

## Tesis de Posgrado

# N-glicosilación de proteínas en epidídimo de rata

Iusem, Norberto Daniel

1987

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Iusem, Norberto Daniel. (1987). N-glicosilación de proteínas en epidídimo de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2032\\_Iusem.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2032_Iusem.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Iusem, Norberto Daniel. "N-glicosilación de proteínas en epidídimo de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2032\\_Iusem.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2032_Iusem.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Tesis  
2032  
Ej.2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TEMA DE TESIS  
N-Glicosilación de Proteínas en Epidídimo de Rata

AUTOR  
Norberto Daniel Iusem

DIRECTOR DE TESIS  
Enrique Belocopitow

LUGAR DE TRABAJO  
Instituto de Investigaciones Bioquímicas  
"Fundación Campomar"

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas

1987

Tesis  
2032  
Ej.2

A Alicia, quien me acompañó durante todos estos años

A Marina y Daniela, "esas locas bajitas"

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Belocopitow, Director de Tesis, por su estímulo, su paciencia, y por haberme permitido una amplia libertad de acción en el trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir y Miembros del Consejo Directivo, por haberme permitido la realización de este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico en la forma de Becas de Iniciación y Perfeccionamiento que me otorgara.

Al Dr. Jorge Blaquier, Lucrecia Piñeiro, María A. de Larminat y Jorge Tezón, con quienes, en un agradable clima dentro del Instituto de Biología y Medicina Experimental, compartí buena parte de los experimentos que se describen en esta tesis.

Al Dr. Armando J. Parodi y sus colaboradores, por su ayuda al brindarme conocimientos y metodología para el análisis estructural de azúcares.

A los Dres. Israel Algranati, Oscar Burrone y Manuel García Patrone, por su amable disposición en la enseñanza de técnicas electroforéticas.

Al Dr. Mario Alperín, a quien le debo su generosa transmisión de ideas, que resultaron cruciales para la concreción de esta tesis.

Al Dr. Marcelo Dankert, por su interés y comentarios críticos acerca de mis logros durante estos años.

Al Dr. Oscar Burrone, de quien aprendí mucho gracias a su visión amplia e integradora de la ciencia.

A mis amigos Tony Coira y Eduardo Cafferatta, por eso.

A mis compañeros del I.I.B., en especial a Angel Cataldi, Daniel Arias, Silvia Cabral, Laura Bover, Juan C. Bossio, Lolita Turró, Roberto Macina, Sergio Tisminetzky, Mariana Resnicoff, Roberto Geremía y Juan J. Miret, por los gratos momentos compartidos.

A Daniel Boscoboinik, por el agradable clima de compañerismo en el laboratorio.

A Norberto Malarini, por su invaluable disposición y profesionalismo en la tarea de confeccionar las ilustraciones.

A Irene Cargiano, por su dedicación en la transcripción y procesamiento de los textos de esta tesis.

## ABREVIATURAS

Asn	asparagina
BSA	seroalbúmina bovina
BD	Blue Dextran
CA	acetato de ciproterona (6 $\alpha$ -cloro-17-hidroxi-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -metilen-4,6-pregnadieno-3,20-diona-17-acetato
Con A	concanavalina A
cpm	cuentas por minuto
CTP	citidina 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DHT	5 $\alpha$ -dihidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dol	dolicol
Dol-P	dolicol monofosfato
Dol-PP	dolicol pirofosfato
EDTA	etilendiamino tetraacetato
Endo-H	endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H
Fuc	fucosa
g	aceleración de la gravedad
G <sub>1</sub>	GlcMangGlcNac <sub>1-2</sub>
G <sub>2</sub>	Glc <sub>2</sub> MangGlcNac <sub>1-2</sub>
G <sub>3</sub>	Glc <sub>3</sub> MangGlcNac <sub>1-2</sub>
Gal	galactosa
GDP	guanosina 5'-difosfato
Glc	glucosa

GlcNac	N-acetilglucosamina
h	hora(s)
Ig	inmunoglobulina
Ka	constante de afinidad
KDa	kilodaltons
Km	constante de Michaelis
M <sub>5</sub>	Man <sub>5</sub> GlcNac <sub>1-2</sub>
M <sub>6</sub>	Man <sub>6</sub> GlcNac <sub>1-2</sub>
M <sub>7</sub>	Man <sub>7</sub> GlcNac <sub>1-2</sub>
M <sub>8</sub>	Man <sub>8</sub> GlcNac <sub>1-2</sub>
M <sub>9</sub>	Man <sub>9</sub> GlcNac <sub>1-2</sub>
mA	miliamperes
Man	manosa
MEM	medio mínimo esencial de Eagle
min	minutos
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NeuAc	ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico)
<u>P</u>	nivel de significación estadística
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	buffer de fosfatos con NaCl y KCl
Pi	fosfato inorgánico
PP	pirofosfato
ppdo	precipitado
prot	proteína
<u>r</u>	coeficiente de correlación lineal

REL	retículo endoplásmico liso
RER	retículo endoplásmico rugoso
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	PAGE realizada con SDS (condiciones desnaturalizantes)
seg	segundos
sn	sobrenadante
TCA	ácido tricloroacético
TM	tunicamicina
TP	propionato de testosterona
Tris	2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U	uniformemente marcado
UDP	uridina 5'-difosfato
V	voltios
W	watios





1.4. Antecedentes inmediatos y objetivos de la investigación .....	32
1.4.1. Concentración de dolicol en epidídimo .....	32
1.4.2. Evidencias de unión de proteínas de origen epididima- rio a espermatozoides .....	32
1.4.3. Objetivos del presente trabajo .....	34
2. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
2.1. Materiales químicos .....	36
2.1.1. Radioactivos .....	36
2.1.2. Enzimas .....	36
2.1.3. Materiales para cromatografía en columna .....	36
2.1.4. Otros .....	37
2.2. Animales .....	37
2.2.1. Condiciones de castración y terapia hormonal .....	37
2.2.2. Tratamiento previo de los animales para obtención de espermatozoides testiculares .....	38
2.3. Obtención de microsomas .....	38
2.3.1. Microsomas de epidídimo .....	38
2.3.2. Microsomas de hígado .....	39
2.4. Ensayos enzimáticos sobre microsomas epididimarios .....	39
2.4.1. Medición de la actividad de manosil transferasa .....	39
2.4.2. Medición de la actividad de glucosil transferasa .....	40
2.4.3. Determinación de la incorporación de ( <sup>14</sup> C)manosa a Dol-PP-oligosacáridos .....	40

2.4.4. Determinación de la incorporación de ( <sup>14</sup> C)manosa a proteína .....	41
2.4.5. Determinación de Dol-P fosfatasa .....	41
2.4.6. Determinación de Dol fosfoquinasa .....	41
2.5. Cuantificación de Dol-P en microsomas epididimarios .....	42
2.6. Condiciones de incubación de tejido .....	42
2.6.1. Extracción de epidídimos de los animales .....	42
2.6.2. Incubaciones con ( <sup>14</sup> C)glucosa .....	44
2.6.3. Incubaciones con (2- <sup>3</sup> H)manosa y otros precursores radioactivos .....	44
2.7. Cuantificación de la incorporación de los precursores radioactivos a proteína .....	45
2.7.1. Proteína intracelular .....	45
2.7.2. Proteína liberada al medio .....	46
2.8. Técnicas analíticas generales .....	46
2.8.1. Cromatografía en papel .....	47
2.8.2. Electroforesis en papel .....	47
2.9. Análisis estructural de oligosacáridos intracelulares de alta manosa .....	47
2.9.1. Oligosacáridos unidos a Dol-PP .....	48
2.9.2. Oligosacáridos unidos a proteína .....	49
2.10. Metodología usada para el análisis de proteínas secretadas .....	50
2.10.1. Métodos cromatográficos .....	50
2.10.1.1. Filtración molecular por geles .....	50
2.10.1.2. Cromatografía de afinidad mediante Conca-	

navalina A-agarosa .....	51
2.10.2. Tratamientos enzimáticos .....	51
2.10.2.1. Tratamiento con Endo-H .....	51
2.10.2.2. Tratamiento con fosfatasa alcalina .....	52
2.10.3. Métodos electroforéticos .....	52
2.10.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) .....	52
2.10.4. Métodos químicos para el análisis estructural de oligosacáridos .....	54
2.10.4.1. Acetólisis .....	54
2.10.4.2. Hidrólisis total de oligosacáridos .....	55
2.11. Iodinación de proteínas .....	55
2.12. Experimentos de unión a espermatozoides .....	56
2.12.1. Parámetros de la unión .....	56
2.13. Determinaciones de radioactividad .....	57
2.14. Otras determinaciones .....	58
2.15. Análisis estadístico .....	58

### 3. RESULTADOS

3.1. Dependencia androgénica de la N-glicosilación de proteínas en epidídimo de rata .....	59
3.1.1. Efecto de testosterona administrada "in vivo" sobre actividades enzimáticas del ciclo del dolicol en mi- crosomas epididimarios .....	59

3.1.1.1. Influencia de la castración sobre las actividades de manosil y glucosil transferasas .....	59
3.1.1.2. Efecto de testosterona sobre manosil transferasa .....	61
3.1.1.3. Efecto androgénico sobre la incorporación de manosa en Dol-PP-oligosacáridos y en proteína .....	66
3.1.1.4. Efecto androgénico sobre Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa .....	69
3.1.2. Efecto de andrógenos sobre niveles de Dol-P endógeno ....	72
3.1.3. Análisis estructural de oligosacáridos intracelulares unidos a Dol-PP y unidos N-glicosídicamente a proteína. Evaluación de la influencia androgénica .....	74
3.1.3.1. Incubaciones de tejido con ( <sup>14</sup> C)glucosa .....	75
3.1.3.1.1. Dol-PP-oligosacáridos .....	75
3.1.3.1.2. Oligosacáridos unidos a proteína ....	76
3.1.3.2. Incubaciones de tejido con (2- <sup>3</sup> H)manosa .....	82
3.1.3.2.1. Dol-PP-oligosacáridos .....	84
3.1.3.2.2. Oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína .....	84
3.2. Aislamiento y caracterización de glicoproteínas secretorias ...	89
3.2.1. Cinética de incorporación de (2- <sup>3</sup> H)manosa a cortes de tejido .....	94
3.2.2. Inhibición por tunicamicina de la incorporación de (2- <sup>3</sup> H)manosa en glicoproteína .....	96

