es aún más marcado cuando se analizan los resultados obtenidos en presencia de Ca^{2+} exógeno, donde el efecto inhibitorio del EGTA es del 86%.

Un experimento similar realizado para medir los efectos de Ca^{2+} y CPZ

Células permeabilizadas	Síntesis de Ptd-dCMP (cpm)	
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
A) Control	2.130	9.408
CPZ 60 μM	8.025	27.303
B) Control + EGTA 1 mM	687	573
CPZ + EGTA	3.327	3.114

Tabla 8: Rol de Ca²⁺ en el efecto estimuladorio de la CPZ sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Las células de Sarcoma 180, obtenidas por paracentesis, se lavaron extensamente en PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ y se resuspendieron en la mezcla de permeabilización descrita en Materiales y Métodos pero omitiendo el Ca²⁺. Se incubaron 6x10⁶ células en 0.3 ml de dicha mezcla con 3,3 μM de (³H)dCTP y los agregados que figuran en la tabla en presencia o ausencia de Cl₂Ca 0.2 mM. Al cabo de 60 min a 37°C, las células se centrifugaron y se extrajo el material lipídico como figura en Materiales y Métodos.

sobre la síntesis de Ptd-CMP reveló que el catión estimula la síntesis de este liponucleótido, aunque en bastante menor proporción que la del Ptd-dCMP (Tabla 9). Si bien la CPZ estimuló la síntesis de Ptd-CMP en todas las condiciones estudiadas, la magnitud de dicha estimulación fue independiente de la presencia de Ca^{2+} .

La interpretación de estos resultados es complicada. Se sabe que la CPZ puede desplazar Ca^{2+} unido a fosfolípidos de membrana, compitiendo con él a razón de dos moléculas de CPZ por una de Ca^{2+} (311). Esto podría explicar los resultados obtenidos con Ptd-dCMP donde se vio que parte del efecto de CPZ podía ser atribuido a una movilización de Ca^{2+} por la droga.

Ha sido descripto que una triglicérido-lipasa puede ser activada en presencia de Ca^{2+} lo que conduce a la formación de 1,2 diglicérido y a un aumento en la síntesis de ácido fosfatídico (312). Estas observaciones permitirían explicar el efecto estimulador del Ca^{2+} sobre la síntesis de Ptd-dCMP y Ptd-CMP pero no explican por qué el efecto es mayor sobre el primero que sobre el segundo. Por otra parte, tanto la fosfatidato-fosfohidrolasa como la CTP:fosfatidato citidililtransferasa y la enzima que degrada Ptd-CMP se miden en ausencia de Ca^{2+} y presencia de EGTA (110,307).

Resulta atractivo pensar que el Ca^{2+} podría estar activando selectivamente una dCTP:fosfatidato citidililtransferasa. Esta posibilidad será discutida en el capítulo siguiente.

III.5. Efecto de la deoxicitidina en la reversión del efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA.

Con el objeto de profundizar el estudio del efecto de la CPZ sobre la síntesis de DNA, se decidió investigar si dicha inhibición se debía a una redirección de las moléculas de dCTP hacia la membrana para sintetizar Ptd-dCMP, de tal manera que el dCTP se convirtiera en limitante para la síntesis de DNA. Si esto fuera así, cabría esperar que la adición de dCyd en cantidades apropiadas restaurara la síntesis de DNA a los valores de las células no tratadas con la droga.

El experimento se realizó utilizando (^3H)dThd como precursor ya que la adición de dCyd fría variaría la actividad específica de (^3H)dCyd si esta se usara como precursor y no serviría para evaluar una reversión de la síntesis

Células permeabilizadas	Síntesis de Ptd-CMP (cpm)	
	-Ca ²⁺	+Ca ²⁺
A) Control	631	1.339
CPZ 60 μM	2.632	2.830
B) Control + EGTA	653	455
CPZ + EGTA	2.382	2.393

Tabla 9: Rol de Ca²⁺ en el efecto estimuladorio de la CPZ sobre la síntesis de Ptd-CMP.

El experimento es igual al descrito en la Tabla 8 con la única diferencia que las células se permeabilizaron en presencia de 3,4 μM (³H)CTP.

de DNA. Previamente se verificó que la incorporación de (³H)dThd a la fase orgánica es despreciable.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 28A, donde se puede observar que la dCyd no revirtió el efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA. Por el contrario, se observó una potenciación del efecto de la CPZ ya que la concentración de dCyd utilizada no afectó la incorporación de (³H)dThd al DNA cuando se la agregó sola.

Es de hacer notar, sin embargo, que el efecto inhibitorio de la CPZ es menos evidente cuando se lo estudia utilizando (³H)dThd.

III.6. Efecto de la CPZ sobre el transporte de (³H)dCyd.

Dado que se ha reportado que las alteraciones que provoca la CPZ a nivel de la membrana plasmática modifican el transporte de numerosas moléculas incluyendo nucleósidos (313,314), se investigó la posibilidad que también alterara el transporte de (³H)dCyd. En la Figura 28B se observa que esto no es así. En efecto, la CPZ a una concentración de 60 μ M no modificó la entrada de dCyd a 0°C ó 37°C.

III.7. Efecto de la CPZ sobre la síntesis de DNA en diferentes sistemas.

Un estudio similar al realizado para investigar la síntesis de Ptd-dCMP en distintos sistemas reveló que el efecto inhibitorio de la CPZ sobre la síntesis de DNA se mantiene cuando las células son permeabilizadas y se pierde al medir su efecto sobre núcleos aislados. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 10. Es importante señalar que la síntesis de DNA disminuye en la medida en que se altera la integridad celular, siendo la incorporación de (³H)dCTP en núcleo aislado menor del 10% con respecto a la que se obtiene con el mismo trazador en células permeabilizadas.

En base a estos resultados se puede concluir que la CPZ inhibe la síntesis de DNA por un mecanismo que no involucra una alteración en el transporte de dCyd, ni una pérdida de viabilidad de las células, ni una depleción en el pool de dCTP como consecuencia de la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP. Teniendo en cuenta que la CPZ no inhibe la síntesis de DNA en núcleos aislados, y si lo hace en células permeabilizadas, parece probable que en dicha

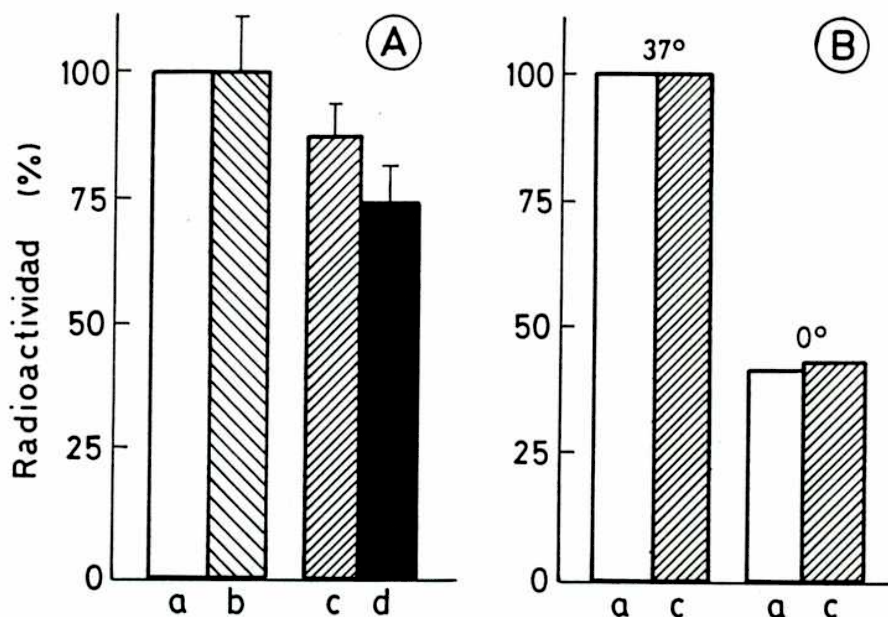


Figura 28: Efecto de la CPZ sobre la síntesis de DNA (A) y sobre el transporte de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ (B).

Panel A: Se incubaron células de Sarcoma 180 durante 1 h a 37°C en presencia de $(^3\text{H})\text{dThd}$ como se describió en el punto 4.3. de Materiales y Métodos, con a) sin agregados, b) dCyd 1,8 μM , c) CPZ 60 μM , d) CPZ 60 μM y dCyd 1,8 μM . Al finalizar el experimento, la radioactividad remanente en el precipitado ácido-insoluble, luego de la extracción de lípidos, fue determinada como se describió en el punto 4.2. de Materiales y Métodos. Cada barra representa el promedio de tres experimentos distintos \pm S.D.

Panel B: Se incubaron 25×10^6 células de Sarcoma 180 en 1 ml de PBS conteniendo glucosa 1 mg/ml en presencia (c) o ausencia (a) de CPZ 60 μM y $(^3\text{H})\text{dCyd}$ 1 μM durante 30 min a 0°C o 37°C. Al cabo de ese tiempo las células se lavaron dos veces con PBS frío y la radioactividad incorporada se determinó como figura en el punto 4.1. de Materiales y Métodos.

Condición experimental	Síntesis de DNA en		
	Células intactas (cpm)	Células permeabilizadas (cpm)	Núcleos aislados (cpm)
Sin agregados	309.898	11.630	1.120
CPZ 60 μ M	248.741	8.081	1.372

Tabla 10: Efecto de la CPZ sobre la síntesis de DNA en distintos sistemas.

Los resultados corresponden a la radioactividad presente en el precipitado ácido-insoluble del experimento de la Tabla 7. Cada valor representa el promedio de dos experimentos diferentes. La mezcla de permeabilización utilizada contenía todos los dNTPs.

inhibición estén involucrados ciertos factores citoplasmáticos o de membrana que no son liberados al medio cuando la célula es permeabilizada.

Dos posibles candidatas para llevar a cabo este efecto son la CaM y la proteína-quinasa C ya que ambas han sido relacionadas con la proliferación celular y la CPZ ha sido efectiva para bloquear la actividad de ambas (115,116).

CAPITULO IV

ROL DEL Ptd-dCMP COMO INTERMEDIARIO EN LA BIOSINTESIS DE FOSFATIDIL-INOSITOL.

Como se ha visto en la Introducción, en células eucarióticas el Ptd-CMP es el intermediario activado del ácido fosfatídico en la biosíntesis de fosfolípidos acídicos como el fosfatidil-inositol, fosfatidil-glicerol y difosfatidil-glicerol o cardiolipina (70-72). La presencia de Ptd-dCMP en estas células plantea el interrogante de si ambos compuestos cumplen funciones similares.

En el capítulo anterior, así como en la Introducción, se presentaron resultados que sugerían que el Ptd-dCMP podía actuar como intermediario en la biosíntesis de Ptd-Ins. En efecto, el agregado de inositol en células intactas aumentaba la degradación de Ptd-(³H)dCMP (Figura 24). Un efecto similar se observaba en linfocitos permeabilizados, donde el agregado de inositol a células que habían incorporado (³H)dCTP, provocaba una dramática disminución de la radioactividad incorporada a la fase orgánica (Figura XI-Introducción).

En la Figura 29 se puede observar que este efecto es dosis-dependiente y específico para inositol, ya que el agregado de serina 1 mM o sn-glicerol-3-fosfato 1 mM, no provocaron ningún efecto sobre el Ptd-(³H)dCMP sintetizado en células permeabilizadas. Concentraciones mayores de estos compuestos fueron igualmente inefectivas. Hace unos años se ha reportado que las mitocondrias de hígado de rata pueden sintetizar Ptd-dCMP y que el mismo se utilizaría para la síntesis de fosfatidil-glicerol, fosfolípido muy abundante en dicha organela (22). La falta de efecto del sn-glicerol-3-fosfato en células permeabilizadas podría atribuirse a la falta de sensibilidad del método para detectar la síntesis de un fosfolípido cuantitativamente minoritario en células animales.

En la Figura 30 se observa que el agregado de inositol a células intactas previene el efecto estimulador de la CPZ sobre la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP.

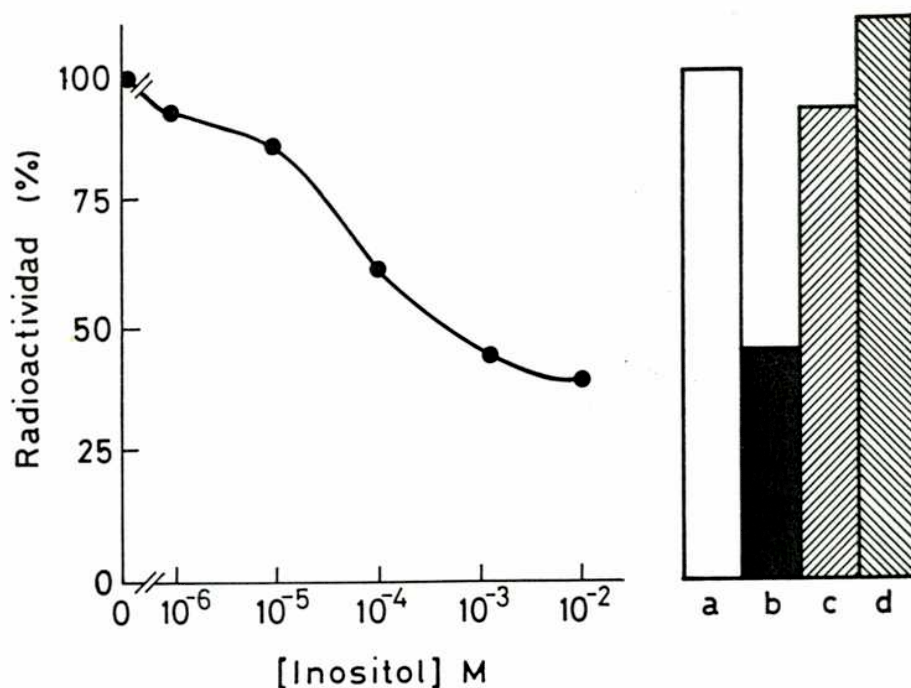


Figura 29: Inhibición de la acumulación de Ptd-(³H)dCMP por inositol en células permeabilizadas.

A) Se resuspendieron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,3 ml de mezcla de permeabilización, descrita en Materiales y Métodos, que contenía (³H)dCTP y se incubaron durante 1 h a 37°C. En ese momento se agregaron distintas concentraciones de inositol y las células fueron incubadas por otra hora a 37°C. El material lipídico se obtuvo como se describió en el punto de 4.2. de Materiales y Métodos. B) Comparación de los efectos de inositol 1 mM (b) serina 1 mM (c) y sn-glicerol-3-fosfato 1 mM (d) con respecto a células no tratadas (a). Cada punto representa el promedio de 2 experimentos distintos.

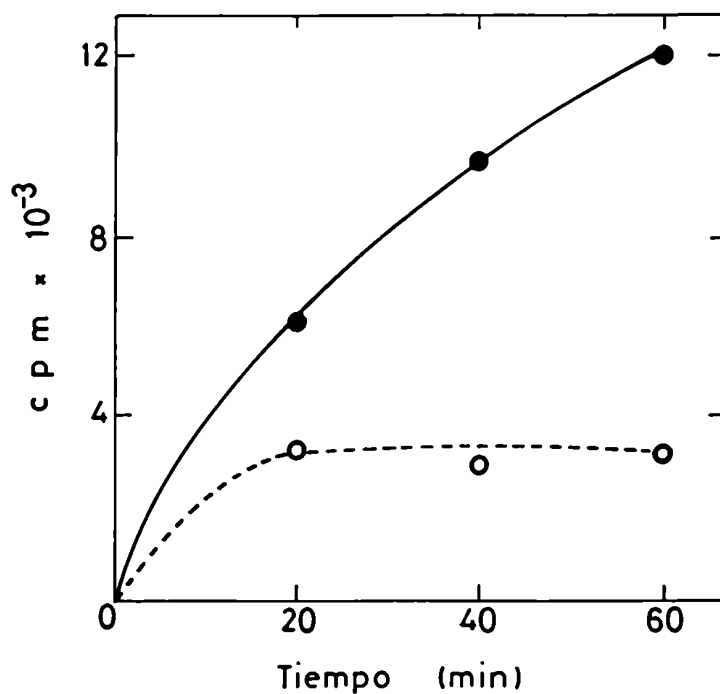


Figura 30: Efecto del Inositol sobre la síntesis de Ptd-dCMP en células intactas.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ (● - ●). Una serie de tubos recibió además Inositol 6 mM (○ --- ○). La incubación se realizó a 37°C durante distintos tiempos, al cabo de los cuales se extrajo el material lipídico y se determinó la radioactividad incorporada a dicha fracción.

IV.1. Liberación de (³H)dCMP dependiente de inositol.

Si la disminución de Ptd-(³H)dCMP provocada por el agregado de inositol fuera debida a la síntesis de Ptd-Ins, este evento debería estar acompañado por la liberación de (³H)dCMP.

Para realizar este experimento, se incubaron células de Sarcoma 180 con (³H)dCyd en presencia de CPZ 60 μ M y ara-C 10 μ M con el objeto de obtener una máxima síntesis de Ptd-(³H)dCMP y una mínima síntesis de (³H)DNA (ver Figura 6). Luego de remover la marca, las células se permeabilizaron y se incubaron en presencia o ausencia de inositol, determinándose la radioactividad en las células y en el sobrenadante de incubación.

Experimentos previos realizados en ausencia de ara-C no permitieron detectar diferencias en la radioactividad liberada al medio de incubación en presencia o ausencia de inositol. Se demostró que ello fue debido a que, durante la permeabilización, una pequeña fracción de DNA marcado con (³H)dCyd era hidrolizado, liberando (³H)dCMP al medio de incubación, lo que seguramente enmascaraba el efecto del inositol sobre el Ptd-(³H)dCMP. Estos resultados se muestran en la Figura 31, donde se puede apreciar que, cuando las células son permeabilizadas, comienzan a liberar radioactividad al medio a expensas de una disminución, pequeña pero significativa, de radioactividad en la fracción ácido-insoluble. Obsérvese también que la permeabilización favorece la acumulación de Ptd-(³H)dCMP.

Los resultados del experimento realizado en presencia de ara-C se encuentran en la Tabla 11. Se puede observar que la disminución de la radioactividad en el Ptd-dCMP extraído del pellet celular en presencia de inositol se correlaciona con el aumento de radioactividad detectada en el sobrenadante. El análisis cromatográfico de los sobrenadantes reveló un solo pico de radioactividad que co-cromatografió con auténtico dCMP (Figura 32).

El experimento muestra además, que en ausencia de inositol el Ptd-(³H)dCMP se degrada, probablemente a ácido fosfatídico, ya que se libera (³H)dCMP aunque el resultado también es compatible con una transformación a Ptd-Ins utilizando inositol endógeno.