3.2.3. Identificación de N-glicoproteínas secretadas .....	98
3.2.3.1. Biosíntesis del esqueleto polipeptídico de GP17 .....	103
3.2.4. Naturaleza ácida de GP17 .....	107
3.2.4.1. Presencia de fosfatos .....	107
3.2.5. Análisis de la porción sacarídica de GP17 .....	112
3.2.5.1. Sensibilidad a Endo-H .....	112
3.2.5.2. Tamaño de la porción sacarídica .....	116
3.2.5.3. Identidad de las unidades monosacarídicas marcadas .....	119
3.2.5.4. Presencia de uniones glicosídicas 1--6 .....	119
3.2.6. Purificación de GP17 .....	122
3.2.6.1. Primera etapa: filtración molecular mediante Bio-Gel P-60 .....	122
3.2.6.2. Segunda etapa: cromatografía de afinidad me- diante Concanavalina A. Iodinación .....	126
3.2.7. Unión de GP17 a espermatozoides .....	132
3.2.7.1. Parámetros inherentes a la unión. Afinidad y número de receptores .....	136

#### 4. DISCUSION

4.1. Efecto de andrógenos sobre las actividades de las enzimas del ciclo del dolicol .....	142
4.2. Análisis estructural de oligosacáridos .....	147

4.2.1. Oligosacáridos unidos a Dol-PP .....	147
4.2.2. Oligosacáridos de "alta manosa" unidos a proteína .....	148
4.2.3. Comparación entre los sistemas de marcación con ( <sup>14</sup> C)glucosa y (2- <sup>3</sup> H)manosa .....	149
4.3. Análisis de glicoproteínas secretadas .....	152
4.3.1. GP17 .....	153
4.3.1.1. Estructura de GP17 .....	153
4.3.1.2. Unión de GP17 a espermatozoides. Implicancias biológicas .....	156
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	164
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	166

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Génesis de proteínas secretadas

La hipótesis de que proteínas integrales de membrana plasmática y proteínas secretadas son transportadas a la membrana plasmática vía un mecanismo general común fue originalmente propuesta por Palade (78). De acuerdo a tal modelo, estas proteínas son sintetizadas en polisomas unidos al retículo endoplásmico rugoso (RER) y son transportadas dentro de vesículas derivadas del retículo endoplásmico liso (REL) hasta el aparato de Golgi, desde donde otras vesículas las transportan hasta la membrana plasmática. Se piensa que este proceso de transporte intracelular consiste en un flujo de membranas, por el cual una vesícula se escinde de un compartimiento y se fusiona con el compartimiento membranoso siguiente, involucrando un sistema de reconocimiento entre membranas, aún desconocido.

Los principios básicos propuestos por Palade aún siguen vigentes. En efecto, en primer lugar, experimentos a nivel molecular revelaron la existencia de un mecanismo que media la transferencia de proteínas integrales de membrana y secretadas, durante su síntesis, a través de membranas. Este mecanismo es conocido como "descarga vectorial de polipéptidos nacientes" (95). Blobel y Dobberstein postularon que la información determinante de la asociación específica entre polisomas y membranas del retículo endoplásmico está contenida en el segmento -NH<sub>2</sub> terminal del polipéptido naciente, que actuaría como señal. Este postulado es la esencia de lo que dichos autores llamaron "hipótesis de la señal" (11). El segmento peptídico "señal" en muchos casos es removido durante la elongación del polipéptido, no encontrándose en la



proteína madura, y contiene una alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos, lo que determinaría su afinidad por las membranas, aunque sin explicar su especificidad por las del RER (108). En los últimos años, se han generado evidencias directas en favor de la hipótesis de la señal gracias a la manipulación por técnicas de ingeniería genética de la porción  $-NH_2$  terminal, lo que permitió que proteínas normalmente localizadas en el citoplasma puedan ser transportadas al espacio extracelular. En segundo lugar, hay varias evidencias experimentales indirectas que sugieren que proteínas integrales de membrana plasmática y proteínas secretadas constitutivamente coexisten en las mismas vesículas de transporte intracelular (92), aunque hay casos especiales de proteínas cuya secreción es inducida por estímulo hormonal, las que parecen viajar en vesículas especializadas, específicas para proteínas de secreción.

¿Qué es, entonces, lo que determina que una proteína quede asociada a la membrana plasmática y que otra sea liberada al exterior de la célula? Blobel intentó responder esta pregunta, introduciendo la noción de "señales stop" (95), concepto apoyado por el análisis de secuencias de segmentos peptídicos embebidos en membranas. Dichas secuencias son hidrofóbicas y están seguidas de aminoácidos cargados, los que provocarían el anclaje del polipéptido naciente en la membrana del RER. Se piensa que una proteína que contiene dichas secuencias viajará en todas las vesículas de transporte intracelular anclada a las respectivas membranas, hasta llegar por consiguiente anclada a la membrana plasmática. En cambio si la señal de anclaje está ausente, la proteína viajará "soluble" dentro de las vesículas, y al fusionarse la última vesícula de transporte con la membrana plasmática, la proteína será liberada

al exterior.

## 1.2. Glicoproteínas en eucariotes superiores

Existe un consenso generalizado por el cual se acepta la definición de glicoproteínas dada por Gottschalk (39), según la cual, las glicoproteínas son proteínas conjugadas conteniendo unidades de azúcar en número relativamente pequeño (oligosacáridos), generalmente ramificados y unidos covalentemente a la cadena polipeptídica. Esta definición deja afuera a los llamados "proteoglicanos", que también poseen una unión monosacárido-aminoácido, pero con un alto contenido de unidades monosacáridicas (con una unidad repetitiva generalmente lineal) por molécula.

### 1.2.1. Clasificación y estructura

Los oligosacáridos unidos a proteína se dividen en dos grandes grupos, "serina/treonina" y "asparagina", de acuerdo al aminoácido involucrado en la unión entre las partes proteica y glicosídica (79).

#### 1.2.1.1. Oligosacáridos del grupo "serina/treonina"

En los oligosacáridos de este grupo, los hidroxilos de los aminoácidos serina o treonina están unidos covalentemente a unidades de N-acetilgalactosamina, por lo cual se dice que dichos oligosacáridos están unidos O-glicosídicamente. Una característica de la unión entre serina o treonina y N-acetilgalactosamina es que se rompe bajo condiciones alcalinas suaves, propiedad ésta que se aprovecha en el laboratorio para liberar oligo-

sacáridos unidos O-glicosídicamente a proteína.

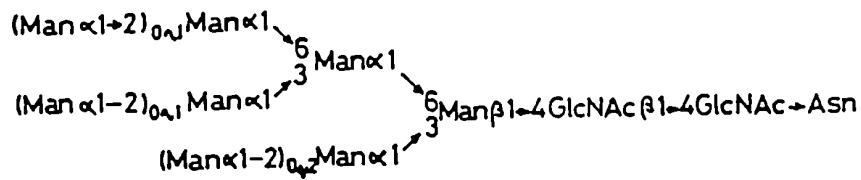
Cabe aclarar que existen otros tipos de unión O-glicosídica, involucrando otros aminoácidos, p. ej. la formada entre galactosa y el grupo -OH de la hidroxilisina peptídica (57), como ocurre en los colágenos de las membranas basales de organismos animales, y la formada entre un residuo de arabinosa y un residuo de hidroxiprolina, que tiene lugar en las glicoproteínas de las paredes celulares vegetales (57).

#### 1.2.1.2. Oligosacáridos del grupo "asparagina"

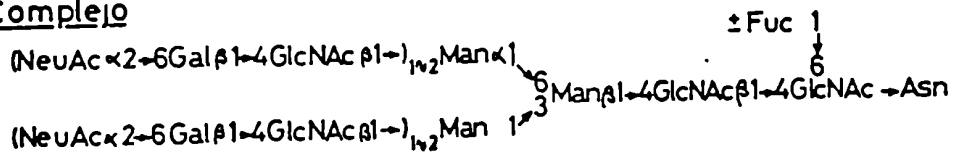
Los oligosacáridos pertenecientes a este grupo tiene en común un núcleo o "core", que es un pentasacárido,  $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNac}$ , unido por el residuo de GlcNac terminal al N de la cadena lateral de un resto asparagina de la proteína (79). En virtud de lo anterior, se dice que estos oligosacáridos están unidos N-glicosídicamente, y a las glicoproteínas de este tipo se las llama N-glicoproteínas.

Dentro de este grupo existen tres subgrupos: los oligosacáridos del subgrupo denominado de "alta manosa", que poseen de 2 a 6 restos de manosa adicionales, es decir que contienen de 5 a 9 unidades de manosa en total; los del subgrupo "complejo", en los cuales el "core" mencionado posee cadenas adicionales externas de N-acetilglucosamina, galactosa, siálico, y en algunos casos fucosa; y los oligosacáridos del subgrupo "híbrido", que tienen características propias de los dos primeros subgrupos. En la Fig. 1-1 se muestran las estructuras de los oligosacáridos pertenecientes a cada uno de los tres subgrupos mencionados. En una misma molécula de glicoproteína pueden

### Alta manosa



### Complejo



### Híbrido

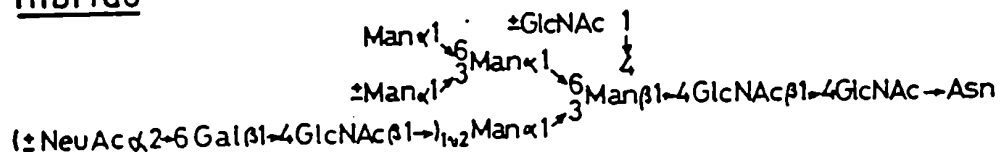


Fig. 1-1: Subgrupos de N-glicoproteínas.