Un experimento similar, pero utilizando (³H)Cyd como precursor, no permitió detectar diferencias en la liberación de (³H)CMP en presencia o ausencia

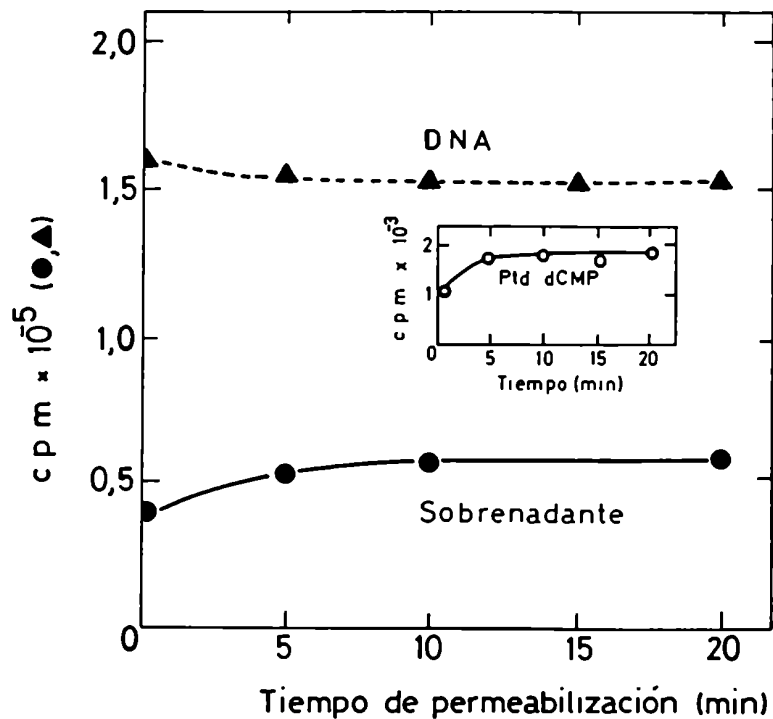


Figura 31: Efecto de la permeabilización sobre el Ptd-(³H)dCMP (o) y (³H) DNA (▲) sintetizados en células intactas.

Se incubaron $3,5 \times 10^6$ células HL-60 en 0,5 ml de MEM α -10% FBS con CPZ 60 μ M y 5 μ Ci de (³H)dCyd durante 1 h a 37°C. En ese momento las células se centrifugaron y se resuspendieron en 0,3 ml de mezcla de permeabilización fría incubándose durante distintos tiempos a 37°C. El material lipídico (o-o) y el DNA (▲-▲) fueron obtenidos como se describe en Materiales y Métodos. El sobrenadante de incubación en cada punto fue transferido a un vial que contenía 10 ml de solución centelleadora de Bray y se determinó su radioactividad en un contador de centelleo líquido (●-●).

Condiciones experimentales		Radioactividad presente en (cpm)		
Tiempo de incubación (min)	Agregado de Inositol	Pellet celular (Ptd-dCMP)	Sobrenadante Total	(3H)dCMP
0		18.848	5.655	n.d
60		11.754	13.577	13.262
60	+	1.034	23.059	19.545

Tabla 11: Liberación de (3H)dCMP a partir de Ptd-(3H)dCMP dependiente de Inositol.

Se incubaron 3×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$, ara-C $10 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ durante 60 min a 37°C . Las células fueron permeabilizadas durante 30 min con un medio de permeabilización sin dNTPs, centrifugadas y resuspendidas en medio de permeabilización fresco con o sin inositol 10 mM ($t=0$). Luego de 60 min a 37°C se midió la radioactividad presente en las células y en los sobrenadantes de incubación. El contenido de Ptd- $(^3\text{H})\text{dCMP}$ se determinó como figura en el punto 4.2. de Materiales y Métodos pero fue medida con solución centelleadora de Bray. Una alícuota de los sobrenadantes se transfirió a un vial que contenía 10 ml de solución centelleadora de Bray y el resto se cromatografió y se determinó la radioactividad que co-cromatografió con auténtico dCMP (ver Figura 32). n.d: no determinado.

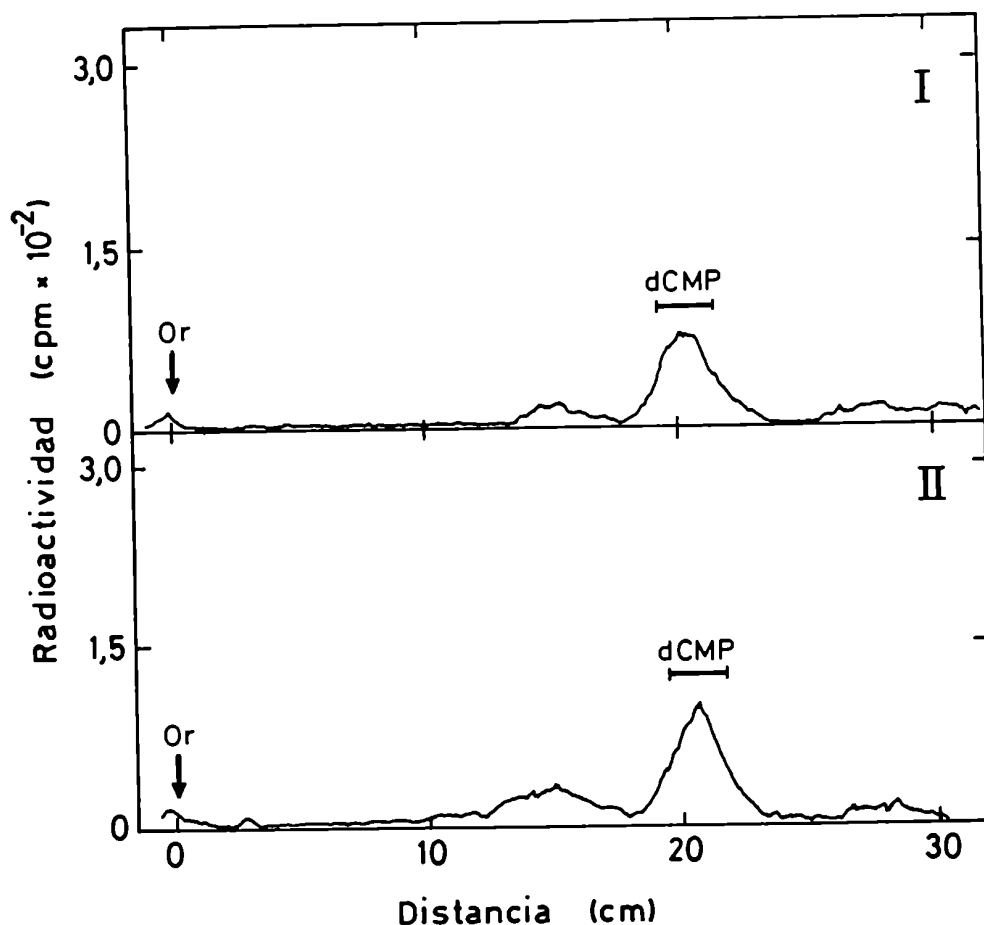


Figura 32: Radio-cromatograma de los sobrenadantes de incubación en presencia (II) y ausencia (I) de inositol.

Los sobrenadantes de incubación del experimento descrito en la Tabla 11 fueron concentrados y sembrados en papel Whatman N° 1 como se describe en la sección 5 de Materiales y Métodos, con standards internos de dCTP, dCDP y dCMP. Los mismos fueron revelados por exposición del cromatograma a luz ultravioleta. El pico que co-cromatografió con dCMP fue cortado y su radioactividad fue determinada usando solución centelleadora de Bray. Las cpm obtenidas se corrigieron por el quenching del papel. El factor de corrección se calculó dividiendo la radioactividad de 0,2 μ Ci de (³H)dCTP por las cpm que presenta el mismo trazador en un trozo de papel Whatman de dimensiones similares a las del pico.

de inositol. Dado que el ara-C no bloquea la entrada de (^3H)CMP al RNA, posiblemente sea necesario agregar algún inhibidor de la síntesis de esta macromolécula para minimizar la liberación de (^3H)CMP proveniente de ella. En la Tabla 12 se muestra que pese a no haber encontrado diferencias en el sobrenadante de incubación, la cantidad de Ptd-(^3H)CMP disminuyó sensiblemente por el agregado de inositol.

IV.2. Síntesis de Ptd-Ins a partir de Ptd-dCMP en microsomas de Sarcoma 180.

Debido a que los resultados presentados en la Tabla 11 podrían plantear la posibilidad de que el inositol disminuya la cantidad de Ptd-(^3H)dCMP por activación de la reacción de degradación, se realizó un experimento tendiente a demostrar en forma más directa que la reacción de transformación a Ptd-Ins tiene lugar.

Para ello, se incubaron microsomas de Sarcoma 180 con (^3H)Ins en presencia o ausencia de Ptd-dCMP purificado. La elección de esta fracción subcelular obedece al hecho que es la que posee una máxima actividad de Ptd-Ins sintetasa (86,102).

IV.2.1. Obtención de Ptd-dCMP purificado.

Este liponucleótido fue obtenido a partir del extracto lipídico de células permeabilizadas incubadas con (^3H)dCTP y CPZ durante 1 h a 37°C . El extracto lipídico fue concentrado bajo N_2 y cromatografiado en placa delgada en un sistema de solventes que permite su completa separación de Ptd-CMP (22). Como se observa en la Figura 33, este último compuesto es retenido en el origen debido a que el ácido bórico con que fue impregnada la placa de silicagel forma complejos con grupos hidroxilos vecinos. El Ptd-dCMP, al carecer del hidroxilo en la posición 2 de la ribosa, no es retenido y puede correr en el solvente de corrida utilizado.

El Ptd-dCMP fue recuperado de las secciones en que fue cortado el cromatofolio para analizar la posición del compuesto radioactivo ya que el mismo no se solubiliza en la solución centelleadora. Como se describió en la sección 6.2. de Materiales y Métodos, el liponucleótido fue extraído de la sílica con una mezcla de cloroformo-metanol y agua y se llevó a sequedad con

Condiciones experimentales		Radioactividad presente en (cpm)	
Tiempo de incubación (min)	Agregado de Inositol	Pellet celular (Ptd-CMP)	Sobrenadante Total
0		2.720	6.515
60		1.348	32.625
60	+	294	26.326

Tabla 12: Efecto del Inositol sobre Ptd-(³H)CMP sintetizado en presencia de CPZ y ara-C.

El diseño experimental es idéntico al experimento de la Tabla 11; ambos fueron realizados en paralelo.

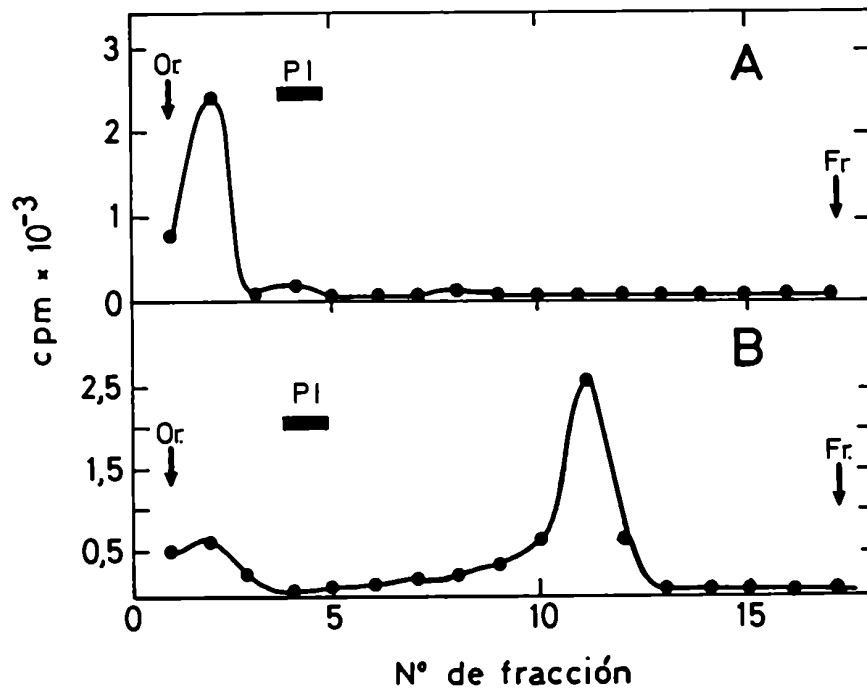


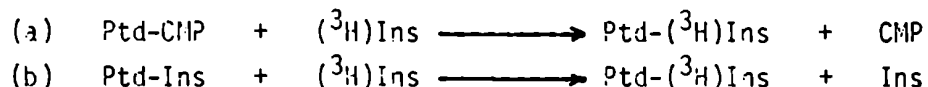
Figura 33: Separación cromatográfica de Ptd-CMP (A) y Ptd-dCMP (B).

Las fases orgánicas de células permeabilizadas incubadas con CPZ y (³H)CTP (A) o (³H)dCTP (B) fueron concentradas bajo N₂ y cromatografiadas en una placa de Silicagel-G impregnada con ácido bórico 0,4 M. El solvente de corrida utilizado fue cloroformo-metanol-agua-amoniaco 70:38:2:8. El cromatograma muestra la posición donde corrió un standard de fosfatidil-inositol (PI) que fue revelado con vapores de I₂. El Ptd-dCMP fue posteriormente recuperado de las fracciones 9-10-11 y 12 (B) tal como se describe en la sección 6.2. de Materiales y Métodos.

112.

IV.2.2. Incubación de microsomas con (³H)Ins en presencia de Ptd-dCMP.

Es sabido que el (³H)Ins se incorpora a Ptd-Ins a través de dos reacciones distintas (86):



La reacción (a), llamada de transferencia, representa una real síntesis de Ptd-Ins; la enzima que cataliza esta reacción se encuentra fundamentalmente unida a membranas del retículo endoplásmico pero en menor proporción también se encuentra en la membrana plasmática. La reacción tiene un pH óptimo de 8,5-8,6 y ocurre en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} .

La reacción (b), llamada de intercambio, está catalizada por una enzima diferente a la anterior que se encuentra localizada exclusivamente en el retículo endoplásmico. Esta reacción se activa solamente en presencia de Mn^{2+} como catión bivalente y tiene un pH óptimo de 7,4-7,5.

La síntesis de Ptd-Ins utilizando como sustrato Ptd-dCMP fue determinada en un medio que contenía Mg^{2+} como catión bivalente y un buffer glicil glicina pH 8,6. En estas condiciones sólo tiene lugar la reacción de transferencia. El resultado de este experimento se muestra en la Tabla 13. Se puede observar que el agregado de Ptd-dCMP provoca una gran estimulación de la incorporación de (³H)Ins a la fase orgánica luego de 30 min. de incubación. El análisis cromatográfico de los extractos lipídicos reveló que en esta situación se sintetizó un compuesto radioactivo que cromatografió con un Rf muy similar al Ptd-Ins usado como compuesto de referencia (Figura 34 I). La incorporación observada a tiempo cero refleja la presencia del sustrato marcado (Ptd-(³H)dCMP), que pudo ser separado del Ptd-(³H)Ins por cromatografía en placa delgada (Figura 34 III). Los picos que corrieron con el frente del solvente no fueron identificados.

Estos resultados demuestran que el Ptd-dCMP puede ser eficientemente transformado a Ptd-Ins en la fracción microsomal de células de Sarcoma 180.

<u>Condiciones experimentales</u>		Radioactividad incorporada
Agregados	Tiempo (min)	(cpm/mg proteína)
Nada	30	1.466
Ptd-dCMP	0	6.970
Ptd-dCMP	30	40.086

Tabla 13: Incorporación de (³H)Ins a Ptd-Ins en microsomas de Sarcoma 180.

Se incubaron 0,1 ml de microsomas (conteniendo 300 µg de proteínas) en ausencia o presencia de 25 nmoles de Ptd-(³H)dCMP (160 cpm/nmol) con 75 nmoles de (³H)Ins (33 Ci/mol) durante los tiempos indicados a 37°C. Las condiciones de incubación y la extracción de los lípidos están descritas en la sección 7 de Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como radioactividad en la fase orgánica por mg de proteína microsomal. El análisis cromatográfico de estas fracciones reveló un pico de Ptd-Ins sólo en la última condición (ver Figura 34).

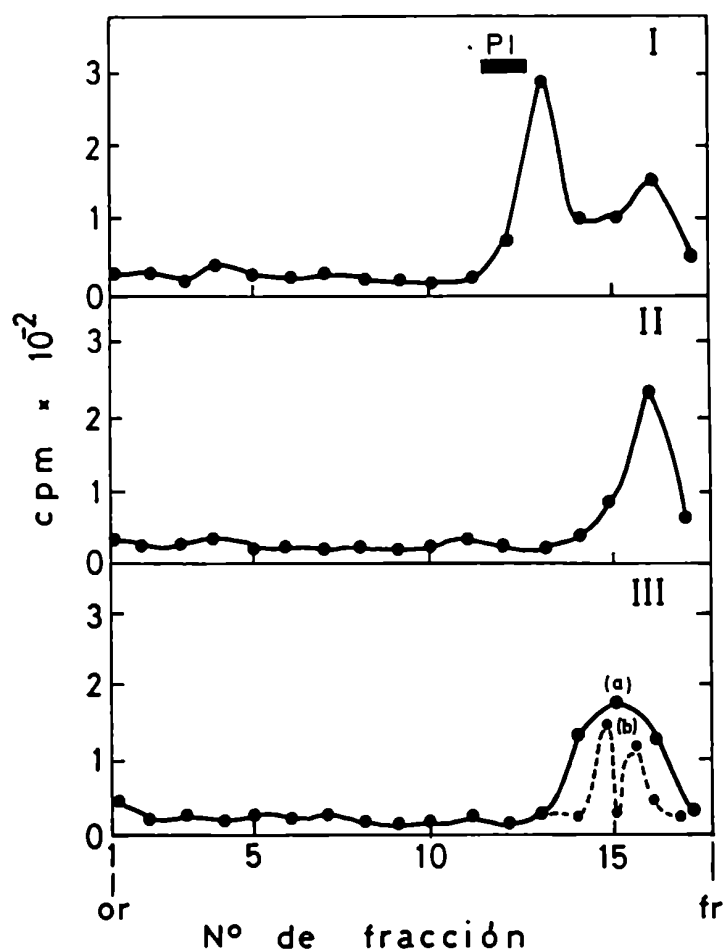


Figura 34: Radio-cromatograma de los extractos lipídicos obtenidos de microsomas incubados con (³H)Ins en presencia (I) y ausencia (II) de Ptd-dCMP.

Los extractos lipídicos del experimento descrito en la Tabla 13 se cromatografiaron en placas de silicagel G usando como solvente de corrida cloroformo-metanol-agua-amoniaco 70:38:7:3. Como standard externo se utilizó fosfatidil-Inositol (PI) de levaduras (Sigma).

- I) Microsomas incubados con (³H)Ins en presencia de 25 nmoles de Ptd-(³H)dCMP (160 cpm/nmol) durante 30 min a 37°C.
- II) Microsomas incubados con (³H)Ins sin agregado de liponucleótido exógeno durante 30 min a 37°C.
- III) Control de tiempo cero: microsomas + (³H)Ins + 25 nmoles de Ptd-(³H)dCMP (160 cpm/nmol); las líneas punteadas indican que el pico obtenido en este cromatograma puede ser resuelto en dos picos cuando se cortan las fracciones 14-15 y 16 por la mitad. El pico (a) correspondería a Ptd-dCMP y el pico (b), no identificado, corre como los picos obtenidos en los cromatogramas I y II.

IV.3. Cuantificación de la cantidad de Ptd-dCMP y Ptd-CMP en células de Sarcoma 180.

Para cuantificar la cantidad de ambos liponucleótidos se determinó la cantidad de fósforo presente en Ptd-dCMP y Ptd-CMP purificados de células permeabilizadas. Para ello, se incubaron separadamente células permeabilizadas con (³H)dCTP y (³H)CTP durante 1 h a 37°C. Se realizó una extracción cuantitativa de las fases orgánicas y se separó una alícuota para determinar el contenido total de fósforo de fosfolípidos.

Dado que en el sistema cromatográfico utilizado en el experimento anterior (Figura 33) el Ptd-CMP queda retenido en el origen, se decidió correr los extractos en ausencia de ácido bórico para permitir que el liponucleótido migre y poder obtenerlo más purificado.