Los residuos señalados con  $\pm$  pueden estar ausentes.

coexistir oligosacáridos de los dos grupos y los tres subgrupos referidos.

Una característica de la unión N-glicosídica es su relativa estabilidad frente al álcali, requiriéndose, para la liberación de los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente, tratamientos alcalinos más drásticos. La liberación del grueso del oligosacárido también es posible bajo condiciones suaves, mediante el empleo de las endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas. Estas enzimas hidrolizan la unión entre los dos residuos de N-acetilglucosamina del "core" unidos por un enlace  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4. La primera enzima de este grupo descubierta fue encontrada en *Streptomyces griseus* por Tarentino y Maley (107), y fue llamada endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa H (Endo-H) porque actúa sobre los oligosacáridos "high mannose" ("alta manosa").

#### 1.2.1.3. Microheterogeneidad de los oligosacáridos

Los oligosacáridos pertenecientes a cualquiera de los grupos mencionados pueden no tener la misma composición de monosacáridos en todas las moléculas de una glicoproteína determinada, en cuyo caso se habla de microheterogeneidad.

#### 1.2.2. Pasos biosintéticos que llevan a la glicosilación de proteínas

##### 1.2.2.1. Glicoproteínas del grupo serina/treonina

La biosíntesis de las glicoproteínas del grupo serina/treonina ocurre por glicosilaciones catalizadas por glicosiltransferasas (99). La primera transferencia es la de un residuo de N-acetilgalactosamina a partir de

UDP-N-acetilgalactosamina, al grupo -OH de serina o treonina en la cadena polipeptídica. La elongación del oligosacárido se produce por adición secuencial de unidades monosacáridicas a partir de los correspondientes nucleótido-azúcares, no habiéndose hallado ningún intermediario entre el nucleótido-azúcar y la proteína.

La estructura final del oligosacárido está determinada por factores genéticos a través del tipo de especificidad y proporciones relativas de glicosiltransferasas producidas en una célula determinada y de la disponibilidad de nucleótido-azúcares (98,99).

Las evidencias experimentales tienden a confirmar que la glicosilación de residuos serina y treonina ocurre en el aparato de Golgi, sobre polipéptidos ya terminados (97).

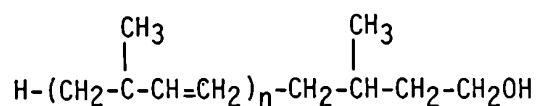
#### 1.2.2.2. Glicoproteínas del grupo asparagina

##### 1.2.2.2.1. Participación del dolicol

A fines de la década del sesenta se encontró que sacáridos unidos a lípidos por puentes P y PP eran intermediarios en la síntesis de polisacáridos de la pared celular bacteriana, como en la mureína (trabajos de Strominger (3) o en el lipopolisacárido (trabajos de Robbins y col. (123)). El lípido resultó ser el undecaprenol, formado por 11 unidades de isopreno. A raíz de estos resultados, Luis F. Leloir y su equipo de colaboradores decidieron investigar la posibilidad de que lípido-azúcares pudiesen ser intermediarios de algún compuesto en células eucarióticas. Así, incubando microsomas de hígado con UDP-(<sup>14</sup>C)Glc, compuesto que había sido descubierto

por Leloir investigando el metabolismo de la galactosa (23), se encontró que se formaba un compuesto radioactivo soluble en solventes orgánicos. El compuesto formado resultó ser Glc-P-dolicol (8), sustancia desconocida hasta ese momento, y que era capaz de transferir su resto glucosilo a un aceptor endógeno. Este, una vez glucosilado resultó ser un oligosacárido que contenía glucosa, manosa y N-acetilglucosamina unido a dolicol (Dol) por un puente de PP y era transferido a proteínas endógenas (80). Análogamente, incubando microsomas con GDP-Man se formaba Man-P-Dol, y si el nucleótido azúcar era UDP-GlcNac, los productos obtenidos eran GlcNac-PP-Dol y GlcNac<sub>2</sub>-PP-Dol.

La porción lipídica, Dol, ya había sido descripta con anterioridad como un componente biológico natural (19). Su estructura es la siguiente:



El Dol aislado de tejidos animales es siempre  $\alpha$ -saturado (a diferencia de su análogo bacteriano, el undecaprenol) y contiene de 17 a 21 unidades isoprénicas.

Numerosas evidencias experimentales (81) han aclarado la naturaleza de los pasos enzimáticos involucrados en la formación del oligosacárido unido al Dol fosforilado y en su transferencia a proteína. Tales reacciones se engloban en lo que es dado en llamar "ciclo del dolicol" (esquematisado en la Fig. 1-2), dado que el Dol-P es reciclado luego de la transferencia del oligosacárido a la proteína aceptora, no consumiéndose en forma neta. La primera reacción enzimática que lleva la adición del primer monosacárido, GlcNac, es inhibida por tunicamicina, familia de sustancias muy utilizada

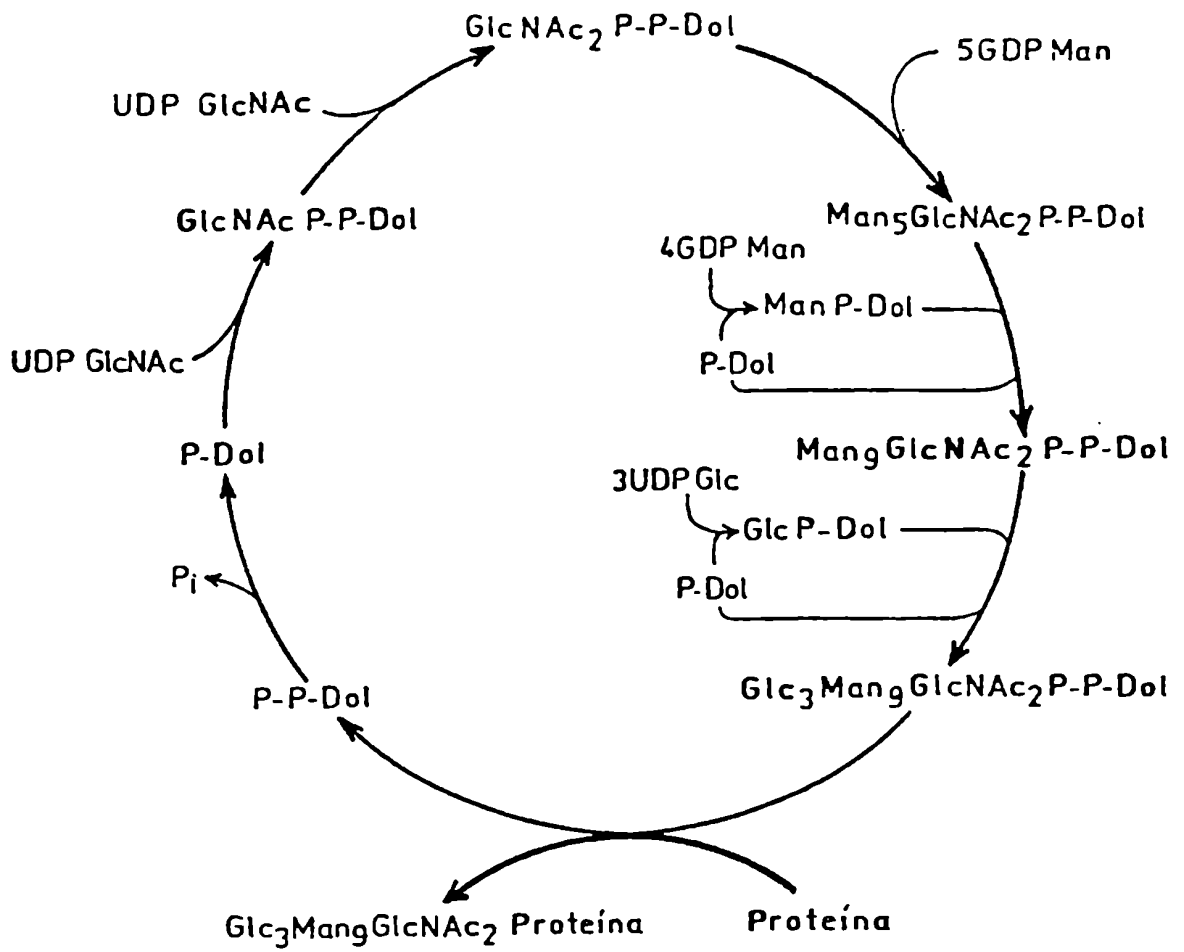


Fig. 1-2: Ciclo del dolicol.



como inhibidor de la N-glicosilación proteica (30). Los cinco primeros residuos de manosa son adicionados a partir de GDP-Man y los cuatro últimos a partir de Man-P-Dol (81). Los tres residuos de glucosa son transferidos a MangGlcNac<sub>2</sub>-PP-Dol a partir de Glc-P-Dol, dando lugar, finalmente, a un compuesto de composición Glc<sub>3</sub>MangGlcNac<sub>2</sub>-PP-Dol, cuya estructura totalmente dilucidada (64) se ilustra en la Fig. 1-3. La porción sacarídica de este último compuesto presumiblemente es la misma que Parodi y col. (80) lograron transferir a proteína antes de conocer su estructura precisa. Ahora se sabe que esta sustancia constituye el lípido-oligosacárido intermediario más abundante en varios tipos celulares, y que es el dador normal de la porción sacarídica, la cual es transferida en bloque a la proteína aceptora (103).

Cada residuo de azúcar en una posición particular es adicionada al oligosacárido creciente siguiendo una secuencia definida. Esta afirmación se basa en el hecho de que las estructuras de oligosacáridos unidos a Dol-PP de tamaños menores que el del oligosacárido final son únicas (26), no habiéndose detectado cantidades significativas de los demás isómeros posibles si la adición de azúcares fuera al azar. En virtud de estos resultados, se ha propuesto la secuencia de biosíntesis presentada en la Fig. 1-4.

Todas las reacciones del ciclo del Dol ocurren en el RER (10) y se demostró que la transferencia del oligosacárido requiere inserción del polipéptido a la membrana y tiene lugar antes de que la síntesis de éste haya terminado (91), es decir que la N-glicosilación es un evento ligado a membranas y co-traducciona1.

La presencia del ciclo del dolicol es considerada una característica universal de las células eucarióticas (103).

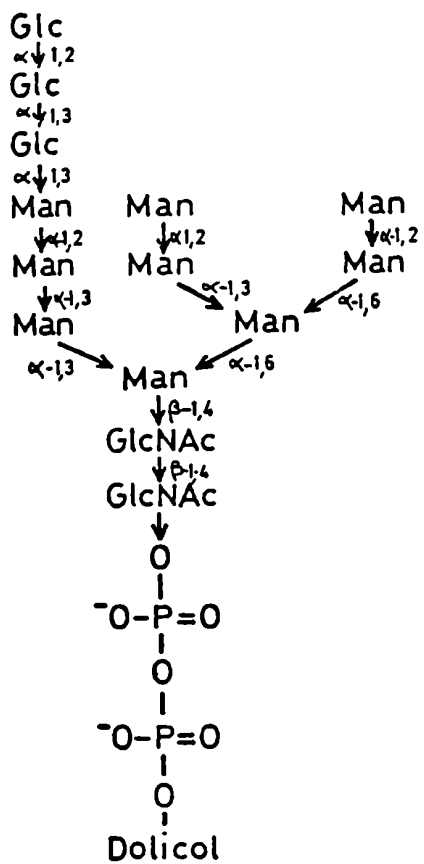


Fig. 1-3: Estructura del oligosacárido transferido de Dol-PP a proteína.

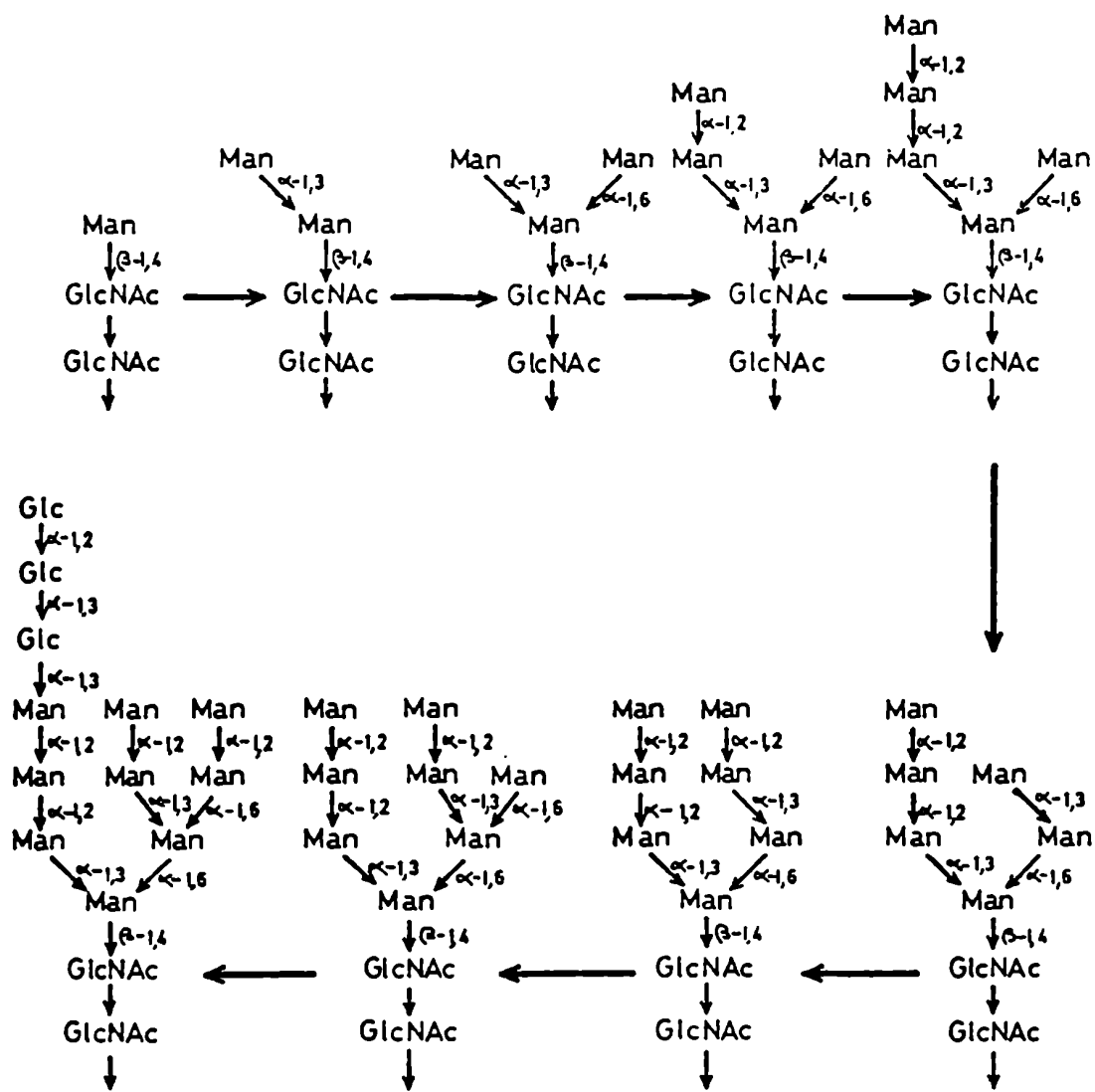


Fig. 1-4: Secuencia de ensamblado del oligosacárido unido a Dol-PP.

#### 1.2.2.2.2. Procesamiento de las N-glicoproteínas

Por procesamiento se entiende al conjunto de modificaciones que sufren los oligosacáridos inmediatamente después de ser transferidos a la proteína aceptora, para dar lugar a la gran diversidad estructural a nivel de azúcares unidos N-glicosídicamente a proteínas. La Fig. 1-5 esquematiza las etapas conocidas de dicho procesamiento.

El primer evento involucra la eliminación de los tres residuos de glucosa del oligosacárido recién transferido (48) (etapa 2), catalizada por la llamada glicosidasa I, que remueve el residuo de glucosa terminal, y por la glicosidasa II, que se encarga de eliminar los dos restantes (116). Ambas enzimas están localizadas en los RER y REL del lado luminal (41). La etapa siguiente consiste en la remoción de los residuos de manosa que se encuentran unidos por uniones  $\alpha 1 \rightarrow 2$  (etapa 3a), por parte de  $\alpha$ -manosidasas que se encuentran en el RER y en el aparato de Golgi (75,105). El número de residuos de manosa removidos puede variar entre 0 y 4, para dar lugar a oligosacáridos de "alta manosa" conteniendo entre 9 y 5 unidades de manosa, respectivamente, dependiendo de la naturaleza de la glicoproteína (48).

A diferencia de lo que ocurre durante la síntesis del oligosacárido unido a Dol-PP, el orden de remoción de los residuos de manosa no es universal, sino que distintas proteínas pueden contener oligosacáridos de "alta manosa" con el mismo número de restos de manosa pero con distinta estructura, es decir, ser isómeros entre sí.

El procesamiento puede continuar con la adición de un residuo de N-acetilglucosamina al residuo de manosa más expuesto del "core" (etapa 4a,

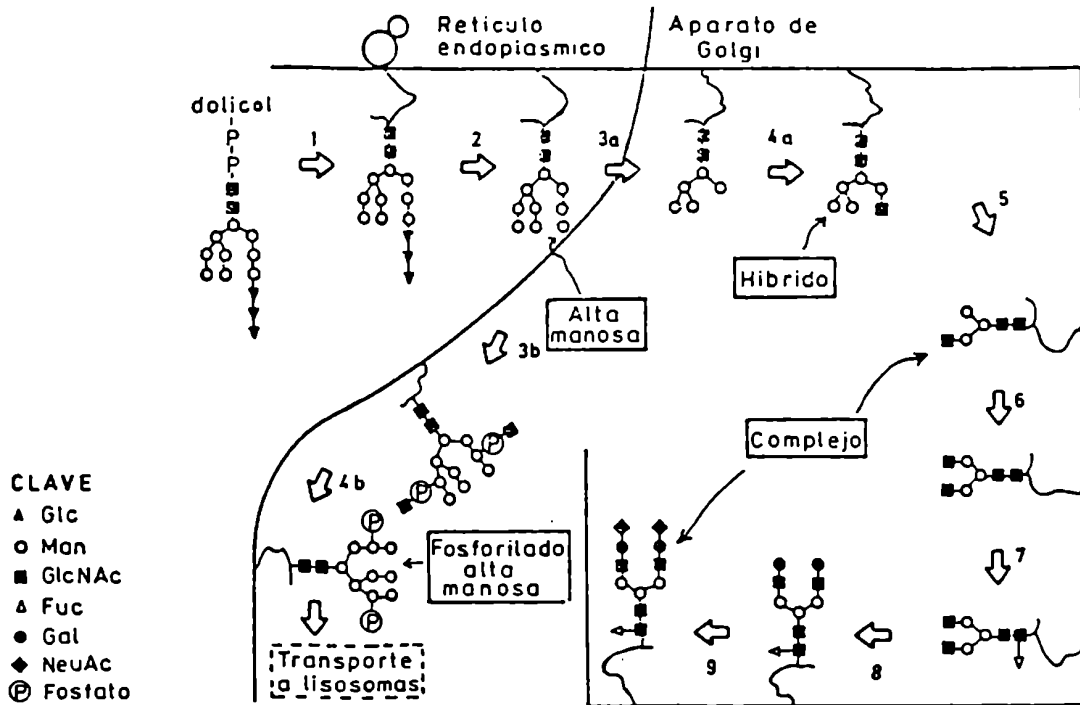


Fig. 1-5: Procesamiento de N-glicoproteínas.