Como se observa en la Figura 35, aún en ausencia de ácido bórico fue posible separar Ptd-dCMP y Ptd-CMP. Posteriormente se juntaron las fracciones donde salía cada compuesto y se realizó la elución de los mismos recuperándose el 98% de la marca presente en la sílica.

La determinación de fósforo se realizó mineralizando las muestras y luego efectuando una reacción de Fiske SubbaRow modificada, tal como se describió en el punto 9.4 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14. Como puede observarse, en las condiciones en que se realizó el experimento se sintetizaron cantidades similares de ambos liponucleótidos.

Posteriormente se intentó comparar la eficiencia con que ambos sustratos son transformados a Ptd-Ins, pero por diversos motivos (insuficiente cantidad de muestra, inactivación de la enzima microsomal y otros) no fue posible obtener un resultado concluyente.

IV.4. Rol del inositol en la falta de detección de Ptd-dCMP en células intactas.

Los experimentos descriptos precedentemente demuestran que el Ptd-dCMP puede ser transformado a Ptd-Ins en microsomas aislados y probablemente también en núcleos aislados (Tabla 7). Sin embargo, estos experimentos no ofrecen

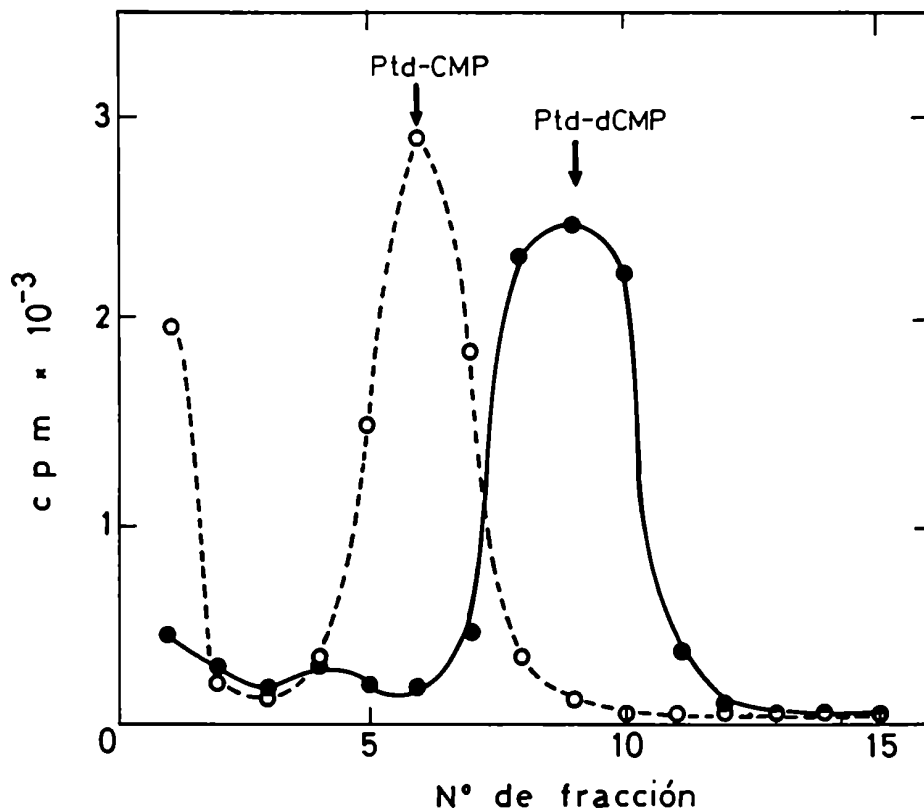


Figura 35: Separación cromatográfica de Ptd-CMP y Ptd-dCMP.

Las fases orgánicas de células permeabilizadas incubadas con CPZ y (³H)CTP o (³H)dCTP 3 μ M fueron concentradas bajo N₂ y cromatografiadas separadamente en una placa Silicagel-G como se describe en el punto 6.2. de Materiales y Métodos. El solvente de corrida utilizado fue cloroformo-metanol-agua-amoniaco 70:38:2:8. El pico que queda en el origen pudo ser extraído con agua por lo que se presume se trata de (³H)CTP. Las fracciones 5-6 y 7 del carril que contiene Ptd-(³H)CMP y las fracciones 8-9 y 10 del carril que contiene Ptd-(³H)dCMP fueron eluidas con cloroformo-metanol-H₂O (1:1:0,3).

Muestra	nmoles de fósforo	nmoles de liponucleot.	nmoles. de liponucleot.	%
			nmol. de P	
Extracto A	3.600,0			100
Ptd-dCMP	97,5	48,75	0,0135	1,35
Extracto B	3.700,0			100
Ptd-CMP	115,0	57,50	0,0155	1,55

Tabla 14: Contenido de Ptd-dCMP y Ptd-CMP en células de Sarcoma 180 permeabilizadas.

Los compuestos separados cromatográficamente en el experimento de la Figura 33 fueron cuantificados de acuerdo a su contenido en fósforo (1 mol de liponucleótido = 2 moles de fósforo). Se determinó también el contenido total de fósforo de los extractos lipídicos a partir de los cuales se obtuvieron los liponucleótidos.

una adecuada demostración de que in vivo el Ptd-dCMP es utilizado para tal fin.

Los experimentos de hidrólisis realizados en células intactas (Figura 24) indicaban que el Ptd-dCMP era degradado fundamentalmente a ácido fosfatídico, aunque el agregado de inositol exógeno estimulaba la transformación a Ptd-Ins, sugiriendo que en las condiciones en que se realizó el experimento el inositol endógeno fue limitante para depletar el liponucleótido acumulado.

Para probar de una manera más directa que existe una correlación entre la falta de detección de Ptd-dCMP en células intactas y su transformación a Ptd-Ins, las mismas se incubaron en un medio que no contenía inositol.

Como se observa en la Figura 36A, mientras que las células incubadas en el medio habitual (MEM-HEPES) no incorporan (^3H)dCyd a la fase orgánica, las células incubadas en un medio definido que contenía PBS, glucosa, Ca^{2+} y Mg^{2+} (Medio A) acumularon Ptd-dCMP al cabo de 30 min de incubación.

En la Figura 36B se puede apreciar que la síntesis de DNA no fue afectada por el cambio de medios y demuestra que la acumulación de Ptd-dCMP no modifica la síntesis de DNA.

La concentración habitual de inositol en el MEM es de $10\ \mu\text{M}$, por lo tanto si esa cantidad es suficiente para impedir la acumulación de Ptd-dCMP el agregado de la misma cantidad de inositol al Medio A debería revertir el efecto observado. Eso es lo que se muestra en la Tabla 15 (Exp. 1).

Los resultados presentados demuestran que la falta de detección de Ptd-dCMP en células intactas se debe a que éste es utilizado para la síntesis de Ptd-Ins. Dado que in vivo el aporte de inositol proviene del suero (o del medio de cultivo), cuando a las células se las priva de inositol el Ptd-dCMP se acumula. Más aún, la preincubación con ClLi , que provoca la depleción endógena de inositol por inhibición de la enzima inositol-1-fosfato fosfatasa, amplifica esta respuesta, siendo la misma evidente sólo cuando las células se incuban en medio A. Esto es así porque el inositol presente en el MEM contrarresta el efecto del Li^+ (Tabla 15, Exp. 2).

Es interesante señalar que, a pesar de que durante los 60 min de incubación en medio A la síntesis de DNA no se vio afectada, está descripto que el agregado de inositol a los medios de cultivo es esencial para el crecimiento de líneas celulares animales y humanas en particular (315). Posiblemente ello

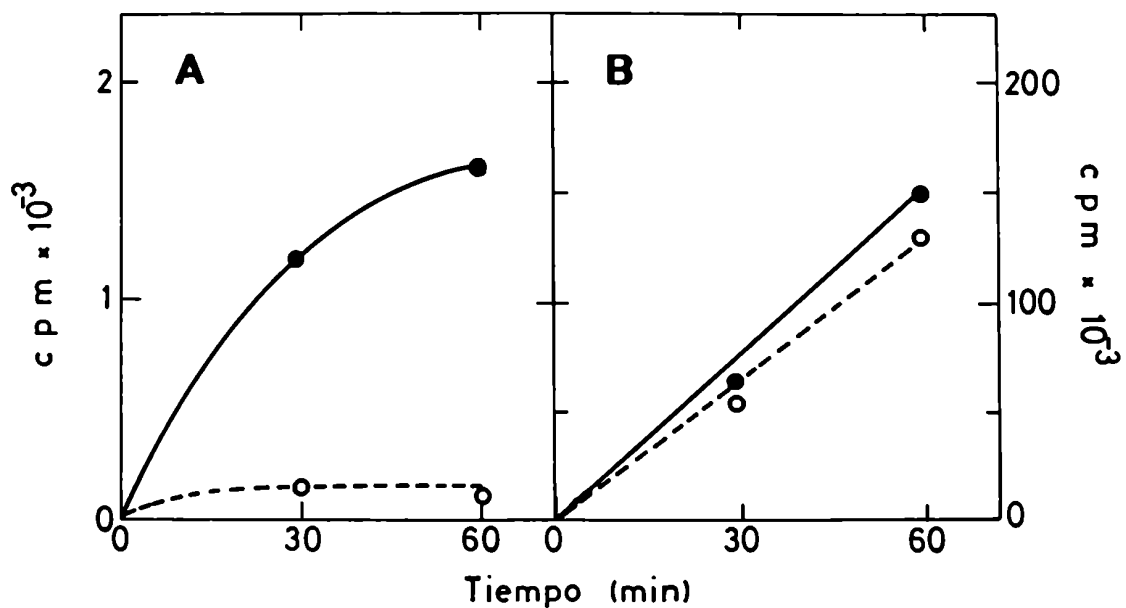


Figura 36: Incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ en células incubadas en un medio sin inositol.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de un medio que contenía PBS, glucosa 1 mg/ml, Cl_2Ca 1 mM, Cl_2Mg 1 mM (Medio A) ($\bullet - \bullet$) o bien en MEM-HEPES ($\circ - - - \circ$), con $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ durante distintos tiempos a 37°C . El material lipídico (A) y el DNA (B) se extrajeron como se describió en Materiales y Métodos.

Medios de Incubación	Incorporación de (³ H)dCyd a la fase orgánica (cpm)
Exp. 1	
MEM-HEPES	196
Medio A	1.322
Medio A + Inositol 10 μM	204
Exp. 2	
MEM-HEPES	155
MEM-HEPES + ClLi 10 mM	181
Medio A	2.519
Medio A + ClLi 10 mM	4.523

Tabla 15: Efecto del Inositol sobre la acumulación de Ptd-dCMP en células intactas.

Experimento 1: Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de c/u de los medios que figuran en la tabla con 3 μCi de (³H)dCyd durante 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo se extrajo el material lipídico como se describió en Materiales y Métodos.

El experimento 2 se realizó con 8×10^6 células/0,5 ml de los distintos medios con o sin ClLi 10 mM. Las células se pre-incubaron durante 15 min a 37°C al cabo de los cuales se agregaron 2 μCi de (³H)dCyd y la incubación prosiguió a 37°C durante 45 min más.

se deba al rol de los fosfoinosítidos como generadores de segundos mensajeros necesarios para la división celular.

IV.5. Efecto del quercetin sobre la biosíntesis de Ptd-dCMP.

El quercetin (QRC) es un bioflavonoide que está presente en forma libre o conjugada en muchas frutas y vegetales. Inhibe el crecimiento y proliferación de células malignas in vitro, la glicólisis aeróbica de células Ehrlich (316), la síntesis de DNA, RNA y proteínas (317), los sistemas ATPasa de varias fuentes animales (318-320) y eleva los niveles de AMPc por inhibición de la actividad fosfodiesterásica (321,322).

Más recientemente se ha encontrado que el QRC inhibe la fosforilación de proteínas catalizada por proteín-quinasa AMPc-independientes (323,324). Se ha postulado que el aumento en los niveles de AMPc y la inhibición de la actividad proteín-quinasa AMPc-independientes podrían dar cuenta de los efectos pleiotrópicos del QRC.

Una de esas proteín-quinasa es el producto del oncogene src, denominada pp60^{src} por ser una fosfoproteína de 60 KD de peso molecular. Localizada en la membrana plasmática, esta proteína exhibe una actividad de tirosina-quinasa independiente de AMPc tanto sobre sustratos intracelulares como extracelulares (325). La pp60^{src} presenta también actividad de glicerol-quinasa (326,327) y extractos purificados de la misma han sido eficientes para fosforilar 1,2 diglicérido y fosfatidil-inositol (246).

Tal como sucede con otras proteín-quinasa, el QRC inhibió la actividad de fosfotransferasa de esta proteína tanto in vitro como in vivo. Dicha inhibición fue competitiva con respecto al GTP y ATP usados como dadores de fosfato (328). También se demostró que el QRC inhibe la actividad de lípido-quinasa de la pp60^{src} in vitro (246).

Teniendo en cuenta estas últimas observaciones, se decidió investigar el efecto del QRC sobre la biosíntesis de Ptd-CMP y Ptd-dCMP utilizando para ello células de Sarcoma 180.

IV.5.1. Efecto del QRC sobre la síntesis de Ptd-dCMP en células intactas.

Para este estudio se utilizó un rango de concentraciones de QRC entre 20 y 100 μM ya que el mismo fue efectivo para inhibir la actividad de proteína-quinasa y lípido quinasa de pp60^{src} in vivo e in vitro respectivamente. Dado que el QRC se utiliza disuelto en DMSO, el mismo fue agregado a los controles sin droga.

Como se observa en la Figura 37A, el QRC estimuló la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP en forma dosis-dependiente, llegando a un plateau con una concentración de 60 μM . Paralelamente, la síntesis de DNA se vio inhibida con una DI_{50} de 26 μM (Figura 37B).

En presencia de CPZ 60 μM , el efecto estimulador del QRC sobre Ptd-dCMP fue aún mayor, y tanto las curvas de tiempo como de concentración revelaron que los efectos no son aditivos (Figura 38A y 39A). Por otra parte, el efecto inhibitorio del QRC sobre la síntesis de DNA fue superior al obtenido con CPZ (Figuras 38B y 39B). Dado que la combinación de ambas drogas no fue más efectiva que el QRC solo, es posible especular que estas drogas inhiben la síntesis de DNA a través de un mismo mecanismo, aunque la CPZ ejercería sólo un efecto parcial, que sería completado por el QRC.

Con el objeto de investigar si el QRC actúa a nivel de la degradación del Ptd-dCMP se realizó el experimento que se muestra en la Figura 40, donde se observa que el bioflavonoide bloquea parcialmente la degradación del liponucleótido. Dado que la CPZ bloquea totalmente la degradación del Ptd-dCMP, el efecto estimulador del QRC en presencia de CPZ podría deberse a dos causas: 1) bloqueo de la transformación a Ptd-Ins y/o 2) activación de la síntesis de Ptd-dCMP.

IV.5.2. Efecto del QRC sobre la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins.

Los primeros experimentos se realizaron con células permeabilizadas en presencia o ausencia de QRC 60 μM , a las que, luego de 30 min de incubación con (³H)dCTP se les agregó inositol frío durante otros 30 min. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 41. Se puede apreciar que el agregado de QRC a la mezcla de permeabilización no modificó el grado de

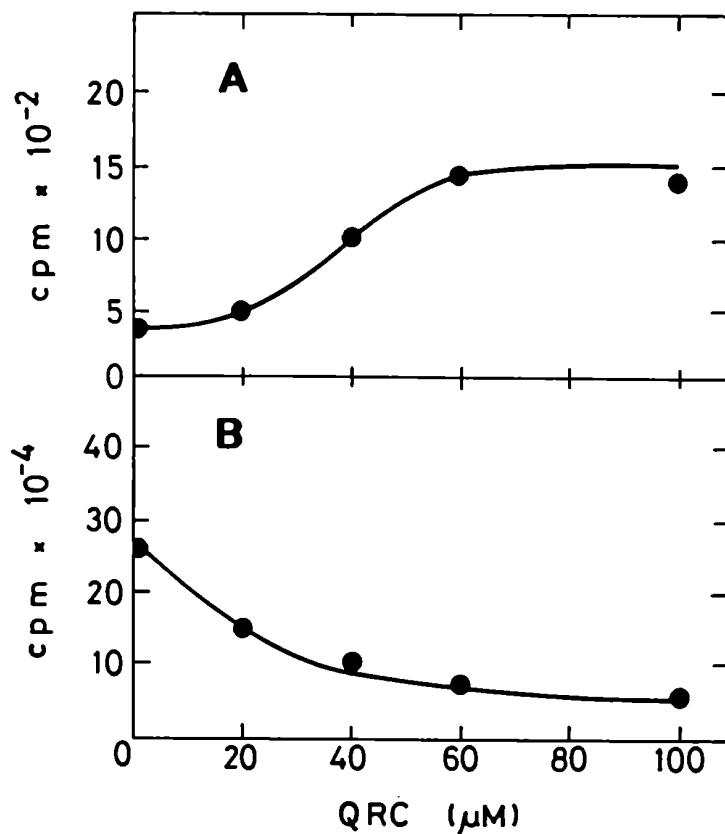


Figura 37: Efecto del quercetin sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ al Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en células de Sarcoma 180.

Se incubaron 6×10^6 células en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia de 3 μCi de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y cantidades variables de QRC. El mismo se agregó disuelto en DMSO. La incubación se llevó a cabo durante 60 min a 37°C , al cabo de los cuales se determinó la radioactividad incorporada a la fase orgánica (A) y al precipitado ácido-insoluble (B) como se describió en Materiales y Métodos.

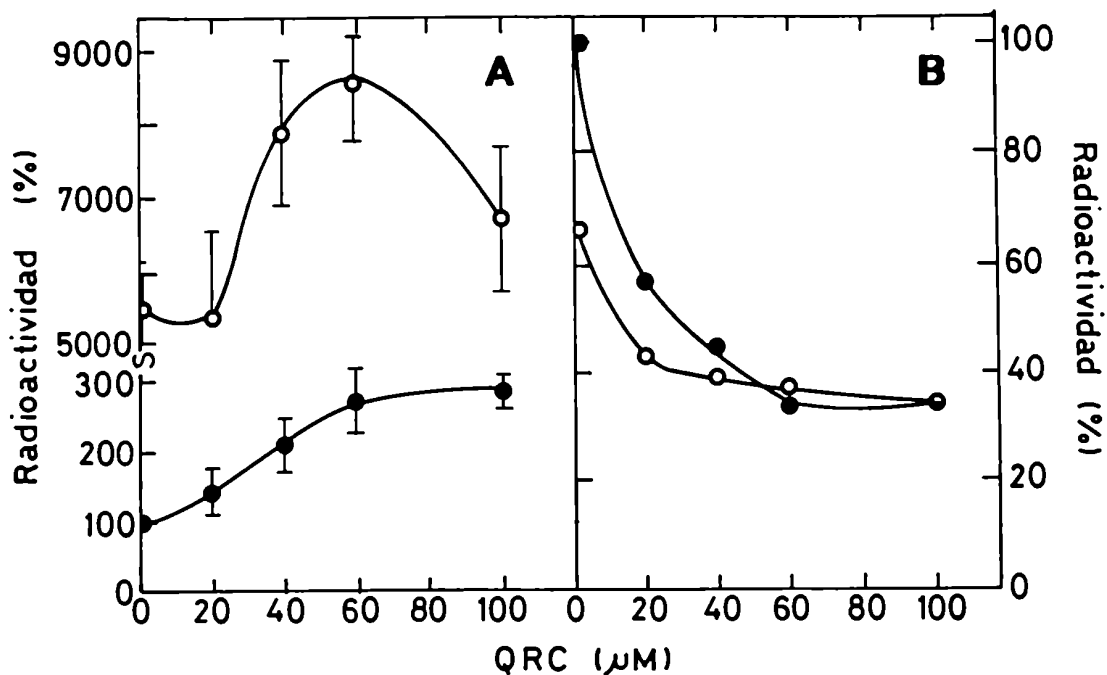


Figura 38: Efecto del QRC sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ al Ptd-dCMP (A) y DNA (B) en presencia de CPZ.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia (o) o ausencia (●) de CPZ 60 μM y cantidades variables de QRC, con 3 μCi de $(^3\text{H})\text{dCyd}$. La incubación se realizó a 37°C durante 60 min al cabo de los cuales se determinó la radioactividad presente en el extracto lipídico (A) y en el precipitado ácido-insoluble (B) como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados están expresados como porcentaje de la incorporación en ausencia de drogas. A= 382 ± 183 cpm (n=4); B=166.781 (n=2).