Adaptado de la Referencia 10.

Fig. 1-5) (10,48), y luego la llamada manosidasa II hidroliza los dos residuos de manosa que no pertenecen al "core" (etapa 5) (104,44). La seguida incorporación de N-acetilglucosamina, galactosa, siálico y fucosa origina los oligosacáridos "complejos" (etapas 6-9) (10). En el caso de no ser retirados los dos últimos residuos de manosa, los oligosacáridos resultantes son del tipo "híbrido", pudiendo estabilizarse estas estructuras por la adición de N-acetilglucosamina al residuo de manosa más interno (ver Fig. 1-1) (44). La manosidasa II y la N-acetilglucosaminil transferasa están localizadas en la parte "cis" del aparato de Golgi (la más cercana al núcleo celular), mientras que las galactosil y sialil transferasas se encuentran en la parte "trans" (la más cercana a la membrana plasmática).

En la Fig. 1-5 se muestra un caso especial de ramificación del camino principal de procesamiento, por el cual se forman oligosacáridos de "alta manosa" fosforilados en la posición 6 de unidades de manosa (etapas 3b y 4b). Los grupos P-6-Man resultantes son marcadores específicos que intervienen en el proceso de transporte de enzimas degradantes lisosomales (como la  $\beta$ -glucuronidasa) desde el aparato de Golgi hasta los lisosomas (106,71).

¿Qué es lo que determina que un oligosacárido sea finalmente de "alta manosa" o "complejo"? Se acepta actualmente que una u otra alternativa estaría determinada por la accesibilidad de los oligosacáridos a las enzimas procesadoras. Aquellos oligosacáridos sobre los cuales la acción de dichas enzimas está impedida por la estructura terciaria de la proteína quedarían definitivamente como de "alta manosa", mientras que si la conformación proteica permite tal acción enzimática, los oligosacáridos resultarían "complejos" (120).

### 1.2.3. Funciones de la porción sacarídica de las glicoproteínas

Si bien las glicoproteínas están ampliamente distribuidas en la naturaleza como productos intra y extracelulares, ejerciendo numerosas funciones bien definidas, el rol de los azúcares componentes en muchos casos es desconocido. Las estrategias utilizadas para investigar el papel biológico de oligosacáridos de las glicoproteínas son las siguientes (73):

- a) Inhibición de la N-glicosilación mediante inhibidores del ciclo del dolicol, p. ej., tunicamicina, que ha producido una verdadera explosión de información acerca del rol de los azúcares en un gran número de glicoproteínas.
- b) Modificación química de la porción sacarídica.
- c) Inhibición del procesamiento de las N-glicoproteínas.
- d) Aislamiento de mutantes celulares con alteraciones en el mecanismo de glicosilación o procesamiento.

Los resultados obtenidos a partir de los enfoques enunciados precedentemente permitieron asignar a los oligosacáridos de las glicoproteínas las siguientes funciones:

- a) Proveer señales de reconocimiento. Una de las primeras indicaciones concernientes a este papel de los oligosacáridos fueron las observaciones de Ashwell de que la remoción artificial de residuos de ácido siálico de glicoproteínas plasmáticas reducía la vida media de ellas en el torrente circulatorio de varias especies animales (69). Se encontró que las proteínas sin ácido siálico eran captadas y catabolizadas por los hepatocitos, que contienen una proteína receptora que reconoce residuos terminales de

galactosa. Otro caso interesante de reconocimiento es el que determina el destino subcelular de ciertas glicoproteínas, en cuyo contexto, los marcadores Man-6-P en enzimas que luego de sintetizadas deben dirigirse a los lisosomas (ver Sección 1.2.2.2.2.) configuran el único ejemplo bien documentado de la influencia de la estructura sacarídica en el transporte intracelular de glicoproteínas y por ende en su localización final. Otras formas de reconocimiento involucrando azúcares son las del tipo célula-virus y célula-célula; como ejemplo del primer caso está el del virus influenza que se une a siálico presente en la superficie de los glóbulos rojos (38); mientras que un ejemplo del segundo caso lo dan las bacterias *E. Coli* y *S. Tiphy* que se unen a células epiteliales y macrófagos sanguíneos mediante una lectina bacteriana que reconoce restos de manosa en la superficie de dichas células animales (5).

- b) Estabilizar conformaciones. Esta función es invocada por numerosas evidencias. Por ejemplo, se han encontrado casos en los que la ausencia del oligosacárido provoca la insolubilidad de la proteína, tal como ocurre con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, que en esas condiciones no puede llegar a la membrana plásmatica de la célula infectada (35). Además, anticuerpos dirigidos contra proteínas no glicosiladas, como las de la envoltura del virus Semliki Forest, no se unieron a las mismas proteínas glicosiladas (73).
- c) Proporcionar resistencia a proteólisis. La eliminación "in vitro" de los oligosacáridos aumenta (por un mecanismo no aclarado hasta el momento) la sensibilidad de las glicoproteínas -p. ej., fibronectina (74)- a la acción de proteasas. Este efecto podría deberse a exposición de nuevos sitios



sensibles a proteasas, por lo que se podría incluir esta función dentro de la anterior clasificada como b), pero como los perfiles proteolíticos resultaron cualitativamente independientes de la presencia o ausencia de azúcares, la mayor susceptibilidad proteolítica quizá se deba simplemente a una más rápida accesibilidad del oligosacárido a las enzimas.

- d) Favorecer un correcto procesamiento proteolítico "in vivo". En el caso de las glicoproteínas del virus influenza, la inhibición de la glicosilación altera el normal procesamiento a partir de un precursor de mayor peso molecular (74).
- e) Influir en el proceso de secreción. Los dispares resultados obtenidos no permitieron proponer una hipótesis unificadora al respecto. En numerosas instancias, la inhibición de la glicosilación no tiene efecto alguno sobre la secreción de la porción proteica de muchas glicoproteínas (74). En cambio, en otros casos como los de IgA e IgE de ratón, la ausencia del carbohidrato altera o impide el proceso de secreción (46).

Intuitivamente, se esperaría que la ausencia de glicosilación alterara sustancialmente la función inherente a una glicoproteína, dada la discutida influencia de los azúcares en la conformación proteica, suponiendo ésta crucial para la acción biológica. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos en muchos laboratorios hasta el momento tienden a generalizar la irrelevancia del oligosacárido en la específica función biológica de una glicoproteína (74). Parecería que la porción sacarídica influye "in vivo" en el aseguramiento de una correcta síntesis, de un apropiado tiempo de vida y en la localización final de una glicoproteína, pero no en la naturaleza de su función específica propiamente dicha, una vez sintetizada y localizada en el

sitio definitivo. Tal es así que muchas glicoproteínas ahora son obtenidas en gran escala por técnicas de ingeniería genética empleando bacterias, las cuales no poseen la maquinaria glicosilante, a las que se les introduce el gen que codifica a la cadena polipeptídica. Por ejemplo, la interleukina-2 humana obtenida de esa manera y por lo tanto no glicosilada (89) tiene la misma función mitogénica sobre linfocitos T (60) que la proteína normalmente glicosilada (67).

Debe tenerse en cuenta que salvo algunas arqueobacterias, los procariones no poseen glicoproteínas. Esto indica que éstas no son imprescindibles para los procesos biológicos básicos. El hecho de que existan en eucariotes permite la especulación acerca de su aparición como una necesidad evolutiva cuando los diferentes componentes presentes en organismos más complejos necesitaron relacionarse de alguna manera entre sí.

La glicosilación de proteínas es un proceso caro que requiere amplia información genética para la producción de muchas enzimas y sustratos. Esto sugiere que los azúcares les confieren a las glicoproteínas importantes propiedades; de otro modo, no hubieran persistido a través de la evolución.

Las glicoproteínas "alta manosa" pueden constituir una forma primitiva de oligosacáridos jugando un papel en el plegamiento de proteínas para estabilizar su conformación definitiva. La evolución de un camino metabólico de procesamiento puede ser considerado como un medio de expandir el repertorio de estructuras sacarídicas y por ende de proporcionar diversidad glicoproteica.

#### 1.2.4. Regulación de la biosíntesis de N-glicoproteínas

En dos sistemas biológicos se ha estudiado con cierto detalle el rol del ciclo del dolicol en la regulación de la síntesis de glicoproteínas. Uno de ellos es el de membranas de oviducto de gallina, las cuales, bajo previo tratamiento del órgano con estrógenos, contienen incrementados niveles de dolicol fosfato (Dol-P), concomitantemente con una aumentada transferencia de azúcares a proteína (21). Otro sistema es el de los embriones en desarrollo de erizo de mar. En este caso se demostró que para el correcto desarrollo se requiere la biosíntesis de N-glicoproteínas y una previa formación "de novo" de dolicol, como así también de su fosforilación (90). Membranas aisladas de embriones en pleno desarrollo contenían altos niveles de dolicol fosfoquinasa (90), la enzima que fosforila dolicol en reserva a partir de CTP.

También se ha postulado que las enzimas Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa modulan la concentración de dolicol, y por lo tanto la velocidad de síntesis de glicoproteínas (12).