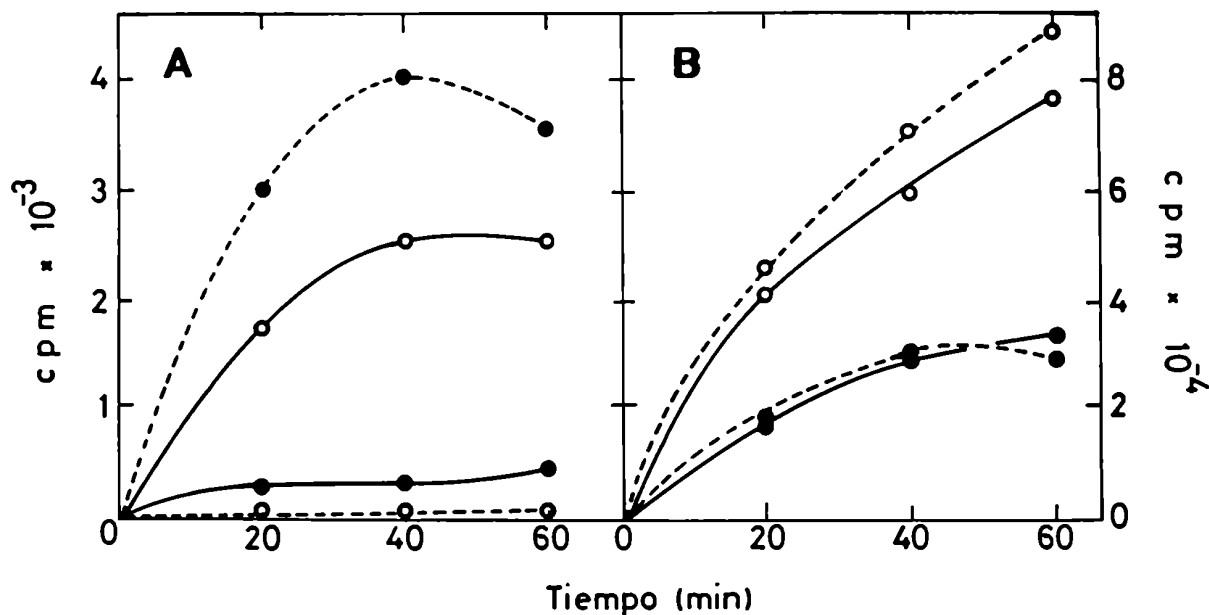


Figura 39: Efecto de QRC y CPZ sobre la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP (A) y DNA (B). Curva de tiempo.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES con QRC $60 \mu\text{M}$ (● - ●); CPZ $60 \mu\text{M}$ (o - o); QRC $60 \mu\text{M}$ + CPZ $60 \mu\text{M}$ (● -- ●); sin agregados (o -- o), en presencia de $3 \mu\text{Ci}$ de (³H)dCyd. La incubación se realizó a 37°C durante tiempos variables. El material lipídico (A) y ácido-insoluble (B) se obtuvieron como fue descrito en Materiales y Métodos.

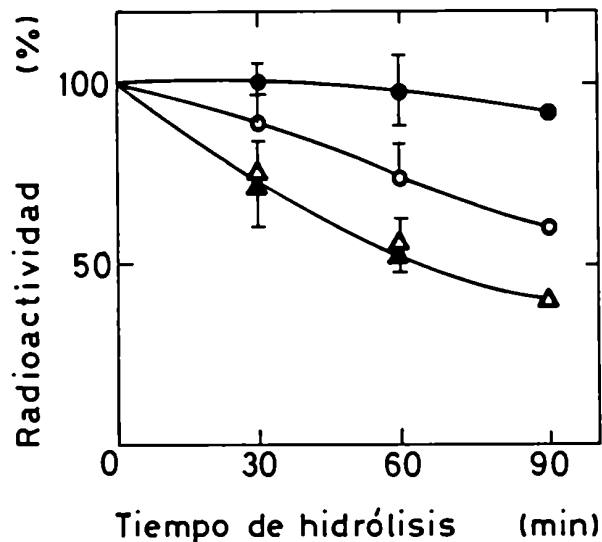


Figura 40: Comparación de los efectos de QRC y CPZ sobre la hidrólisis de Ptd-(³H)dCMP.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia de CPZ $60 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{Ci}$ de (³H)dCyd durante 30 min a 37°C. Al cabo de ese tiempo se agregó 1,5 ml de medio de cultivo frío, se centrifugó y se lavó con abundante medio de cultivo. Finalmente las células se resuspendieron en 0,5 ml de MEM-HEPES al que se agregó QRC $60 \mu\text{M}$ (o), CPZ $60 \mu\text{M}$ (●), DMSO 2% (▲), sin agregados (△) y se reincubaron a 37°C durante distintos tiempos. Los puntos representan el promedio de dos experimentos realizados por duplicado (n=4), expresados como porcentaje de la incorporación acumulada durante la incubación con la marca y las barras indican el error standard. Los puntos obtenidos a los 90 min y los valores con DMSO corresponden a n=2.

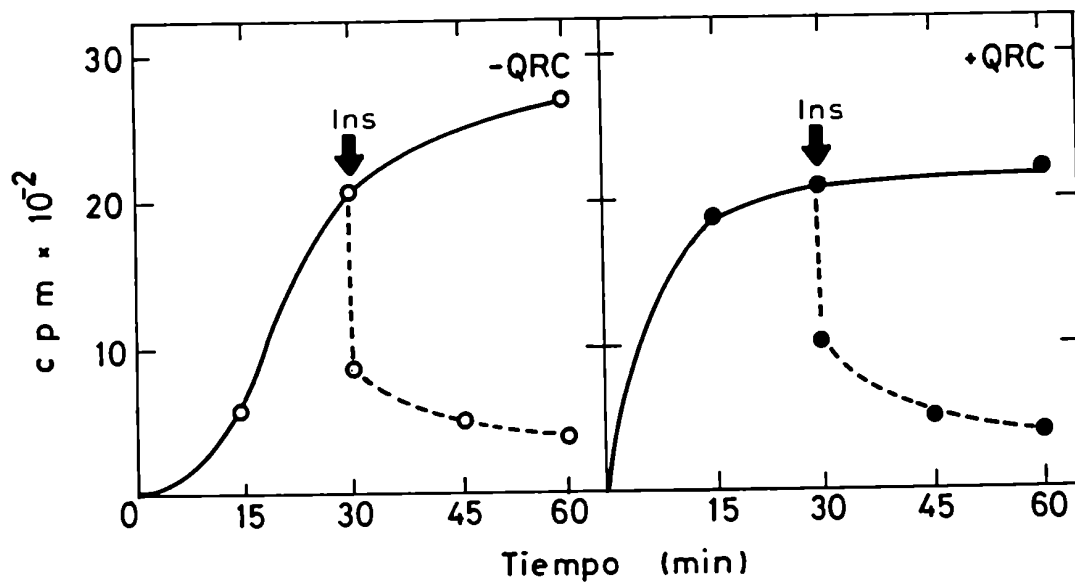


Figura 41: Efecto del QRC sobre la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins en células permeabilizadas.

Se permeabilizaron 20×10^6 células/ml de mezcla descrita en el punto 4.4. de Materiales y Métodos en presencia (●) o ausencia (○) de QRC $60 \mu\text{M}$. Al cabo de 30 min a 37°C algunos tubos recibieron inositol 10 mM (líneas punteadas) y la incubación continuó a 37°C . La reacción se interrumpió a los tiempos indicados en la figura por centrifugación en frío y el material lipídico se extrajo como se describió en Materiales y Métodos.

hidrólisis de Ptd-dCMP provocado por el inositol. Se puede observar también que, salvo el punto de 15 min, el QRC no estimuló la incorporación de (³H)dCTP al Ptd-dCMP. Esto fue confirmado con otro experimento, donde se vio que distintas concentraciones de QRC fallaron en estimular la síntesis de Ptd-dCMP en células permeabilizadas (Figura 42). Sin embargo, en este sistema el QRC inhibió la síntesis de DNA aunque en menor proporción que en células intactas.

Se decidió entonces evaluar el efecto del QRC sobre la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins en células intactas. Para ello se preincubaron células con (³H)dCyd y CPZ con el objeto de acumular Ptd-(³H)dCMP, luego se lavaron y se reincubaron con QRC e inositol. En la Figura 43 se puede observar que, si bien el QRC bloquea parcialmente la degradación de Ptd-dCMP al cabo de 60 min de incubación, no afectó su transformación a Ptd-Ins. Como se esperaba, el QRC potenció el efecto de CPZ en ausencia de inositol; sin embargo, se recuperaron más cuentas en la fase orgánica de las que se deberían obtener si el QRC bloqueara solamente la degradación de Ptd-dCMP. Dado que los lavados realizados con el objeto de remover la (³H)dCyd no fueron acompañados por el agregado de dCyd fría, posiblemente el contenido de (³H)dCTP en las células lavadas sea considerable; de esta forma el resultado obtenido es compatible con un efecto estimulador del QRC sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Los resultados presentados sugieren que el QRC estimula la síntesis de Ptd-dCMP. EL mecanismo debe ser distinto al de CPZ ya que el mismo se pierde al permeabilizar las células. Se pensó entonces, que el efecto podría estar mediado por alguna molécula de pequeño PM que saliera al medio extracelular como consecuencia de la permeabilización.

Ya fue mencionado que el QRC aumenta los niveles de AMPc en células Ehrlich por inhibición de la actividad de fosfodiesterasa. Un efecto similar lo produce la teofilina (317,321). Con el objeto de investigar si el AMPc juega algún rol en el efecto estimulador del QRC sobre la síntesis de Ptd-dCMP, se incubaron células de Sarcoma 180 con teofilina 10 mM y se midió su efecto sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 16. Se puede observar que la teofilina no estimuló la síntesis de Ptd-dCMP. Con el objeto de verificar que el compuesto actuó en estas células se midió también la incorporación de (³H)dCyd al DNA, ya que se había reportado que la teofi-

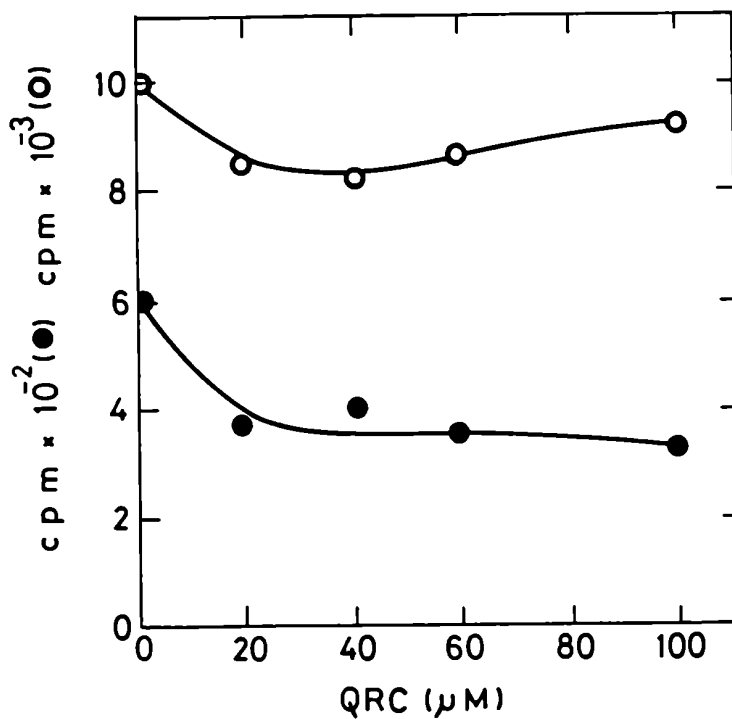


Figura 42: Efecto del QRC sobre la incorporación de ^(3H)dCTP al Ptd-dCMP y DNA en células permeabilizadas.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,3 ml de mezcla de permeabilización conteniendo todos los dNTPs con 3 μCi de ^(3H)dCTP y cantidades variables de QRC. La incubación se realizó a 37°C durante 15 min, al cabo de los cuales se determinó la radioactividad en la fase orgánica (○) y ácido-insoluble (●).

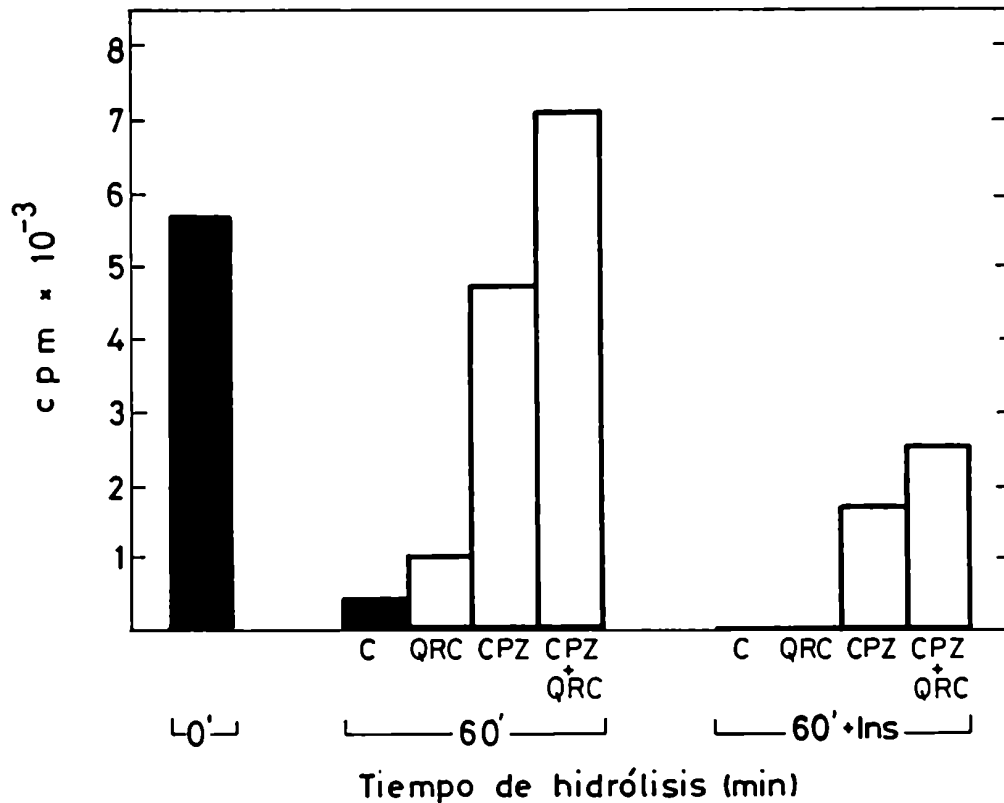


Figura 43: Efecto del QRC y CPZ sobre la transformación de Ptd-(³H)dCMP a Ptd-Ins en células íntactas.

Se incubaron células de Sarcoma 180, resuspendidas en MEM-HEPES a una concentración de 12×10^6 /ml con CPZ $60 \mu\text{M}$ y $6 \mu\text{Ci/ml}$ de (³H)dCyd durante 30 min a 37°C. Al cabo de ese tiempo las células se diluyeron con 3 volúmenes de medio de cultivo y, luego de una centrifugación de 5 min, se lavaron con el mismo volumen de medio. Finalmente las células se resuspendieron con 0,5 volúmenes de MEM-HEPES y se reincubaron durante 1 h a 37°C con los agregados que se muestran en la figura. La reacción finalizó por centrifugación y el material lipídico se extrajo como se describió en Materiales y Métodos. La radioactividad determinada a t=0 representa la incorporación de (³H)dCyd en presencia de CPZ luego de los lavados y sin reincubar a 37°C. C: control sin drogas.

Condición experimental	Ptd-dCMP		DNA	
	cpm	%	cpm	%
Sin agregados	398	100	344.480	100
Teofilina 10 mM	339	85	80.082	23
Quercetin 60 μ M	908	228	109.620	31
Teof. 10 mM + QRC 60 μ M	628	158	48.054	14

Tabla 16: Efecto de teofilina y quercetin sobre la síntesis de Ptd-dCMP y DNA.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 resuspendidas en 0,5 ml de MEM-HEPES con 3 μ Ci de (3 H)dCyd y los agregados que figuran en la tabla. La incubación se realizó a 37°C durante 1 h, al cabo de la cual se determinó la radioactividad incorporada al material lipídico y al DNA como se describió en Materiales y Métodos.

lina inhibe la síntesis de macromoléculas a través del aumento de AMPc (317). Los resultados obtenidos indican que la teofilina fue efectiva para inhibir la síntesis de DNA y que la combinación de QRC y teofilina produjo un efecto aditivo. Este resultado y el hecho que en células permeabilizadas el QRC inhibió la síntesis de DNA y no tuvo efecto sobre la síntesis de Ptd-dCMP sugieren que el AMPc no está involucrado en la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP.

IV.5.3. Efecto del QRC sobre la síntesis de Ptd-CMP.

La medición de la incorporación de (^3H)Cyd a células de Sarcoma 180 en presencia de cantidades variables de QRC reveló que el bioflavonoide no afecta la síntesis de Ptd-CMP al tiempo que inhibe la síntesis de RNA. Más aún, en presencia de CPZ, el QRC tuvo un efecto inhibitorio sobre la síntesis de este liponucleótido. Un experimento típico se muestra en la Figura 44.

Con el objeto de confirmar que el QRC estimula selectivamente la síntesis de Ptd-dCMP se midió su efecto en núcleos aislados. En la Figura 45 se puede observar que el QRC estimuló la síntesis de Ptd-dCMP pero no tuvo efecto sobre la síntesis de Ptd-CMP en esta fracción subcelular. Un control importante de este experimento fue verificar que los núcleos poseen las actividades enzimáticas responsables de la síntesis de los dos liponucleótidos. En efecto, en la Tabla 17 se muestra que el agregado de ácido fosfatídico estimuló la incorporación de (^3H)CTP y (^3H)dCTP a la fase orgánica.

IV.6. Efecto del Ptd-Ins-4P sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Como se mencionó anteriormente, el grupo de Erikson había informado que el QRC era capaz de inhibir la actividad de Ptd-Ins quinasa de la proteína oncogénica pp60^{src} y que las células transformadas con el virus que porta dicho oncogen (Rous Sarcoma Virus) tenían un metabolismo aumentado de fosfoinosítidos.