Sin embargo, es opinión del autor de esta tesis que, a juzgar por la literatura referente a este tema, es difícil sacar conclusiones acerca de la regulación del ciclo del dolicol "per se" en el proceso de glicosilación, ya que ésta involucra también como sustratos a las proteínas aceptoras del oligosacárido. Si se acepta que la presencia del oligosacárido es una característica inseparable de una glicoproteína, siendo importante en muchas de sus propiedades (ver Sección 1.2.3.), el número de moléculas susceptibles de ser glicosiladas debe aumentar si se ve aumentada la velocidad de transferencia de azúcares; de lo contrario, se producirían glicoproteínas aberran-

temente glicosiladas, con propiedades anómalas. En otras palabras, si por una necesidad fisiológica (diferenciación, p. ej.) debe aumentar el número de moléculas glicoproteicas en una célula, tienen que verse incrementados no sólo los niveles de las enzimas claves en la síntesis y/o transferencia del oligosacárido sino también los de todas las proteínas aceptoras, tratándose de un proceso mucho más generalizado. En resumen, si el Dol-P regula la velocidad de síntesis de glicoproteínas, probablemente no sea el único factor involucrado en dicha regulación.

Además, aun cuando los niveles de Dol-P endógeno efectivamente aumenten en ciertas circunstancias fisiológicas que requieren alta actividad biosintética de glicoproteínas, el Dol-P no sería estrictamente el regulador, sino que tal aumento probablemente reflejaría elevados niveles de actividad de alguna(s) de las enzimas biosintetizadoras de Dol-P, que sería(n) el/los verdadero(s) regulador(es) primario(s).

### 1.3. Aspectos biológicos del epidídimo

#### 1.3.1. Anatomía

En los mamíferos, los espermatozoides formados en los tubos seminíferos del testículo son transportados desde este órgano a través de un sistema tubular. Este sistema se compone de varios conductos cuyo origen es el rete testis, el cual está conectado a los conductillos eferentes, que finalmente desembocan en un único conducto altamente enrollado sobre sí mismo, llamado epidídimo. Este, a su vez, se continúa en el conducto eferente.

El epidídimo está yuxtapuesto al correspondiente testículo, y es posible definir segmentos anatómicamente bien diferenciados (42): el pequeño segmento inicial y tres porciones principales que son la cabeza -o caput-, el cuerpo -o corpus- y la cola -o cauda- (Fig. 1-6 y 1-7).

### 1.3.2. Histología

Histológicamente, el conducto está formado por células epiteliales de tres tipos (42):

- a) Células principales. Estas células son las más abundantes y se caracterizan por ser alargadas y tener un desarrollado aparato de Golgi rodeado de cuerpos densos bien visibles al microscopio electrónico. Su núcleo es grande y está desplazado hacia el lado basal (el opuesto a la luz o lumen del túbulo). La especialización de la membrana plasmática del lado luminal está claramente expresada por el buen número de microvellosidades que la forman.
- b) Células basales, que se encuentran esporádicamente a lo largo del epitelio (aunque más abundantes en la cola) y adyacentes a las células principales en el lado basal.
- c) Células "halo", llamadas así porque el núcleo está rodeado de un citoplasma claro con pocas organelas. También estas células aparecen esporádicamente y al igual que las basales no limitan con el lumen.
- d) Células claras. Estas células sólo aparecen en la cola del conducto y se caracterizan por una densa acumulación en su base de gránulos lipídicos.

En las Figs. 1-8 y 1-9 se muestran imágenes del epitelio epididimario obtenidas por microscopía óptica.

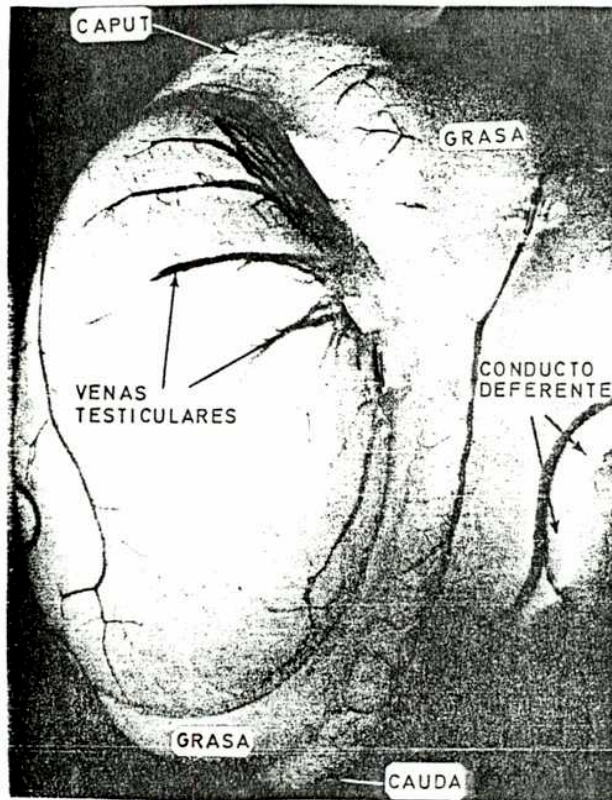


Fig. 1-6: Relaciones anatómicas del epidídimo con el testículo en la rata.

Amplificación fotográfica: X 3.

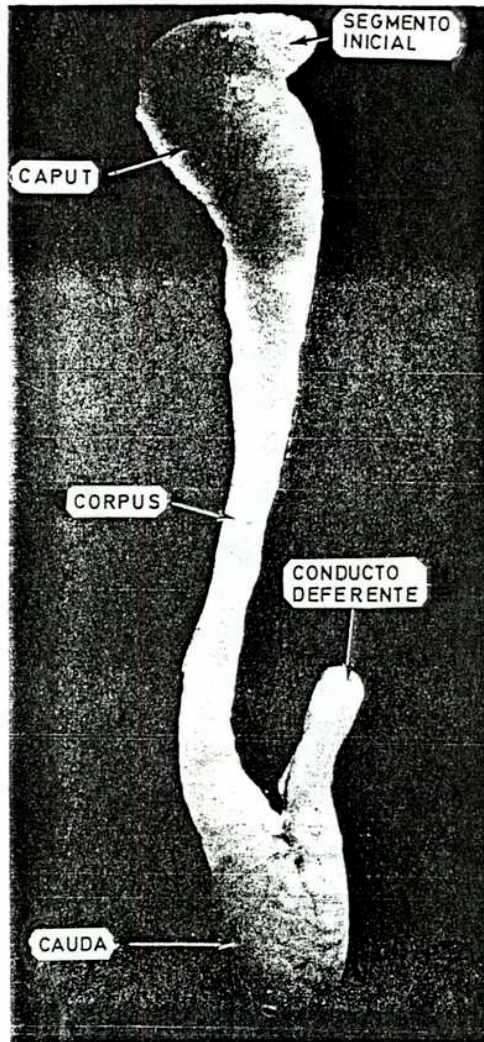


Fig. 1-7: Epidídimo de rata aislado totalmente extendido.

Amplificación fotográfica: X 3,5.



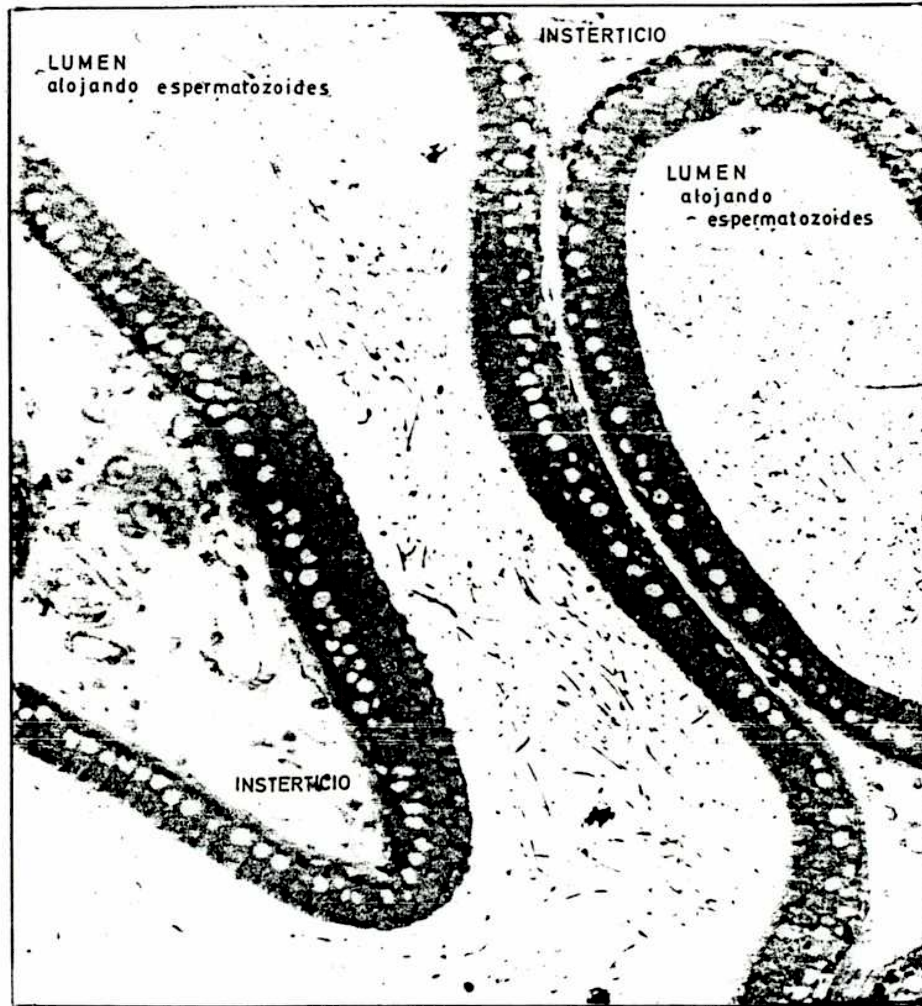


Fig. 1-8: Estructura de los túbulos epididimarios.

La imagen fue obtenida por microscopía óptica (amplificación: X 450) a partir de un corte transversal de cabeza de epidídimo de rata.