Si bien no se sabe si las células de Sarcoma 180 expresan este oncogen, cabría la posibilidad de que el QRC actuara en estas células sobre una proteína que cumpliera una función similar (lípid-quinasa), deprimiendo los niveles membranales de Ptd-Ins-4P y Ptd-Ins(4,5)P₂. Si la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP provocada por el QRC tuviera alguna relación con una

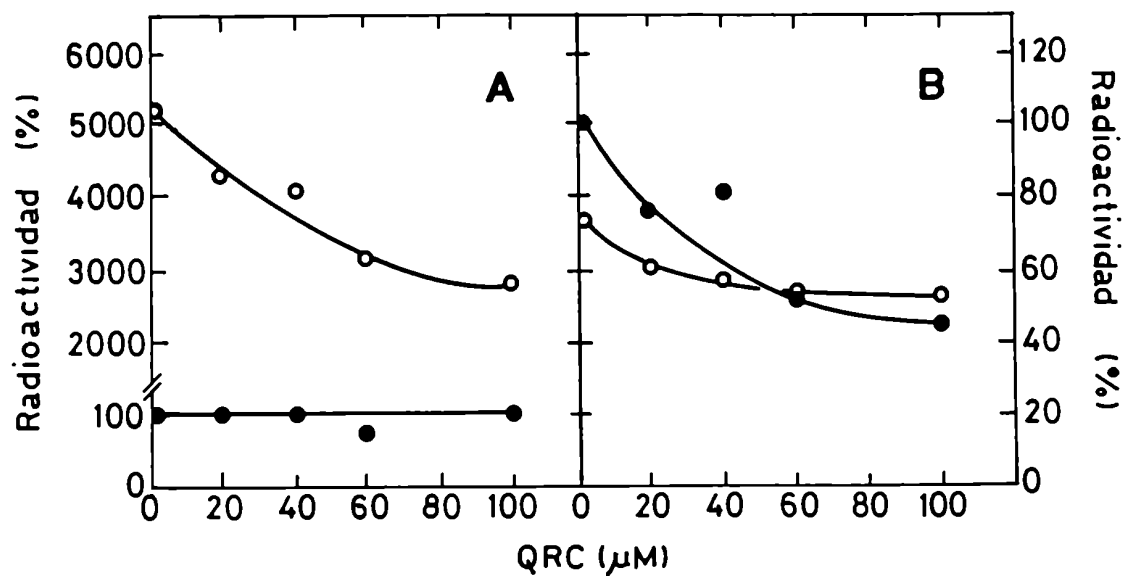


Figura 44: Efecto del QRC sobre la incorporación de (³H)Cyd al Ptd-CMP (A) y RNA (B) en células intactas.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0,5 ml de MEM-HEPES en presencia (○) o ausencia (●) de CPZ 60 μM con cantidades variables de QRC y 3 μCi de (³H)Cyd. Luego de 1 h a 37°C se extrajo el material lipídico (A) y ácido-insoluble (B) como se describió en Materiales y Métodos.

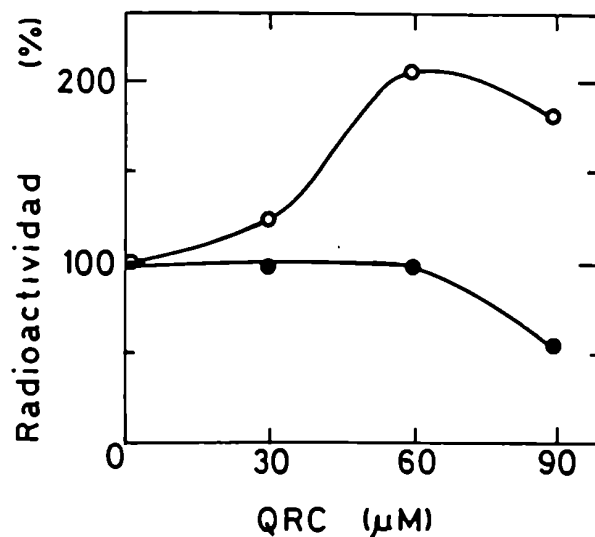


Figura 45: Efecto del QRC sobre la síntesis de liponucleótidos en núcleos aislados de Sarcoma 180.

Se incubaron 6×10^6 núcleos, obtenidos como se describió en el punto 3.1. de Materiales y Métodos, con 3 μCi de $(^3\text{H})\text{CTP}$ o 3 μCi de $(^3\text{H})\text{dCTP}$ y cantidades variables de QRC durante 1 h a 37°C . La radioactividad incorporada al Ptd-CMP (●) y al Ptd-dCMP (○) se determinó como se describió en Materiales y Métodos.

Núcleos aislados	Ptd-dCMP (cpm)	Ptd-CMP (cpm)
Sin agregados	5.007	9.482
Acido fosfatídico (1 mM)	18.205	33.863

Tabla 17: Síntesis de Ptd-dCMP y Ptd-CMP en núcleos aislados de Sarcoma 180.

Se resuspendieron 6×10^6 núcleos en 0,3 ml de mezcla de permeabilización conteniendo $(^3\text{H})\text{dCTP}$ $3,3 \mu\text{M}$ o $(^3\text{H})\text{CTP}$ $3,4 \mu\text{M}$ en presencia o ausencia de una dispersión acuosa y sonicada de ácido fosfatídico. La incubación se realizó durante 60 min a 37°C , al cabo de los cuales se extrajo el material lipídico como figura en Materiales y Métodos.

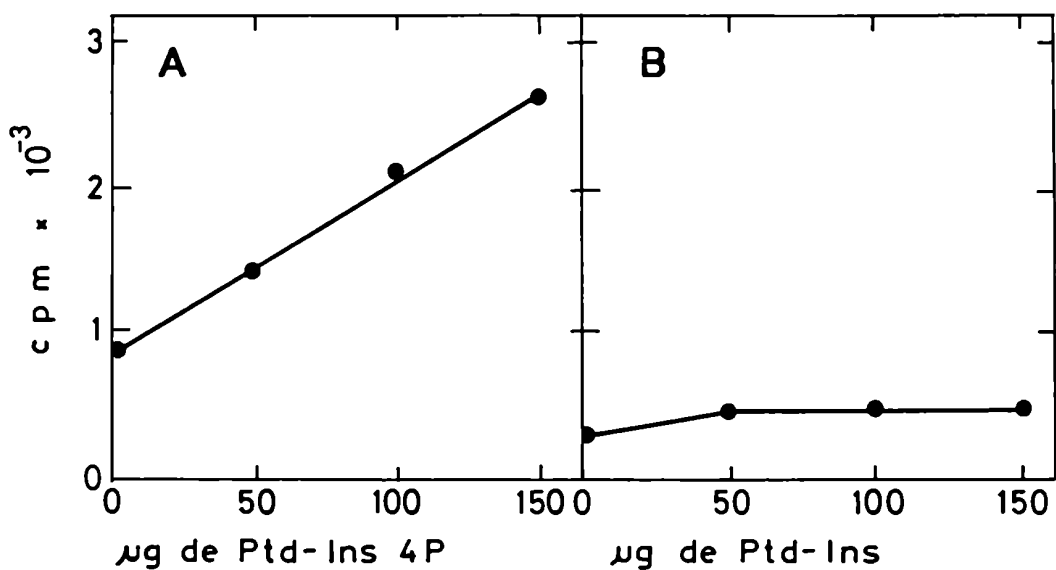


Figura 46: Efecto del Ptd-Ins4P (A) y Ptd-Ins (B) sobre la incorporación de ^(3H)dCyd al Ptd-dCMP.

Se incubaron 6×10^6 células de Sarcoma 180 en 0.5 ml de MEM-HEPES en presencia de QRC $60 \mu\text{M}$ y cantidades variables de Ptd-Ins4P o Ptd-Ins. En el experimento A las células recibieron $3 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ y en el experimento B $2 \mu\text{Ci}$ de $(^3\text{H})\text{dCyd}$. La incubación se realizó a 37°C durante 60 min., al cabo de los cuales se midió la radioactividad incorporada a la fase orgánica. Los fosfoinosítidos fueron preparados resuspendiendo 1 mg de compuesto en 0,1 ml de buffer fosfato 10 mM pH 7 y sonicando durante 1 hora a 40°C en un baño ultrasónico "Testlab".

disminución en los niveles de dichos fosfoinosítidos, entonces el agregado exógeno de los mismos debería revertir el efecto del QRC sobre la síntesis de Ptd-dCMP.

Con el objeto de probar esta hipótesis se incubaron las células con QRC y cantidades variables de Ptd-Ins-4P resuspendido en solución acuosa y sonificado durante una hora a 40°C. En esas condiciones el lípido forma micelas unilamelares con las colas hidrofóbicas hacia adentro y la cabeza polar en contacto con el medio acuoso.

Contrariamente a lo esperado, el Ptd-Ins 4P tuvo un claro efecto estimulador sobre la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP (Figura 46A). Este efecto fue específico ya que un experimento similar utilizando Ptd-Ins no reveló ningún efecto (Figura 46B). La permeabilidad celular no se vio alterada por la incubación con este compuesto (evaluada por la capacidad de las células de excluir el colorante azul tripán); sin embargo, la posibilidad de que el Ptd-Ins-4P pueda selectivamente alterar las propiedades de la membrana, por ejemplo aumentando la entrada de Ca²⁺, no ha sido investigada.

IV.7. Efecto del GTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP en HL-60.

Hemos mencionado en la Introducción que la síntesis de Ptd-dCMP en linfocitos humanos permeabilizados era estimulada por ATP, Ca²⁺ y Mg²⁺.

En un intento de determinar qué otros factores afectan la síntesis de este liponucleótido, se ha verificado que el GTP estimula la síntesis de Ptd-dCMP en células permeabilizadas. En la Figura 47 se observan los resultados obtenidos en HL-60, donde se puede ver que con GTP 1 mM se obtiene una estimulación comparable a la que se logra con CPZ. Experimentos similares realizados con células de Sarcoma 180 confirmaron la generalidad de esta observación.

La familia de proteínas oncogénicas ras, denominadas genericamente p21 por tener un PM de 21 KD, tienen la propiedad de unir e hidrolizar GTP. Con el uso de anticuerpos monoclonales se ha verificado que se hallan localizadas en la cara interna de la membrana plasmática (280) de células transformadas con las distintas variedades del Virus de Sarcoma Murino. También se ha determinado que las células no transformadas poseen normalmente esta proteína y, aunque en menor cantidad, puede ser inmunoprecipitada con los anticuerpos

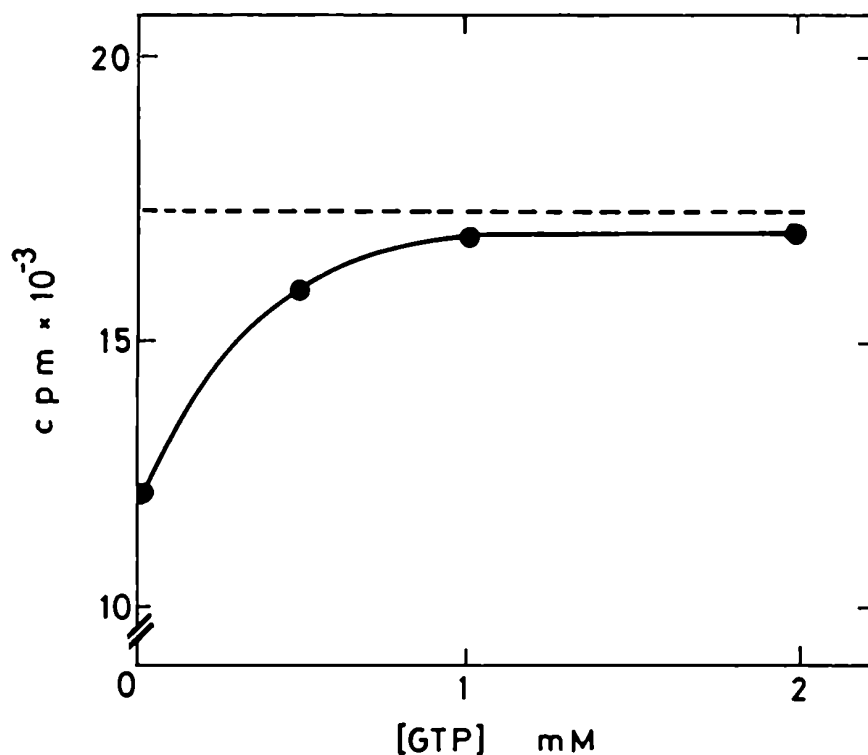


Figura 47: Efecto del GTP sobre la incorporación de (³H)dCTP al Ptd-dCMP.

Se permeabilizaron $3,4 \times 10^6$ células HL-60 con 0,3 ml de la mezcla descrita en el punto 4.4. de Materiales y Métodos en presencia de cantidades variables de GTP y 3 μ Ci de (³H)dCTP. Luego de incubar durante 75 min a 37°C se extrajo el material lipídico y se determinó la radioactividad incorporada a la fase orgánica (●). La línea punteada indica la incorporación obtenida en presencia de CPZ 60 μ M.

Condición Experimental	Ptd-dCMP (cpm)
Control " + Ins	8.625 383
Anti p21 " + Ins	7.049 411
Anti HLA " + Ins	7.412 324

Tabla 18: Efecto de anti p21 sobre la síntesis de Ptd-dCMP y Ptd-Ins en HL-60.

Se permeabilizaron 2×10^6 células HL-60 en 0,3 ml de una mezcla que contenía Hepes 50 mM pH 7,5, Cl_2Mg 8,3 mM, Cl_2Ca 0,4 mM, ATP-Mg^{2+} 1 mM y GTP 1 mM. Luego de 20 min a 4°C se agregaron los anticuerpos (2 μl de anti p21 o anti HLA) y se dejó otros 10 min a 4°C . Posteriormente las células se congelaron con N_2 líquido y se descongelaron rápidamente; una vez verificado que las células estuvieran rotas, se agregó DTT 1 mM y $(^3\text{H})\text{dCTP}$ 3,3 μM , algunos tubos recibieron también Inositol 10 mM. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 30 min, al cabo de los cuales se extrajo el material lipídico y se determinó la radioactividad presente en la fase orgánica.

dirigidos contra la proteína de origen viral (280,329).

Hemos investigado la posibilidad de que la proteína p21 esté relacionada con la síntesis de Ptd-dCMP utilizando para ello un anticuerpo monoclonal anti-p21 de origen viral. Dicho anticuerpo (Y13-259) bloquea el sitio de unión del GTP en la proteína oncogénica (280).

Para realizar este experimento, se permeabilizaron células HL-60, se agregó el anticuerpo y luego se congeló y descongeló con N₂ líquido para romper las células y facilitar la interacción del anticuerpo con la cara interna de la membrana plasmática. Posteriormente se agregó (³H)dCTP y se incubó a 37°C. Como control se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-HLA humano.

Los resultados de este experimento se encuentran en la Tabla 18. Se puede observar que el anticuerpo anti-p21 no tuvo un efecto significativo sobre la incorporación de (³H)dCTP al Ptd-dCMP, siendo la radioactividad incorporada a la fase orgánica semejante a las células no tratadas con el anticuerpo. Por otra parte, la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins tampoco se vio afectada por este anticuerpo.

IV.8. Discusión.

Los resultados presentados en este capítulo demuestran fehacientemente que las células animales utilizan el Ptd-dCMP para la síntesis de Ptd-Ins. En efecto, si bien se han mostrado solamente los experimentos realizados en células de Sarcoma 180, el agregado de inositol a timocitos de ratón y a la línea celular HL-60 provoca la desaparición de Ptd-(³H)dCMP sugiriendo que se forma Ptd-Ins. Las evidencias que permiten demostrar esta afirmación son las siguientes:

- 1) La incubación de células de Sarcoma 180 con CPZ e inositol previene en un 75% el efecto estimulador de la primera sobre la incorporación de (³H)dCyd al Ptd-dCMP. Posiblemente el efecto no es completo debido a que en estas células la CPZ mostró un pequeño efecto inhibitorio sobre la transformación de Ptd-dCMP a Ptd-Ins (Figuras 24 y 43).
- 2) El agregado de inositol a células permeabilizadas provoca la liberación de (³H)dCMP al medio de cultivo, con la concomitante disminución de radioactividad en la fase orgánica.

- 3) La fracción microsomal de células de Sarcoma 180 cataliza la síntesis de Ptd-Ins a partir de Ptd-dCMP purificado.
- 4) La incubación de estas células en un medio sin inositol conduce a una acumulación de Ptd-dCMP que es revertida por una concentración de inositol similar a la que se encuentra habitualmente en los medios de cultivo.
- 5) El Li^+ favorece la acumulación de Ptd-dCMP. Este catión depleta los niveles endógenos de inositol por inhibición de la enzima inositol-1-fosfato fosfatasa (177,262,263). Como consecuencia de dicha inhibición se acumula inositol-1-fosfato (178,264,265). Este compuesto se origina en las células a partir de dos fuentes. Puede ser sintetizado de novo a partir de glucosa dando el enantiómero L, o puede ser liberado por acción de la fosfolipasa C sobre los fosfoinosítidos en cuyo caso se obtiene el enantiómero D (178) (Figura 48).

Sherman y col. encontraron que el 90% del mio-inositol-1-fosfato que se acumula en la corteza cerebral de ratas durante el tratamiento con Li^+ es el enantiómero D (265). De esta manera, el Li^+ constituye una herramienta muy útil para identificar aquellas funciones celulares que ocurren a través de la hidrólisis de los fosfoinosítidos. De hecho, Berridge y col. encontraron que el Li^+ amplifica la respuesta de fosfatidil-inositol mediada por diversos agonistas en cerebro y glándulas salivales (178).

El hecho que el Li^+ permita la acumulación de Ptd-dCMP en células de Sarcoma 180 sugiere que el breakdown de fosfoinosítidos está activado en estas células. A diferencia de los resultados obtenidos por Berridge en células quiescentes, en estas células es posible ver un efecto del Li^+ en ausencia de agonistas que estimulen los receptores apropiados. Algo similar ocurre con las líneas celulares en cultivo, aunque se ha verificado que el suero contiene factores como el PDGF (factor de crecimiento plaquetario) que estimulan los receptores responsables de la hidrólisis de fosfoinosítidos (181,330). Los experimentos realizados con las células de Sarcoma 180 se realizaron en ausencia de suero y luego de un extenso lavado de las mismas para eliminar el líquido ascítico, de tal forma que la posible estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos podría ser atribuida a factores autócrinos, secretados por las mismas células tumorales. Si bien no hay estudios realizados en células de Sarcoma 180, dichos factores han sido demostrados en varias líneas celulares,

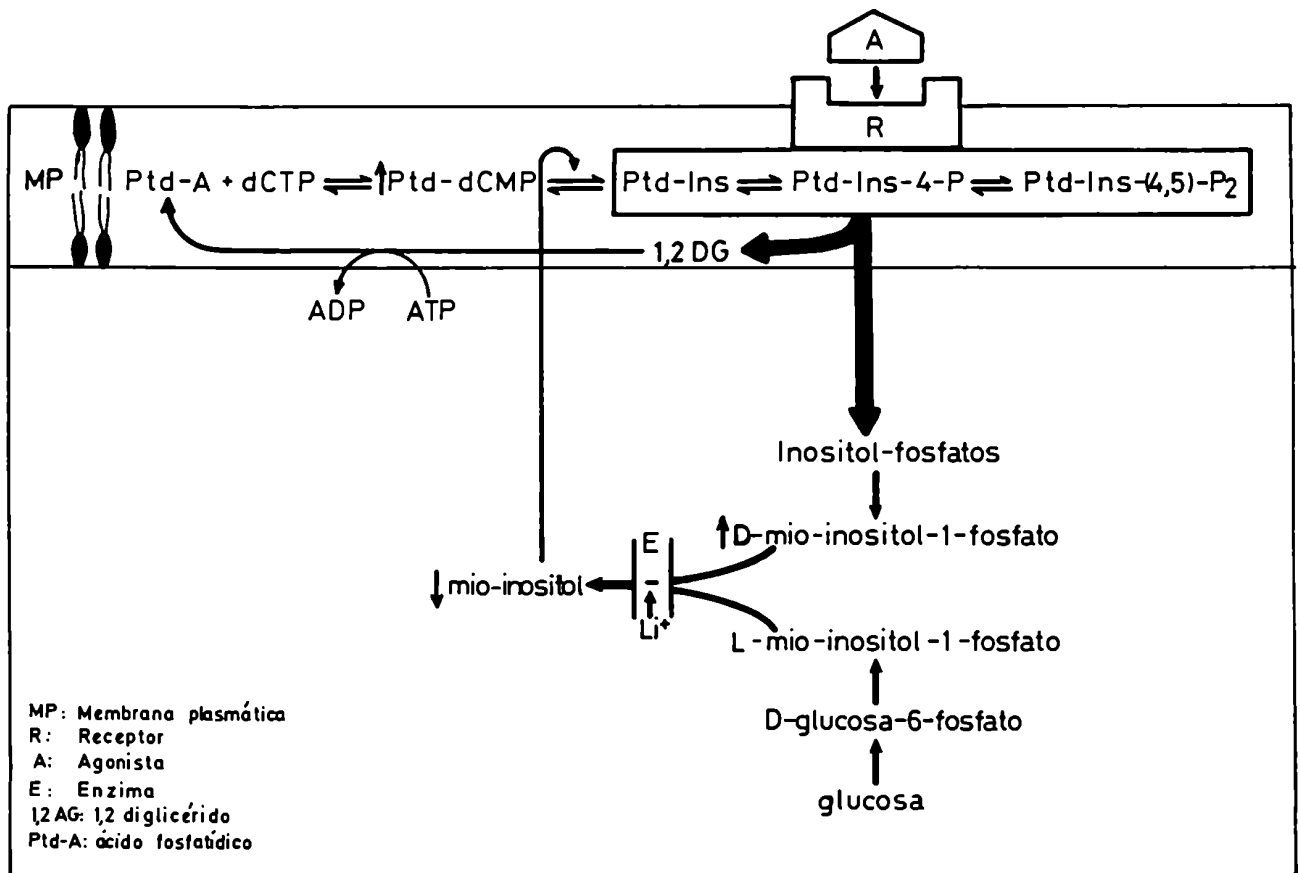


Figura 48: Efecto del Li^+ sobre el metabolismo de inositol y su relación con la acumulación de Ptd-dCMP.

El Li^+ inhibe la enzima (E) inositol-1 fosfato fosfatasa depletando el pool intracelular de inositol y provocando la acumulación de D-mio-inositol 1-fosfato. Estos efectos se observan cuando los receptores que estimulan la hidrólisis de fosfoinosítidos están ocupados. La acumulación de Ptd-dCMP en presencia de Li^+ demuestra que es precursor de Ptd-Ins.

como ser, células de osteosarcoma humano, células pequeñas de cáncer de pulmón y leucemia a células T, con producción de PDGF, bombesina y péptidos relacionados e interleukina 2 respectivamente (331-333).

La acumulación de Ptd-dCMP en presencia de Li^+ se verifica cuando las células se incuban en un medio que no contiene inositol. Esto es así porque el inositol del medio de cultivo neutraliza el efecto del catión.

El Li^+ es efectivo en el tratamiento de las psicosis maniáco-depresivas; aunque ya se mencionó en la Introducción el mecanismo de acción propuesto, cabe agregar que el inositol plasmático no atraviesa la barrera hematoencefálica con lo cual el cerebro es más susceptible a la acción del Li^+ mientras que los tejidos periféricos estarían protegidos por el inositol circulante (178).

En la Figura 48 se ha colocado al Ptd-dCMP como único precursor del Ptd-Ins. Esto no significa desconocer que el Ptd-CMP puede cumplir la misma función en células intactas (18,334 y Tabla 12 de esta Tesis); sin embargo, esta es la primera vez que se determina que la depleción endógena de inositol conduce a la acumulación de un precursor de Ptd-Ins, en este caso Ptd-dCMP. No se ha verificado si un resultado similar se obtiene con el Ptd-CMP.

Si bien en este trabajo de Tesis no se ha demostrado que el Ptd-Ins sintetizado a partir de Ptd-dCMP puede ser hidrolizado por la acción de agonistas (dado que los resultados obtenidos con Li^+ constituyen evidencias muy preliminares) es sorprendente, en cambio, la escasa evidencia experimental encontrada en la literatura en relación al rol del Ptd-CMP en dicha cascada metabólica, siendo el intermediario que invariablemente se cita en las publicaciones sobre el tema.

En la Tabla 19 se muestran los cambios tempranos en la marcación de ácido fosfatídico y/o fosfatidil-inositol en células estimuladas con diversos agonistas. Como ya fue mencionado, dichos cambios ocurren como consecuencia de la hidrólisis de Ptd-Ins(4,5) P_2 y reflejan el reciclaje de 1,2 DG e inositol. En ninguno de estos casos se encontró marcación de Ptd-CMP con ^{32}P , como cabría esperar si este fuera el liponucleótido intermediario entre el Ptd-A y el Ptd-Ins. Es posible, sin embargo, que el mismo no haya sido buscado apropiadamente. Es interesante comentar particularmente los trabajos de Eichberg y Hauser, quienes han estudiado el efecto de catecolaminas y compuestos

Tejido	Estímulo	Respuesta y período de estimulación
Plaquetas	ADP	2 s: ↑ marcación en Ptd-A 3 min: ↑ " Ptd-Ins
Tiroides	TSH	2 min: ↑ " " Ptd-A y Ptd-Ins
Linfocitos	PHA	3 min: ↑ " " Ptd-A y Ptd-Ins
Páncreas	Pancreozimina	↷ 5 min: ↑ " " Ptd-A y Ptd-Ins
	Acetilcolina	↷ 5 min: ↑ " Ptd-A
Corteza cerebral	Acetilcolina	10 min: ↑ " " Ptd-Ins
	Noradrenalina o fenilefrina	5 min: ↑ " Ptd-A y Ptd-Ins
Parótida	Acetilcolina	5 min: ↓ concentración de Ptd-Ins
Fibroblastos	Factores séricos	5 min: ↓ marca en (³ H)Ptd-Ins

Tabla 19: Cambios tempranos en la marcación de Ptd-A y/o Ptd-Ins en células estimuladas con diversos agonistas (ref. 102)

β -bloqueantes sobre el metabolismo de fosfolípidos en la glándula pineal de rata. Dichos autores encontraron que tanto la noradrenalina (NA) como el propranolol estimulan la incorporación de P^{32} a Ptd-A, Ptd-Ins y Ptd-Gli, aunque sólo en presencia de propranolol aumenta también la incorporación de radioactividad a un lípido X que posteriormente fue identificado como Ptd-CMP (335,13). Es necesario aclarar que el propranolol, si bien es un conocido antagonista de receptores β -adrenérgicos, puede interactuar directamente con las membranas celulares de manera análoga a como lo hacen los anestésicos locales y otras drogas estabilizantes de membrana; es precisamente debido a esta propiedad que modifica el metabolismo de fosfolípidos tal como lo hacen la CPZ y otros cationes anfifílicos.

Sin embargo, como ya fue señalado en la Introducción, estos compuestos estimulan la síntesis de novo de los fosfolípidos acídicos por inhibición de la enzima fosfatídico fosfohidrolasa, lo que provoca un aumento en la incorporación de (^{14}C)glicerol a dichos fosfolípidos. La NA, como casi todos los agonistas que aumentan el turnover de Ptd-Ins, no provoca cambios en la incorporación de este precursor.

El aumento de incorporación de ^{32}P al Ptd-CMP por efecto del propranolol pero no por efecto de la NA es sugestiva, y experimentos posteriores realizados por el mismo grupo indican que el Ptd-CMP acumulado en presencia de propranolol no es utilizado para aumentar la formación de Ptd-Ins llevada a cabo por la NA (336). Dichos autores especulan con la existencia de un pool discreto de Ptd-CMP que llevaría a cabo esta función y que no sería detectado con los métodos utilizados.

Existen por lo menos dos ejemplos en la literatura donde sí se ha comprobado el rol del Ptd-CMP en la síntesis de Ptd-Ins provocada por estímulos extracelulares. Se trata de los trabajos de Freinkel y col. en páncreas exócrino (334) y los trabajos de Hawthorne y col. en sinaptosomas de corteza cerebral de conejillo de Indias (337,338). En ambos estudios se detectó incorporación de P^{32} a Ptd-CMP, en el primer caso por estimulación con glucosa, que provoca hidrólisis de fosfoinosítidos (339) y en el segundo por estimulación eléctrica o despolarización por alto K^+ que, según los autores, también provoca hidrólisis de estos compuestos.

La pregunta que surge inmediatamente es por qué nunca se detectó la pre-

sencia de Ptd-dCMP en células intactas. Una respuesta razonable es que el pool de dCTP en células animales es varias veces menor que el pool de CTP (121), de tal manera que si se realiza la marcación con ^{32}P , la fracción de $(^{32}\text{P})\text{dCTP}$ será mucho menor que la de $(^{32}\text{P})\text{CTP}$. Si la eficiencia de transferencia de ambos nucleótidos al ácido fosfatídico fuera la misma, la detección del ribonucleótido se vería favorecida.

Este razonamiento podría explicar por qué Eichberg y Hauser no encontraron $(^{32}\text{P})\text{Ptd-dCMP}$ cuando incubaron la glándula pineal con DL-propranolol (18). En ese sentido, es interesante mencionar que cuando se probó este compuesto sobre linfocitos humanos estimulados con PHA se encontró aumento de la incorporación de $(^3\text{H})\text{dCyd}$ a la fase orgánica (E.E. Medrano, observaciones personales).

Cabe agregar que los experimentos que condujeron a la detección de Ptd-dCMP en células intactas (esta Tesis y ref. 27) se realizaron con células en activa proliferación. Como se vio en la Introducción, el contenido de dNTPs es mayor en estas células que en células quiescentes (122). Es posible que, en esta situación cobre importancia la utilización de Ptd-dCMP como intermediario en la biosíntesis de Ptd-Ins.

Los experimentos realizados en células permeabilizadas con el objeto de cuantificar la cantidad de ambos liponucleótidos reveló que la eficiencia de transferencia de dCTP y CTP al ácido fosfatídico es la misma ya que, en presencia de concentraciones iguales de ambos nucleótidos, se sintetizaron cantidades iguales de Ptd-CMP y Ptd-dCMP (Tabla 14). La presencia de CPZ en estos experimentos no modifica su interpretación ya que este compuesto estimula la síntesis de ambos liponucleótidos en la misma proporción, tanto en células intactas como permeabilizadas.

Otra pregunta que cabe formularse es si la síntesis de uno u otro liponucleótido se debe a una utilización no selectiva de sustrato (CTP y dCTP) por parte de una sola enzima. Con la obtención de mutantes condicionales, en bacterias se demostró que la misma enzima cataliza la síntesis de Ptd-CMP y Ptd-dCMP (35). En levaduras, que contienen sólo Ptd-CMP, la enzima que lo sintetiza es inhibida en forma no competitiva por el dCTP (48).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en células animales habría dos enzimas -o actividades enzimáticas- distintas. En efecto, los

experimentos realizados con el bioflavonoide quercetin indican que este compuesto estimula selectivamente la síntesis de Ptd-dCMP tanto en células intactas como en núcleos aislados de Sárcoma 180.

Se demostró que dicha acumulación no se debe a un bloqueo en la formación de Ptd-Ins. Si bien el QRC inhibió parcialmente la degradación de Ptd-dCMP la estimulación observada en presencia de CPZ permite descartar este mecanismo ya que en esas condiciones la degradación está bloqueada por la CPZ en un 90%.

La posibilidad que el QRC actuara a través de la inhibición in vivo de una Ptd-Ins quinasa, tal como fuera demostrado in vitro (246), fue investigada agregando Ptd-Ins-4P a las células tratadas con QRC. Sorprendentemente este compuesto estimuló la síntesis de Ptd-dCMP. El efecto fue específico ya que cantidades equivalentes de Ptd-Ins no tuvieron ningún efecto. Este resultado sugeriría un efecto regulatorio del Ptd-Ins-4P sobre la síntesis de su precursor (retroalimentación positiva). Algo similar fue postulado para los productos de hidrólisis del Ptd-Ins(4,5)P₂ (1,2 DG e InsP₃) que funcionarían como retroactivadores de la síntesis del Ptd-Ins(4,5)P₂ a través del Ca²⁺ y de la PK-C (211).

Dado que el QRC inhibe la síntesis de DNA, se podría pensar en un mecanismo análogo al del ara-C para explicar la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP; es decir, que la inhibición de la síntesis de DNA conduciría a una acumulación de dCTP que sería utilizado para la síntesis del liponucleótido. Esta hipótesis parece poco probable por dos motivos: 1°) en células permeabilizadas el QRC mantiene su efecto inhibitorio sobre la síntesis de DNA pero se pierde el efecto estimulador sobre la síntesis del liponucleótido y 2°) a diferencia del ara-C, esta droga inhibe también la síntesis de RNA, con lo cual se podría pensar que habría mayor disponibilidad de CTP; sin embargo, la síntesis de Ptd-CMP no se vio afectada en ninguna condición por el agregado de QRC; más aún, concentraciones variables de QRC inhibieron la síntesis de este liponucleótido en presencia de CPZ.

Parece probable entonces que la estimulación de la síntesis de Ptd-dCMP se deba a un efecto directo sobre la enzima que sintetiza este liponucleótido o bien que actúe sobre algún compuesto que regule dicha actividad.

Como ya fue mencionado, el QRC ejerce una diversidad de efectos en

células animales. Algunos autores sugieren que el común denominador de todos ellos es el efecto inhibitorio sobre la actividad de proteín-quinasas independientes de AMPc sumado a un aumento en los niveles de AMPc. Dado que esta molécula no parece actuar sobre la síntesis de Ptd-dCMP, a juzgar por la falta de efecto de la teofilina, se podría especular con que el QRC inhibiría la actividad de una proteín-quinasa AMPc-independiente que regularía la actividad de la dCTP:fosfatidato-citidililtransferasa. Esta enzima sería inactivada por fosforilación a través de una proteín-quinasa inhibible por QRC; la regeneración de la forma activa de la enzima se produciría por acción de una fosfatasa.

Cabe mencionar aquí que un mecanismo similar de regulación fue propuesto para la enzima que sintetiza el ribo-liponucleótido: un grupo de investigadores de la Universidad de Queen, Canadá, describió un efecto estimulador del GTP e inhibitorio del ATP sobre la actividad de CTP:fosfatidato-citidililtransferasa de microsomas de hígado de rata (340). Dichos efectos implicaban la hidrólisis de ambos nucleótidos ya que análogos no hidrolizables de los mismos carecían de actividad.

Estos efectos condujeron a los autores a postular un mecanismo de regulación de la enzima que implicaba su activación por fosforilación a través de una proteín-quinasa que requeriría GTP. La forma activa, fosforilada, podría ser luego inactivada por una fosfoproteína-fosfatasa que sería activada a su vez por una proteín-quinasa que utilizaría específicamente ATP para su actividad.

Resumiendo, en base a la observación de que el QRC estimula la síntesis de Ptd-dCMP por un mecanismo que en principio no involucra al AMPc, ni un bloqueo en la degradación y/o transformación del liponucleótido, especulamos con la posibilidad de que actúe inhibiendo una proteín-quinasa que regularía la actividad de la dCTP:fosfatidato-citidililtransferasa. La enzima fosforilada sería inactiva, de manera tal que la inhibición de la fosforilación por QRC aumentaría la forma activa de la enzima.

Por otra parte, los resultados obtenidos por otros investigadores sugieren que la CTP:fosfatidato-citidililtransferasa también estaría regulada por fosforilación aunque en este caso la forma activa estaría fosforilada. El efecto inhibitorio del QRC sobre la síntesis de Ptd-CMP en presencia de CPZ

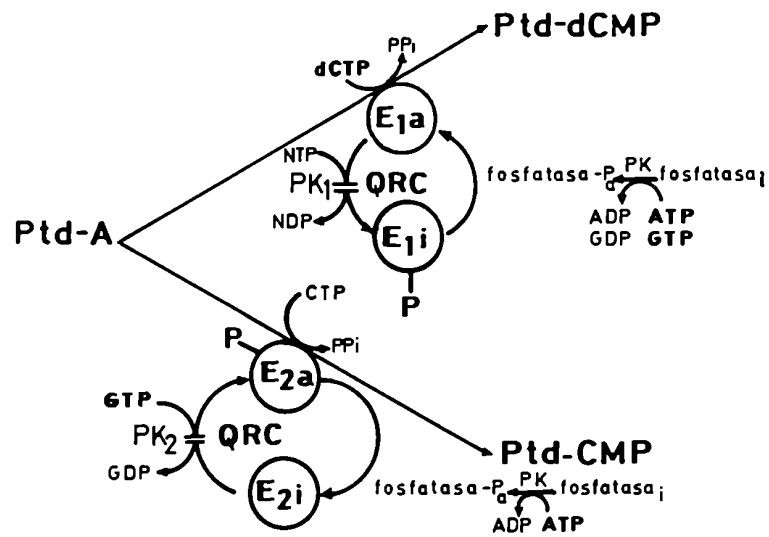


Figura 49: Modelo hipotético de regulación de la síntesis de Ptd-dCMP y Ptd-CMP.

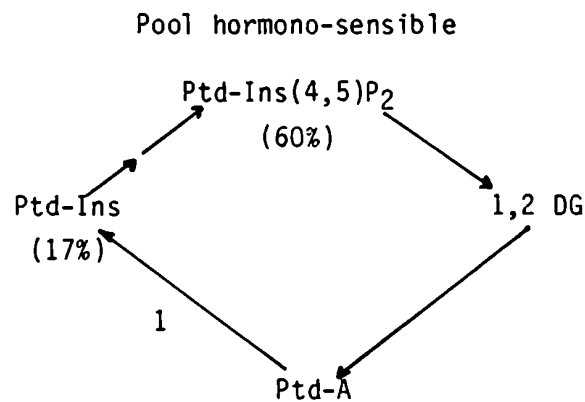
E: enzima; a: forma activa; i: forma inactiva; =: inhibición; P: fosfato, PK: proteín-quinasa.

apoyaría esta hipótesis (Figura 49).

Si bien en el presente trabajo de Tesis se describió un efecto estimulador del GTP sobre la síntesis de Ptd-dCMP, no se ha realizado un estudio exhaustivo del mismo. Con respecto al ATP, experimentos realizados en el laboratorio indicaron que dicho nucleótido estimula la síntesis del Ptd-dCMP a bajas concentraciones y la inhibe a altas (Figura X-Introducción).

Será necesario efectuar un estudio comparativo sistemático sobre las dos actividades enzimáticas con el objeto de encontrar no sólo diferencias en la activación de uno y otro liponucleótido (en ese sentido el Ca^{2+} podrá jugar un rol importante), sino también pesquisar diferencias en su localización sub-celular, cosa que hasta ahora no se ha logrado.