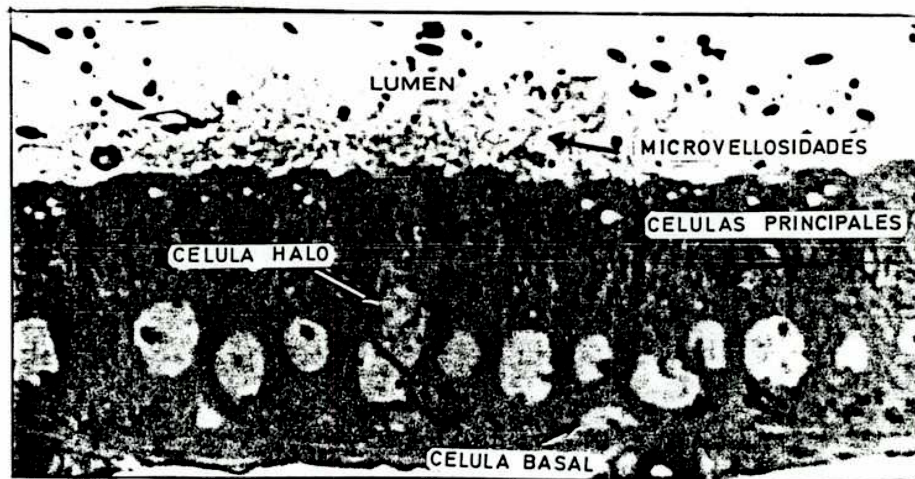


Fig. 1-9: Disposición de las células epiteliales en el epidídimo.

La imagen fue obtenida por microscopía óptica (amplificación: X 1.860) a partir de un corte transversal de cabeza de epidídimo de rata.

En ciertos trayectos del conducto, cuando no hay intercaladas células basales, "halo" y claras, el epitelio consta sólo de células principales en monocapa.

No hay grandes diferencias histológicas entre cuerpo, cabeza y cola, a excepción de variaciones en la altura celular (que determina el diámetro del lumen) que pueden ser consecuencia de diferencias en la actividad metabólica.

Además, entre las superficies basales de las células epiteliales de los túbulos contiguos debido al enrollamiento, hay células de músculo liso, entre las que se interponen fibroblastos, capilares y células nerviosas formando lo que se llama el insterticio.

### 1.3.3. Fisiología

Los espermatozoides transitan a lo largo del epidídimo y luego permanecen en su porción distal—cola— durante variables períodos antes de ser eyaculados. Durante todo ese tiempo adquieren potencial capacidad fertilizante, sufriendo concomitantemente ciertos cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que se engloban bajo la denominación de "maduración" (118,7). Ya a principios de siglo se habían encontrado diferencias en ciertas propiedades -p. ej., motilidad- de los espermatozoides obtenidos de distintas regiones del epidídimo. La cuestión de si los cambios antedichos son originados por propiedades intrínsecas del espermatozoide, o si por el contrario son influidos por su hábitat -el epidídimo-, ha sido debatida durante años. Actualmente se cree que el epidídimo no es un canal meramente pasivo, sino que su rol excede el de alojar espermatozoides, participando activamente en la referida maduración. Cabe aclarar que los cambios

que ocurren en la célula germinal masculina no se agotan en el epidídimo, sino que prosiguen cuando dicha célula abandona el tracto genital masculino y penetra en el femenino, dando lugar a lo que se llama "capacitación" del espermatozoide.

Es importante destacar que las conclusiones de los estudios sobre cambios inherentes a la maduración se ven dificultados por las diferencias existentes entre especies de mamíferos, de las cuales sólo un modesto número se ha analizado.

Dentro de los cambios morfológicos se han descrito modificaciones estructurales del acrosoma espermático, que es un gránulo de secreción derivado del Golgi, y que envuelve al núcleo. El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas involucradas en la penetración del espermatozoide a la "zona pellucida" del ovocito fecundado.

Con respecto a los cambios fisiológicos mencionados, se pueden citar modificaciones de ciertas propiedades de superficie, tales como autoaglutinación, sin olvidar que la alteración fisiológica obviamente más importante es -por definición de maduración- la adquisición de capacidad fertilizante. Así, los espermatozoides obtenidos de la cabeza son infértiles y los aislados de cola son potencialmente fértiles.

Con relación a los cambios bioquímicos hay una inmensa masa de información citada en la Referencia 118. Como ejemplo, se puede mencionar la demostración de que espermatozoides testiculares dependen más de un metabolismo oxidativo que los eyaculados, los cuales viven de un metabolismo puramente glicolítico. Pero quizá los cambios más significativos son los que ocurren a nivel de la membrana plasmática espermática. A este respecto, hay

parámetros tales como la capacidad de espermatozoides de unirse a lectinas (72,4) y la distribución de cargas eléctricas en su superficie (27), que indican que la membrana de los espermatozoides se va alterando durante el tránsito de éstos por el epidídimo. En los cambios bioquímicos seguramente están las causas de muchos de las modificaciones morfológicas y fisiológicas que acompañan a la maduración.

Como los espermatozoides son inmóviles dentro del epidídimo, su transporte depende de elementos contráctiles autónomos de la pared del conducto, que están inervados por el sistema nervioso simpático. Tal actividad contráctil es mínima en la cola y por lo tanto en esta región los espermatozoides maduros son almacenados. Durante la eyaculación, ocurre una vigorosa contracción tubular que hace expulsarlos.

La actividad del epidídimo de inducir la maduración, como así también la de constituir un lugar de almacenamiento son fuertemente dependientes del suministro de andrógenos al órgano (7). Los detalles de este control hormonal se presentan en la siguiente sección.

#### 1.3.3.1. El epidídimo como órgano efector de andrógenos

El mecanismo de acción de los andrógenos comenzó a ser estudiado a fines de los años '60 utilizando próstata de rata como modelo biológico. Hoy se sabe que los resultados obtenidos entonces son básicamente extrapolables a todos los órganos blanco de andrógenos (115), incluyendo el epidídimo (110). Los conocimientos actuales permiten resumir el mecanismo de acción androgénica en la siguiente secuencia de eventos esquematizados en la Fig. 1-10:

- 1) La testosterona llega a la célula transportada por proteínas en el plasma sanguíneo, y en el caso del epidídimo, también a través de la luz tubular directamente a partir de los túbulos seminíferos testiculares, unida a una proteína llamada ABP (proteína ligadora de andrógenos). Se cree que la testosterona libre atraviesa la membrana plasmática, ya sea del lado basal (a partir de capilares sanguíneos) o apical (desde el fluido luminal) a favor de un gradiente de concentración.
- 2) La testosterona es metabolizada a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) por la enzima  $\Delta^4$ -3-cetoesteroide- $5\alpha$ -reductasa, localizada en el retículo endoplásmico y en la superficie externa de la membrana nuclear.
- 3) La DHT se une no covalentemente y con alta afinidad a una proteína citoplasmática llamada receptor.
- 4) La unión antedicha resulta en variaciones conformacionales del receptor originando una activación del complejo Receptor-Hormona.
- 5) Este complejo es traslocado al núcleo por mecanismos poco esclarecidos y se une específicamente a sitios en la cromatina.
- 6) El complejo ternario Hormona-Receptor-aceptores cromatínicos desencadena una activación de la transcripción de ciertas secuencias del DNA, al parecer por aumentar la capacidad de templado en dichas regiones. Esto conduce a la síntesis "de novo" de proteínas específicas que llevan el mensaje hormonal.
- 7) El complejo, luego de un tiempo variable, se disocia y el receptor regresa al citoplasma siendo reciclado.

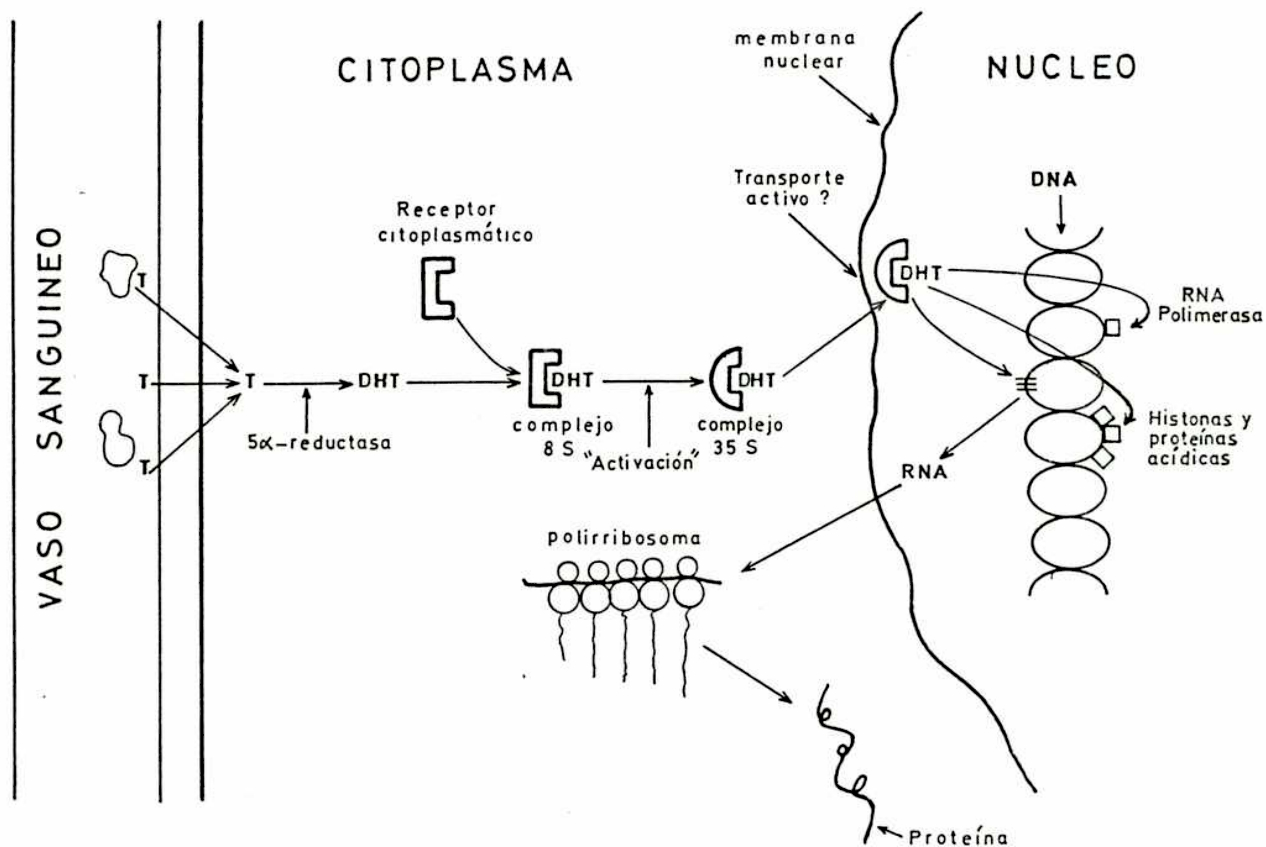


Fig. 1-10: Esquema del mecanismo de acción de los andrógenos en una célula efectora.