Recientemente, Marie E. Mónaco demostró la existencia de dos pools de Ptd-Ins en una línea celular de tumor de mama murino (células WRK-1); uno de ellos sensible y el otro insensible a la estimulación hormonal con vasopresina (341). En un trabajo posterior determinó el tamaño de ambos pools encontrando que el 83% del Ptd-Ins es hormono-insensible, mientras que sólo un 17% es hormono-sensible (342). Este segundo pool daría lugar al Ptd-Ins(4,5) P_2 que es clivado por la acción hormonal y que constituye, de acuerdo a esta autora, el 60% del PIP_2 membranal. El pool de Ptd-Ins(4,5) P_2 que deriva del Ptd-Ins hormono-insensible no sería clivado por la acción hormonal. En el siguiente esquema se muestra el modelo por ella propuesto (343):

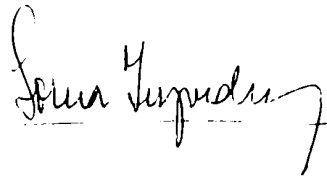


proteínas ras normales (provenientes del proto-oncogene c-ras) tienen la capacidad de unir e hidrolizar GTP y que la activación de dicho oncogen por mutación puntual en el codón 12 o 64 conduce a una pérdida en la capacidad de hidrolizar GTP (220). De acuerdo con esto, la proteína mutada continuaría activando la formación de InsP_3 y 1,2 DG de una manera descontrolada e independiente de factores de crecimiento. En ese sentido, los resultados obtenidos por Lippman tienden a confirmar dicha hipótesis.

En la presente Tesis se ha demostrado que el Ptd-dCMP es utilizado para la síntesis de Ptd-Ins.

El sistema de transducción de señales extracelulares mediada por la hidrólisis de fosfoinosítidos, controla funciones celulares tan diversas como la división celular, transmisión del impulso nervioso, secreción, etc. Dicho sistema debe estar necesariamente sujeto a un estricto control, de tal manera que distintos agonistas que actúan sobre una misma célula a través de este mecanismo, puedan ejercer su función específica.

En ese contexto, el hallazgo de que las células eucarióticas superiores poseen dos liponucleótidos para la síntesis de Ptd-Ins y de que posiblemente existan dos enzimas distintas que catalicen la síntesis de ambos aporta un elemento interesante que puede contribuir a la elucidación de los mecanismos que controlan esta vía metabólica.



ABREVIATURAS

AcH	ácido acético
ADP	adenosina-5'-difosfato
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPc	AMP cíclico
ara-C	arabinosil-citosina
ara-CMP	arabinosil-CMP
ara-CTP	arabinosil-CTP
ATP	adenosina-5'-trifosfato
CaM	calmodulina
CDP	citidina-5'-difosfato
CMP	citidina-5'-monofosfato
ConA	concavalina A
cpm	cuentas por minuto
CPZ	clorpromazina
CTP	citidina-5'-trifosfato
Cyd	citidina
d	deoxi
1,2 DG	1,2 diglicérido o diacilglicérido
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DI ₅₀	dosis de una droga que inhibe el 50% de una reacción
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido deoxiribonucleico
DNA _s a	deoxiribonucleasa
dNTPs	deoxiribonucleósidos trifosfato
DPG	difosfatidil-glicerol
dThd	timidina
DTT	ditiotreitól
dTTP	timidina 5' trifosfato
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β-amino-etil-éter)N,N'-tetraacético
FBS	suero fetal bovino
FFH	fosfatídico fosfohidrolasa

FGF	factor de crecimiento derivado de fibroblastos
f-met-leu-phe	formil-metionil-leucil-fenilalanina
GMPc	guanosina monofosafato cíclico
GTP	guanosina 5' trifosfato
h	hora
Hepes	ácido 4-(2-hidroxietyl)1-piperazino etane sulfónico
HLA	antígeno de histocompatibilidad
Ins	mio-inositol
InsP	inositol-1-fosfato
InsP ₂	inositol-1,4-bisfosfato
InsP ₃	inositol 1,4,5 trifosfato
KD	kilodaltons
Km	constante de Michaelis Menten
LMA	leucemia mieloide aguda
MDO	oligosacáridos derivados de membrana
MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle.
M	molar
mM	milimolar
mg	miligramo
min	minuto
nmol	nanomol (1×10^{-9} mol)
OAG	1-oleil-2-acetil glicerol
PBS	solución salina de buffer de fosfatos
Pi	fosfato inorgánico
PCA	ácido perclórico
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
PHA	fitohemaglutinina
PK	proteín quinasa
Ptd-A; PA	ácido fosfatídico
Ptd-Col	fosfatidil-colina

Ptd-EA	fosfatidil-etanolamina
Ptd-Gli	fosfatidil-glicerol
Ptd-Ins; PI	fosfatidil-inositol
Ptd-Ins-4-P	Ptd-Ins-4-fosfato
Ptd-Ins(4,5)P ₂	Ptd-Ins(4,5) bisfosfato
QRC	quercetin
RA	ácido retinoico
RNA	ácido ribonucleico
RSV	virus del sarcoma de Rous
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
s.c.	subcutánea
t	tiempo
TCA	ácido tricloroacético
TG	triglicérido o triacilglicérido
TPA	tetradecanoíl forbol acetato
TRH	hormona liberadora de tirotrófina
TSH	hormona estimulante de tiroides
UDPG	uridina difosfato glucosa
UR ₂	virus del sarcoma aviario

REFERENCIAS

1. Strickland, K.P. (1973) en "Form and function of phospholipids" (eds. Ansell, G.B., Hawthorne, J.N., Dawson, R.D.) p. 9, Elsevier Amsterdam.
2. IUPAC-IUB (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 152, 1.
3. IUPAC-IUB (1970) *J. Lipid Res.* 11, 173.
4. Hirschmann, H. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 2762.
5. Chapman, D. (1975) en "Cell membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology" (eds. Weissmann, G. y Claiborne, R.) p. 13, New York.
6. De Pierre, J.W. y Ernster, L. (1977) *Annu. Rev. Biochem.* 46, 201.
7. Hawthorne, J.N. y Kemp, P. (1964) *Adv. Lipid Res.* 2, 127.
8. Klyashchitskii, S.D., Sokolov, S.D. y Shvets, V.I. (1969) *Russ. Chem. Rev.* 38, 345.
9. Lennarz, W.J. (1970) *Annu. Rev. Biochem.* 39, 1037.
10. Bishop, H.H. y Strickland, K.P. (1970) *Can. J. Biochem.* 48, 269.
11. Kates, M. (1970) *Advan. Lipid Res.* 8, 225.
12. Kates, M. (1964) *Advan. Lipid Res.* 2, 17.
13. Hanahan, D.J. y Olley, J.N. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 813.
14. Folch, J. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 497.
15. Hawthorne, J.N. y White, D.A. (1975) *Vitam. Horm. (New York)* 3, 529.
16. Michell, R.H. (1979) *Trends in Biol. Sci.* 4, 128.
17. Holub, B.J., Kuksis, A. y Thompson, W. (1970) *J. Lipid Res.* 11, 558.
18. Hauser, G. y Eichberg, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 105.
19. Raetz, C.R.H. y Kennedy, E.P. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1098.
20. Thompson, W. y Mac Donald, G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6779.
21. Steiner, M.R. y Lester, R.L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 260, 222.
22. Ter Schegget, J., Van den Bosch, H., Van Baak, M.A., Hosteter, K. y Borst, P. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 239 234.
23. Thompson, R.J. (1977) *Biochem. Soc. Transac.* 5, 49.
24. Mordoh, J. y Friedlander, B. (1977) *Mol. Cell. Biochem.* 16, 177.
25. Medrano, E. y Mordoh, J. (1979) *Mol. Cell. Biochem.* 24, 159.
26. Medrano, E. (1979) Tesis Doctoral FCEN U.B.A.
27. Medrano, E., Iujvidin, S. y Mordoh, J. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 249.
28. Kennedy, E.P. (1961) *Fed. Proc.* 20, 934.
29. Goldfine, H. (1972) *Adv. Microb. Physiol.* 8, 1.
30. Raetz, C.R.H. (1978) *Microb. Rev.* 42, 614.
31. Bell, R.M., Mavis, R.D., Osborn, M.J. y Vagelos, P.R. (1971) *Biochim.*

- Biophys. Acta 249, 523.
32. Kito, H., Ishinaga, M. y Hata, T. (1975) Agric. Biol. Chem. 39, 565.
 33. Raetz, C.R.H. y Kennedy, E.P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2008.
 34. Snider, M.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7197.
 35. Langley, K.E. y Kennedy, E.P. (1973) J. Bacteriol. 136, 85.
 36. Ganong, B.R., Leonard, J.N. y Raetz, C.R.H. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1623.
 37. Ganong, B.R. y Raetz, C.R.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 389.
 38. Chang, Y.Y. y Kennedy, E.P. (1967) J. Lipid Res. 447, 455.
 39. Kanfer, J. y Kennedy, E.P. (1964) J. Biol. Chem. 239, 172.
 40. Hirschberg, C.B. y Kennedy, E.P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 648.
 41. Schulman, H. y Kennedy, E.P. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4250.
 42. Van Golde, C.M.G., Schulman, H. y Kennedy, E.P. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1368.
 43. Schulman, H. y Kennedy, E.P. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6299.
 44. Raetz, C.R.H. y Newman, K.F. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3882.
 45. Becker, G.W. y Lester, R.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8684.
 46. Lewin, L.M. (1965) J. Gen. Microb. 41, 215.
 47. Schneider, E.G. y Kennedy, E.P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 441, 294.
 48. Belendiuk, G., Mangnall, D., Tung, B., Westley, J. y Getz, G.S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4555.
 49. Schlossman, D.M. y Bell, R.M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5738.
 50. Joyard, J. y Douce, R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 486, 273.
 51. Monroy, G., Rola, H. y Pullman, M.E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6884.
 52. Halder, D., Tso, W. y Pullman, M.E. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4502.
 53. Stern, W. y Pullman, M.E. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8047.
 54. Coleman, R. y Bell, R.M. (1978) J. Cell Biol. 76, 245.
 55. Yamashita, S., Nakaya, N., Miki, Y. y Numa, S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 600.
 56. Schlossman, D.M. y Bell, R.M. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 732.
 57. Schlossman, D.M. y Bell, R.M. (1978) J. Bacteriol. 133, 1368.
 58. Kanoh, H. y Akesson, B. (1978) Eur. J. Biochem. 85, 225.
 59. Lapetina, E.G. y Hawthorne, J.N. (1971) Biochem. J. 122, 171.

60. Hokin, L.E. y Hokin, M.R. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 470.
61. Fisher, D.B. y Mueller, G.C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 248, 434.
62. Jelsema, C.L. y Morre, D.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7969.
63. Coleman, R. y Hubscher, G. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 56, 479.
64. Hosaka, K., Yamashita, S. y Numa, S. (1975) *J. Biochem.* 77, 501.
65. Kent, C. y Vagelos, P.R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 436, 377.
66. Cotman, C.W., Mac Caman, R.E. y Dewhurst, S.A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 395.
67. Hubscher, G. (1970) en "Lipid Metabolism" (ed. Wakil, S.J.) p. 279, Academic Press, New York.
68. Fallon, H.J., Lamb, R.G. y Jamdar, S.C. (1977) *Biochem. Soc. Transac.* 5, 37.
69. Bell, R.M. y Coleman, R.A. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 459.
70. Lamb, R.G. y Fallon, H.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 348, 179.
71. Thompson, W. y Mac Donald G. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 1153.
72. Bishop, H.H. y Strickland, K.P. (1976) *Can. J. Biochem.* 54, 249.
73. Vorbeck, M.L. y Martin, A.P. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 901.
74. Van Golde, L.M.G., Raben, J., Batenburg, J.J., Fleischer, B., Zambrano, F. y Fleischer, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 60, 179.
75. Douce, R., Manella, C.A. y Bronner, W.D. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 1504.
76. Thompson, R.J. (1975) *J. Neurochem.* 25, 811.
77. Mc Caman, R.E. y Finnerty, W.R. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 5074.
78. Van Heusden, G.P.H. y Van Den Bosch, H. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 405.
79. Thompson, W. y Mac Donald, G. (1976) *Eur. J. Biochem.* 65, 107.
80. Thompson, W. (1977) en "Function and Biosynthesis of Lipids" (eds. Bazan, N., Brenner, R. y Giusto, N.M.) *Adv. Exp. Med. Biol.* 83, 367.
81. Thompson, W. y Mac Donald, G. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2712.
82. Thompson, W. y Mac Donald, G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3311.
83. Van Golde, L.M.G., Fleischer, B. y Fleischer, S. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 313.
84. Van Den Bosch, H. (1974) *Annu. Rev. Biochem.* 43, 243.
85. Davidson, J.B. y Stanacev, N.Z. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42,

1191.

86. Takenawa, T., Saito, M., Nagai, Y. y Egawa, K. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 244.
87. Rao, R.H. y Strickland, K.P. (1974) Biochim. Biophys. Acta 348, 306.
88. Takenawa, T. y Egawa, K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5419.
89. Holub, B.J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 369, 111.
90. Colodzin, M. y Kennedy, E.P. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3771.
91. Kai, M., White, G.L. y Hawthorne, J.N. (1966) Biochem. J. 101, 323.
92. Michell, R.H. y Hawthorne, J.N. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 333.
93. Harwood, J.L. y Hawthorne, J.N. (1969) Biochim. Biophys. Acta 171, 75.
94. Lefebvre, Y.A., White, D.A. y Hawthorne, J.N. (1976) Can J. Biochem. 54, 746.
95. Kai, M., Salway, J.G. y Hawthorne, J.N. (1968) Biochem. J. 106, 791.
96. Ganet, R.J. y Redman, C.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 382, 58.
97. Koutouzov, S. y Marche, P. (1982) FEBS Lett. 144, 16.
98. Mack, S.E. y Palmer, F.B.St.C. (1984) J. Lipid Res. 25, 75.
99. Downes, C.P. y Michell, R.H. (1982) Cell Calcium 3, 467.
100. Hokin, L.E. (1985) Annu. Rev. Biochem. 54, 205.
101. Van Rooijen, L.A.A., Seguin, E.B. y Agranoff, B.W. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 919.
102. Michell, R.H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 81.
103. Wirtz, K.W.A. (1974) Biochim. Biophys. Acta 344, 95.
104. Magee, W.L., Berry, J.F., Strickland, K.P. y Rossiter, R.J. (1963) Biochem. J. 88, 45.
105. Allan, D. y Michell, R.H. (1975) Biochem. J. 148, 471.
106. Eichberg, J. y Hauser, G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1974.
107. Brindley, D.N. y Bowley, M. (1975 A) Biochem. J. 148, 461.
108. Brindley, D.N. y Bowley, M. (1975 B) Postgrad. Med. J. 51, Supl. 1, 91.
109. Brindley, D.N., Allan, D. y Michell, R.H. (1975) J. Pharm. Pharmacol. 27, 462.
110. Sturton, R.C. y Brindley, D.N. (1977) Biochem. J. 162, 25.
111. Allan, D. y Michell, R.H. (1974 A) Biochem. J. 152, 591.
112. Van Rooijen, L.A.A. y Bazan, M.G. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun.

134, 378.

113. Brindley, D.N., Bowley, M., Sturton, R.C., Pritchard, P.H., Burdit, S. y Cooling, J. (1977) *Biochem. Soc. Transac.* 5, 40.
114. Ferguson, R.M., Schmidtke, J.R. y Simmons, R.L. (1975) *Nature* 256, 744.
115. Weiss, B. y Levin, R.M. (1978) *Adv. Cycl. Nucleot. Res.* 9, 285.
116. Mori, T., Takai, Y., Minakuchi, R., Yu, B. y Nishizuka, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8378.
117. Kessel, D. y Hall, T.C. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 211, 88.
118. Oliver, J.M. y Patterson, A.R.P. (1971) *Can. J. Biochem.* 49, 262.
119. Henderson, J.F. y Patterson, A.R.P. (1973) en "Nucleotide Metabolism", Academic Press, New York.
120. Engstrom, Y., Rozell, B., Hansson, H., Stemme, S. y Thelander, L. (1984) *EMBO J.* 3, 863.
121. Benz, C. y Cadman, E. (1981) *Cancer Res.* 41, 157.
122. Reichard, P. (1972) en "Advances in Enzyme Regulation" (ed. Weber, G.), p. 3, Pergamon Press.
123. Skoog, K.L., Bjursell, K.G. y Nordenskjold, B.A. (1973) en "Advances in Enzyme Regulation" (ed. Weber, G.), p. 345, Pergamon Press.
124. Mathews, C.K. y Slabaugh, M.B. (1986) *Exp. Cell. Res.* 162, 285.
125. Nicander, B. y Reichard, P. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1347.
126. Armentrout, S. y Burns, C. (1974) *Am. J. Med. Sci.* 268, 163.
127. Clarkson, B., Dowling, M., Gee, T., Cunningham, I. y Burchenal, J. (1975) *Cancer* 36, 775.
128. Chu, M.Y. y Fisher, G.A. (1965) *Biochem. Pharmacol.* 14, 333.
129. Kessel, D., Hall, T. y Wodinsky, I. (1967) *Science* 156, 1240.
130. Graham, F.L. y Whitmore, G.F. (1970) *Cancer Res.* 30, 2636.
131. Momparler, R.L. (1982) *Medical and Pediatric Oncology Supl.* 1, 45.
132. Momparler, R.L. (1972) *Mol. Pharmacol.* 8, 362.
133. Kufe, D., Major, P., Egan, E. y Beardsley, P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8997.
134. Bhuyan, K., Scheidt, L.G. y Fraser, T.J. (1972) *Cancer Res.* 32, 398.
135. Chabner, B.A., Myers, C.E., Coleman, C.N. y Johns, D.G. (1975) *N. Engl. J. Med.* 292, 1107.
136. Wolfenden, R. y Wentworth, D.F. (1975) *Biochemistry* 14, 5099.

137. Matsushita, T., Rhyn, E.K., Houg, F. y Mac Cross, M. (1981) *Cancer Res.* 41, 2707.
138. Tsurvo, T., Iida, H., Hori, K., Tsukagoshi, S. y Sakurai, Y. (1981) *Cancer Res.* 41, 4484.
139. Bhalla, K., Nayak, R. y Grant, S. (1984) *Cancer Res.* 44, 5029.
140. Tanaka, M. y Yoshida, S. (1982) *Cancer Res.* 42, 649.
141. Hokin, L.E. y Hokin, M.R. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 18, 102.
142. Hokin, L.E. y Hokin, M.R. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 805.
143. Hokin, L.E. y Hokin, M.R. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 818.
144. Mitchell, R.H. y Kirk, C.J. (1981) *Trends in Pharmac. Sci.* 2, 86.
145. Berridge, M.J. (1984) *Biochem. J.* 220, 345.
146. Durell, J., Garland, J.T. y Friedel, R.O. (1969) *Science* 165, 862.
147. Hawthorne, J.N. (1983) *Biosci. Rep.* 3, 887.
148. Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984) *Nature* 312, 315.
149. Samuelsson, B. (1981) *Harvey Lect.* 75, 1.
150. Ringer, S. (1883) *J. Physiol.* 4, 29.
151. Katz, B. (1969) en "The Release of Neural Transmitter Substances" p. 1
Springfield:Thomas.
152. Fain, J.N. y Berridge, M.J. (1979) *Biochem. J.* 178, 45.
153. Fain, J.N. y Berridge, M.J. (1979) *Biochem. J.* 180, 655.
154. Fain, J.N. (1982) en "Hormone Receptors" (ed. Kohn, L.D.) p. 237 New
York:Wiley.
155. Majerus P.W., Neufeld, E.J. y Wilson, D.B. (1984) *Cell* 37, 701.
156. Kolesnick, R.N. y Gersherngorn, M.C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9514.
157. Rasmussen, H. y Barret, P.Q. (1984) *Physiol. Rev.* 64, 938.
158. Putney, J.W. Jr. (1979) *Pharmacol. Rev.* 30, 209.
159. Streb, H., Bayerdorffer, E., Hasse, W., Irvine, R.F. y Schultz, I. (1984)
J. Membr. Biol. 81, 241.
160. Dawson, A.P. e Irvine, R.F. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120,
858.
161. Prentki, M., Biden, T.J., Janjic, D., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y
Wolheim, C.B. (1984) *Nature* 309, 562.
162. Berridge, M.J. (1983) *Biochem. J.* 212, 849.
163. Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y Schulz, I. (1983) *Nature* 306,

67.

164. Burgess, G.M., Godfrey, P.P., Mc Kinley, J.S., Berridge, M.J., Irvine, R.F. y Putney, J.W. Jr. (1984) *Nature* 309, 63.
165. Joseph, S.K., Thomas, A.P., Williams, R.J., Irvine, R.F. y Williamson, J.R. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 3077.
166. Suematsu, E., Hirata, M., Hashimoto, T. y Kuriyama, H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 481.
167. Dawson, R.M.C., Fienkel, N., Jungalwala, F.B. y Clarke, N. (1971) *Biochem. J.* 122, 605.
168. Redman, C.M. y Hokin, L.E. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 207.
169. Hokin, L.E. y Huebner, D. (1967) *J. Cell. Biol.* 33, 521.
170. Schmidt, S.Y. (1983) *J. Cell. Biol.* 97, 832.
171. Anderson, R.E., Maude, M.B., Kelleher, P.A., Rayborn, M.E. y Holleyfield, J.G. (1983) *J. Neurochem.* 41, 764.
172. Dixon, J.F. y Hokin, L.E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14418.
173. Putney, J.W., Weiss, S.J., Van Der Walle, C. y Haddas, R.A. (1980) *Nature* 284, 345.
174. Lapetina, E.G., Billah, M.M. y Cuatrecasas, P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11984.
175. Holmes, R.P. y Yoss, N.L. (1983) *Nature* 305, 637.
176. Michell, R.H., Kirk, C.J., Jones, L.M., Downes, C.P. y Creba, J.A. (1981) *Phil. Trans. R. Soc.* B296, 123.
177. Hallcher, L.M. y Sherman, W.R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 10896.
178. Berridge, M.J., Downes, C.P. y Hanley, M.R. (1982) *Biochem. J.* 206, 587.
179. Bell, R.L., Kennerly, D.A., Stanford, N. y Majeurs, P.W. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3238.
180. Igarashi, Y. y Kondo, Y. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 759.
181. Habenicht, A.J.R., Glomset, J.A., King, W.C., Nist, C., Mitchell, C.D. y Ross, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1232.
182. Rebecchi, M.J., Kolesnick, R.N., Gershengorn, M.C. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 227.
183. Thomas, A.P., Marks, J.S., Coll, K.E. y Williamson, J.R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5716.
184. Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.*

252, 7610.

185. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3692.
186. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1213.
187. Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2273.
188. Kuo, J.F., Schatzman, R.C., Turner, R. y Mazzei, G.J. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* 35, 65.
189. Kikkawa, U., Takai, Y., Minakuchi, R., Inohara, S. y Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13341.
190. Kishimoto, A., Kajikawa, N., Shiota, M. y Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 1156.
191. Wise, B.C., Raynor, R.L. y Kuo, J.F. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 8481.
192. Nishizuka, Y. (1984) *Nature* 308, 693.
193. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7847.
194. Niedel, J.E., Khun, L.J. y Vandenbark, G.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 36.
195. Boutwell, R.K., Verma, A.K., Ashendel, C.C. y Astrup, E. (1983) en "Modulation and Mediation of Cancer by Vitamins" (eds. Meyskens, F.L. y Prasad, K.N.) p. 2, Karger, Basel.
196. Boutwell, R.K. (1982) en "Carcinogenesis" (eds. Heker, E., Fusemic, N., Kunz, W., Marks, F. y Theilman, W.) p. 1, Raven Press, New York.
197. Ashendel, C.L., Staller, J.M. y Boutwell, R.K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111, 340.
198. Verma, A.K. y Boutwell, R.K. (1977) *Cancer Res.* 37, 2196.
199. Fujita, I., Irita, K., Takeshige, K. y Minakami, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 313.
200. Putney, J.W. Jr. (1981) *Life Sci.* 29 1183.
201. Van Den Bosch, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 604, 191.
202. Billah, M.H., Lapetina, E.G. y Cuatrecasas, P. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5399.
203. Neufeld, E.J. y Majerus, P.W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2461.

204. Rubin, R.P. (1982) en "Calcium and Cellular Secretion" New York:Plenum.
205. Peach, M.J. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 2745.
206. Litosch, I., Saito, Y. y Fain, J.N. (1982) *Am. J. Physiol.* 243, C222.
207. Withnell, M.R., Brown, T.J. y Diocee, B.K. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 507.
208. Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. y Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6701.
209. Rink, T.J., Sanchez, A., Hallam, T.J. (1983) *Nature* 305, 317.
210. Roach, P.J. y Goldman, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7170.
211. Taylor, M.V., Metcalfe, J.C., Hesketh, T.R., Smith, G.A. y Moore, J.P. (1984) *Nature* 312, 462.
212. De Chaffoy, D., Roevens, P. y Van Belle, H. (1984) *FEBS Lett.*, 173, 389.
213. Irvine, R.F., Lechter, A.J. y Dawson, R.M.C. (1984) *Biochem. J.* 218, 177.
214. Gomperts, B.D. (1983) *Nature* 306, 64.
215. Gilman, A.G. (1984) *Cell* 36, 577.
216. Goodhardt, M., Ferry, N., Geynet, P. y Hanoune, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 11577.
217. Hulme, E.C., Berrie, C.P., Birdsall, W.J.M. y Burgen, A.S.V. (1981) en "Drug receptors and their effectors" (ed. Birdsall, N.J.M.) p. 23, Macmillan, London.
218. Haslam, R.J. y Davidson, M.M.L. (1984) *FEBS Lett.* 174, 90.
219. Bishop, J.M.A. (1983) *Rev. Biochem.* 52, 301.
220. Mc Grath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D.V. y Levinson, A.D. (1984) *Nature* 310, 644.
221. Kamata, T. y Feramisco, J.R. (1984) *Nature* 310, 147.
222. Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J. y Wigler, M. (1985) *Cell* 41, 763.
223. Kelleher, B.J., Pressin, J.E., Ruoho, A.E. y Johnson, G.L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4316.
224. Loeb, L. (1974) "Molecular Analysis of Lymphocyte Transformation" monografía del Fox Chase Center of Cancer and Medical Sci., School of Medicine, Univ. de Pennsylvania.
225. Hasegawa-Sasaki, H. y Sasaki, T. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 754, 305.
226. Masuzawa, Y., Osawa, T., Inowe, K. y Najima, S. (1971) *Biochim. Biophys.*

- Acta 326, 339.
227. Hui, D. y Harmony, J.A.K. (1980) *Biochem. J.* 192, 91.
228. Michell, R.H. (1982) *Cell Calcium* 3, 413.
229. Dicker, P. y Rozengurt, E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 433.
230. Moolenaar, W.H., Tsien, R.Y., Van Der Saag, P.T. y Laat, S.W. (1983) *Nature* 304, 645.
231. L'Allemain, G., Franchi, A., Cragoe, E. Jr. y Pouyssegur, J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 4313.
232. Hesketh, T.H., Moore, J.O., Morris, J.D.H., Taylor, M.V., Rogers, J., Smith, G.A. y Metcalfe, J.C. (1985) *Nature* 313, 481.
233. Berridge, M.J. (1975) *J. Cycl. Nucleot. Res.* 1, 305.
234. Allan, D.I. y Michell, R.H. (1977) *Biochem. J.* 164, 389.
235. Sawyer, T. y Cohen, S. (1981) *Biochemistry* 20, 6280.
236. Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.J. y Laat, S.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8066.
237. Jaffe, L.F. (1983) *Devl. Biol.* 99, 265.
238. Berridge, M.J., Helsop, J.P., Irvine, R.F. y Brown, K.D. (1984) *Biochem. J.* 222, 195.
239. Brown, K.D., Blay, J., Irvine, R.F., Helsop, J.P. y Berridge, M.J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 377.
240. Carney, D.H., Scott, D.L., Gordon, E.A. y Labelle, E.F. (1985) *Cell* 42, 479.
241. Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K. et al. (1983) *Science* 221, 275.
242. Waterfield, H.D., Scrace, G.T., Whittee, N. et al. (1983) *Nature* 304, 35.
243. Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G. et al. (1984) *Nature* 307, 521.
244. Macphee, C.H., Drummond, A.H., Otto, A. y Jimenez de Asua (1984) *J. Cell. Physiol.* 119, 35.
245. Macara, I.G. (1985) *Am. J. Physiol.* 248, C3-C11.
246. Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L.C. y Erikson, R.L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2117.
247. Macara, I.G., Marinetti, G.V. y Balduzzi, P.C. (1984) *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA 81, 2728.
248. Gould, K.L., Woodgett, J.R., Cooper, J.A., Buss, J.E., Shalloway, D. y Hunter, T. (1985) Cell 42, 849.
249. Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. y Leder, P. (1983) Cell 35, 603.
250. Makino, R., Hayashi, K. y Sugimura, T. (1984) Nature 310, 697.
251. Campisi, J., Gray, H., Pardee, A.B., Dean, M. y Sonenshein, G.E. (1984) Cell 36 241.
252. Kaibuchi, K., Tsuda, T., Kikuchi, A., Tanimoto, T., Yamashita, T. y Takai, Y. (1986) J. Biol. Chem. 261, 1187.
253. Blanchard, J.M., Piechaczyk, C.D., Chambard, A., Franchi, A., Pouyssegur, J. y Jeanteur, P. (1985) Nature 317, 443.
254. Evan, G.I. y Hancock, D.G. (1985) Cell 43 253.
255. Coughlin, S.R., Lee, W.M.F., Williams, P.W., Giels, G.M. y Williams, L.T. (1985) Cell 43, 243.
256. Filmus, J. y Buick, R.N. (1985) Cancer Res. 45, 822.
257. Faletto, D.L., Arrow, A.S. y Macara, I.G. (1985) Cell 43, 315.
258. Land, H., Parada, L. y Weinberg, R.A. (1983) Nature 304, 596.
259. Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. y Scher, C.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4481.
260. Stiles, C.D., Capone, G.T., Scher, C.D., Antoniades, H.N., Van Wyk, J.J. y Pledger, W.J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1279.
261. Schou, M. (1974) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 231.
262. Allison, J.H. y Stewart, M.A. (1971) Nature 233, 267.
263. Niccarato, W.F., Ray, R.E. y Wells, W.W. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 194.
264. Allison, J.H. y Blisner, M.E. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1332.
265. Sherman, W.R., Leavitt, A.L., Honchar, M.P., Hallcher, L.M. y Phillips, B.E. (1981) J. Neurochem. 36, 1947.
266. Eisenberg, P. Jr. (1978) en "Cyclitol and Phosphoinositides" (eds. Wells, W.W. y Eisenberg, F. Jr.) p. 269, New York, Academic Press.
267. Spector, R., Lorenzo, A.V. (1975) Am. J. Physiol. 228, 1510.
268. Gillon, K.R.W. y Hawthorne, J.N. (1983) Biochem. J. 210, 775.
269. Staunton, D.A., Magistretti, P.J., Shoemaker, W.J., Deyo, S.N. y Bloom,

- F.E. (1982) *Brain Res.* 232, 401.
270. Aprison, M.H., Takahashi, R. y Tachiki, T. (1978) en "Neuropharmacology and Behaviour" (eds. Harber, B. y Aprison, M.H.) p. 23, New York, Plenum.
271. Simmonds, S.H. y Strange, P.G. (1985) *Neurosci. Lett.* 60, 267.
272. Fridlender, B.R., Medrano, E. y Mordoh, J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1128.
273. Collins, S.J., Gallo, R.C. y Gallagher, R.E. (1977) *Nature* 270, 347.
274. Breitman, T.R., Selonick, S. y Collins, S.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 17, 2936.
275. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. y Gallo, R.C. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2458.
276. Segal, A.W. (1974) *Lancet* 2, 1248.
277. Teerenhovi, L., Knuutila, S., Ekblom, M., Rossi, L., Brogstrom, G.H., Tallman, I.K., Anderson, L. y de la Chapelle, A. (1984) *Blood* 64, 1116.
278. Thompson, R.J. (1974) *FEBS Lett.* 49, 223.
279. Hajra, A.K., Seguin, E.B. y Agranoff, B.W. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1609.
280. Furth, M.E., Davis, L.J., Fleurdelys, B. y Scolnik, E.M. (1982) *J. Virol.* 43, 294.
281. Burrone, O.R., Kefford, R.F., Gilmore, D. y Milstein, C. (1985) *EMBO J.* 4, 2855.
282. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
283. Bartlett, G.R. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 466.
284. Roberts, D. y Peck, C. (1981) *Cancer Res.* 41, 505.
285. Graham, F.L. y Whitmore, G.F. (1970) *Cancer Res.* 30, 2627.
286. Plagemann, P.G.W. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 233, 688.
287. Willey, J.S., Jones, S.P. y Sawyer, W.N. (1983) *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 1067.
288. Kessel, D. y Shurin, S.B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 163, 179.
289. Bell, D.E. y Fridland, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 606, 57.
290. Baguley, B.C. y Falkenhang, E.M. (1975) *Eur. J. Cancer* 11, 43.
291. Raetz, C.R.H., Chu, M.Y., Sprinaslara, S.P. y Turcotte, J.P. (1978) *Science* 196, 303.

292. Chu, M.Y. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 223.
293. Hawtrey, A.D., Scott-Burden, T. y Robertson, G. (1974) *Nature* 252, 58.
294. Crowther, J.P., Cooper, I.A. y Woodcock, D.M. (1985) *Cancer Res.* 45, 4291.
295. Early, A., Preisler, H.D. y Slocum, H. (1982) *Cancer Res.* 42, 1587.
296. Capizzi, R.L., Griffin, F. y Cheng, Y.C. (1980) *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 21, 148.
297. Zittoun, R., Marie, J.P., Pommier, Y. y Pochat, L. (1982) *Medical and Pediatric Oncology Supl.* 1, 259.
298. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., Mc Credie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ruscetti, F. y Gallo, R. (1979) *Blood* 54, 713.
299. Abraham, J. y Rovera, G. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 31, 165.
300. Collins, S.J., Ruscetti, F., Gallagher, R.E. y Gallo, R. (1979) *J. Exp. Med.* 149, 969.
301. Newberger, P., Chovaiec, M., Greenberger, J. y Cohen, H. (1979) *J. Cell. Biol.* 82, 315.
302. Katz, J., Kunofsky, S., Patton, R.E. y Allaway, N.C. (1967) *Cancer* 20, 2194.
303. Rassidakis, N.C., Kelepouris, M. y Fox, S. (1971) *Internat. Mental Hlth. Res. Newslett.* 13, 6.
304. Csatory, L.K. (1972) *Lancet* 2, 338.
305. Eike, W.J. (1973) *Med. Klin.* 68, 1015.
306. Boder, G.B., Paul, D.C. y Williams, D.C. (1983) *Eur. J. Cell Biol.* 31, 349.
307. Zborowski, J. y Brindley, D.N. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 751, 81.
308. Pasquaré de García, S.J. y Giusto, N.M. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 875, 195.
309. Laporte, D.C., Wierman, B.M. y Storm, D.R. (1980) *Biochemistry* 19, 3814.
310. Tanaka, T. y Hidaka, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11078.
311. Kwant, W.O. y Seeman, P. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 193, 338.
312. Allan, D. y Mitchell, R.H. (1977) *Biochem. Soc. Transac.* 5, 55.
313. Crifó, C., Bozzi, A., Mondovi, B. y Strom, R. (1973) *Biochem. Pharmacol.* 22, 2511.

314. Dybing, E. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23, 705.
315. Eagle, H., Oyama, Y., Levy, M. y Freeman, A. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 191.
316. Suolinna, E.M., Buchsbaum, R.N. y Racker, E. (1975) *Cancer Res.* 35, 1865.
317. Graziani, Y. y Chayot, R. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 397.
318. Lang, D.R. y Racker, E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 469, 52.
319. Kuriki, Y. y Racker, E. (1976) *Biochemistry* 15, 4951.
320. Suolinna, E.M., Lang, D.R. y Racker, E. (1974) *J. Natl. Cancer. Inst.* 53, 1515.
321. Graziani, Y., Winikoff, J. y Chayot, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 497, 499.
322. Graziani y Chayot, R. (1977) *Biochem. Pharmacol.* 26, 1259.
323. Graziani, Y., Chayot, R., Feldman, B. y Levy, J. (1980) *Adv. Cyclic Nucleot. Res.* 14, 674.
324. Cochet, J., Flige, J.J., Pirollet, F., Keramidas, M. y Chambaz, E.M. (1982) *Biochem. Pharmacol.* 31, 1357.
325. Erikson, R.L., Purchio, A.F., Erikson, E., Collet, M.S. y Brugge, J.S. (1980) *J. Cell. Biol.* 87, 319.
326. Blithe, D.K., Richert, N.D. y Pastan, I.H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7135.
327. Graziani, Y., Erikson, E. y Erikson, R.L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2126.
328. Graziani, Y., Erikson, E. y Erikson, R.L. (1983) *Eur. J. Biochem.* 135, 583.
329. Langbeheim, H., Shih, T. y Scolnick, E.M. (1980) *Virology* 106, 292.
330. Childs, C.B., Proper, J.A., Tucker, R.F. y Moses, H.L. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5312.
331. Betsholtz, C., Westermark, B., Ek, B. y Heding, C.H. (1984) *Cell* 39, 447.
332. Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A. y Minna, J.D. (1985) *Nature* 316, 823.
333. Meuer, S.C., Hussey, R.E., Cantrell, D.A., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F., Smith, K.A. y Reinherz, E. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1509.
334. Freinkel, N., El Younsi, C. y Dawson, R.H.C. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59,

- 245.
335. Eichberg, J., Shein, H.M., Schwartz, M. y Hauser, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3615.
336. Eichberg, J., Gates, J. y Hauser, G. (1979) Biochim. Biophys. Acta 573, 90.
337. Hawthorne, J.N., Pickard, M.R. y Griffin, H.D. (1977) Biochem. Soc. Transac. 5, 514.
338. Hawthorne, J.N. y Pickard, M.R. (1977) Biochem. Soc. Transac. 5, 52.
339. Laychock, S.G. (1983) Biochem. J. 216, 101.
340. Sribney, M., Dove, J.L. y Lyman, E.M. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 749.
341. Mónico, M.E. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2137.
342. Mónico, M.E. y Woods, D. (1983) J. Biol. Chem. 258, 15125.
343. Koren, K. y Mónico, M.E. (1986) J. Biol. Chem. 261, 88.
344. Freter, C.E., Lippman, M.E. y Gelmann, E.P. (1986) 77th Annual Meeting of the Amer. Asoc. Cancer Res. Proceedings 27, 221.