En el caso del epidídimo, la célula efectora es la célula epitelial principal, la cual recibe un aporte adicional de testosterona desde el lumen. T, testosterona; DHT, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona.

#### 1.4. Antecedentes inmediatos y objetivos de la investigación

##### 1.4.1. Concentración de dolicol en epidídimo

Uno de los móviles que llevó a investigar en el presente trabajo el papel de las N-glicoproteínas en epidídimo fue la aparición en la literatura de datos referentes a la concentración de dolicol en este órgano. En tal contexto, Wenstrom y Hamilton (119) informaron que, en el caso de la rata, el dolicol libre no esterificado se encuentra en una concentración de alrededor de 70 ug/g de epidídimo húmedo en sus porciones más proximales, valor éste superior al encontrado en testículo, órgano que -entre los que habían sido analizados hasta ese momento- era el que poseía más cantidad de dicho lípido (93).

##### 1.4.2. Evidencias de unión de proteínas de origen epididimario a espermatozoides

Trabajos en varios laboratorios han aportado evidencias referentes a la existencia de proteínas epididimarias presentes en la membrana de los espermatozoides. Estas proteínas se han identificado en rata (54), conejo y hamster (68). Blaquier y col. aislaron y caracterizaron parcialmente un grupo de proteínas epididimarias específicas, a las que llamaron SEP (34) y en particular la glicoproteína DE, un componente mayoritario de las SEP que contiene un 10% de carbohidrato (33) aparentemente unido O-glicosídicamente a juzgar por su contenido de glucosa, y que se asocia a espermatozoides en vías

de maduración (55).

Los estudios mencionados precedentemente indican en forma indirecta una unión entre proteínas epididimarias y células germinales, ya que se basan en la detección en la superficie del espermatozoide de componentes que reaccionan con anticuerpos dirigidos contra las proteínas aisladas de epidídimo, existiendo la posibilidad de reacción cruzada. Experimentos realizados adoptando un enfoque más directo son los de Brooks (17), quien analizó proteínas secretadas por epidídimo incubado "in vitro". Según este autor, dichas proteínas tienen la capacidad de unirse a espermatozoides, pero también lo hacen inespecíficamente a células irrelevantes como glóbulos rojos.

Los únicos resultados de unión específica fueron los obtenidos por Wong (122), quien demostró interacción entre una proteína de 32 KDa, obtenida a partir de fluido de cauda epididimaria de rata, y espermatozoides extraídos de la misma región.

Algunos investigadores fueron más allá de demostrar la interacción proteína-espermatozoide e intentaron visualizar el efecto de proteínas y glicoproteínas epididimarias en la interacción espermatozoide-ovocito, para la cual debería existir previa maduración espermiática. Los resultados fueron positivos, por cuanto extractos conteniendo dichas (glico)proteínas -aunque no bien caracterizadas bioquímicamente- obtenidos de epidídimo de hamster (37) y de rata (77) indujeron una maduración "in vitro" de espermatozoides funcionalmente inmaduros homólogos, empleando el criterio de cuantificación de gametas masculinas capaces de adherirse a la zona pellucida de ovocitos homólogos. En este contexto, son sugestivos los informes de altas concentraciones de proteínas con actividad enzimática bien definida como la



UDP-galactosa:N-acetilglucosamina galactosil transferasa, tanto en fluido epididimario de rata (43) como en la superficie del espermatozoide de ratón (100), ya que la enzima podría ser adquirida por la célula germinal durante su tránsito por el epidídimo. La actividad de esta enzima en el espermatozoide parece ser requisito para la unión de éste a la zona pellucida (100).

#### 1.4.3. Objetivos del presente trabajo

Los antecedentes mencionados sugieren que las glicoproteínas epididimarias -entre las que seguramente hay muchas del grupo asparagina- participan en el proceso de maduración de los espermatozoides. Con el objeto de aportar evidencias que convaliden dicha hipótesis, se decidió realizar una serie de experimentos tendientes a comprender mejor algunos aspectos del proceso de maduración espermática a nivel molecular.

En primer término, con el propósito de incorporar conocimientos sobre la N-glicosilación proteica en epidídimo a nivel de azúcares precursores, y a la vez confirmar la universalidad del ciclo del dolicol en células eucarióticas, se investigó la presencia de dicho ciclo adoptando dos enfoques: 1) la medición de algunas enzimas involucradas y 2) el aislamiento y caracterización estructural y cuantitativa de los componentes sacarídicos intermediarios y finales producidos a través del ciclo. Además, con el fin de generalizar observaciones previas en cuanto a que la mayoría de las funciones epididimarias están reguladas por andrógenos, se estudió la existencia de control hormonal de la N-glicosilación en epidídimo.

En segundo lugar, habiendo cumplido el objetivo preliminar anterior,

se encaró el estudio de las N-glicoproteínas secretadas por el órgano, lo cual no había sido objeto de ningún trabajo previo. Desde el punto de vista estructural, se propuso la caracterización bioquímica de las N-glicoproteínas secretadas más abundantemente, especialmente de su porción sacarídica. Desde un ángulo funcional, pareció interesante investigar la interacción "glicoproteína secretada-espermatozoide", evento probablemente requerido para que el proceso global de maduración tenga lugar.

Todos los experimentos presentados a continuación se realizaron empleando cabezas de epidídimo de rata, por cuanto representa la región anatómica donde, a la luz de las ideas vigentes hasta el momento, comienza la maduración espermática.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1. Materiales químicos

#### 2.1.1. Radioactivos

UDP-(U-<sup>14</sup>C)glucosa (260  $\mu$ Ci/mol) y GDP-(U-<sup>14</sup>C)manosa (216  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) fueron preparados por Susana Raffo y Marta Eirin (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar") según la técnica de Thomas y col. (111). (<sup>3</sup>H)DoI y (<sup>3</sup>H)DoI-P (3,8 Ci/mmol) se prepararon como está indicado por Belocopitow y col. (9). (2-<sup>3</sup>H)manosa (10-20 Ci/mmol), (U-<sup>14</sup>C)glucosa (250  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) y <sup>14</sup>C-aminoácidos de hidrolizado de alga fueron comprados a New England Nuclear (Boston, MA). <sup>32</sup>Pi y Na<sup>125</sup>I se obtuvieron de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Argentina).

#### 2.1.2. Enzimas

Proteasa de *S. griseus* tipo XIV y fosfatasa alcalina de *E. coli* se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Endo- $\beta$ -N-acetil-glucosaminidasa H (Endo-H) fue suministrada por Miles Labs. (Elkhart, IN).

#### 2.1.3. Materiales para cromatografía en columna

Bio-Gel P-6, Bio-Gel P-60 y Bio-Gel A 1.5 m fueron comprados a Bio-Rad (Richmond, CA). Concanavalina A-agarosa fue de Sigma.

#### 2.1.4. Otros

Propionato de testosterona (TP) y acetato de ciproterona (CA) fueron gentilmente cedidos por Laboratorios Gador (Buenos Aires, Argentina) y Schering A.G. (Berlín, Alemania Occidental), respectivamente. Tunicamicina fue gentilmente provista por Robert L. Hamill de Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). El Medio Mínimo Esencial (MEM) fue adquirido a Gibco (Grand Island, NY). Coomassie Brilliant Blue fue marca Sigma y Blue Dextran fue de Pharmacia (Uppsala, Suecia). Todos los solventes y demás reactivos usados fueron de grado analítico.

#### 2.2. Animales

En todos los casos se utilizaron ratas macho adultas Wistar de 90 días de edad que pesaban alrededor de 300 g.

##### 2.2.1. Condiciones de castración y terapia hormonal

En los casos en que se requirió castración, ésta se realizó por vía abdominal bajo anestesia producida por éter etílico. Con el objeto de eliminar interferencias debidas a la presencia de espermatozoides, a todos los animales se les ligaron los conductos eferentes por lo menos 7 días antes de la extracción de los epidídimos. El tiempo de ligado fue coincidente con el tiempo total de castración y terapia con TP en el caso en que éste fue administrado. TP se inyectó por vía subcutánea dos veces diarias en 0,1 ml de aceite vegetal estéril y CA se inyectó de la misma manera. Los animales

fueron sacrificados por dislocamiento cervical usando guillotina entre 12 y 16 hs después de la última inyección.

### 2.2.2. Tratamiento previo de los animales para obtención de espermatozoides testiculares

Con el objeto de promover la acumulación de espermatozoides en rete testis y evitar el pasaje natural de aquéllos hacia el epidídimo, los conductos eferentes de las ratas fueron ligados con hilo quirúrgico 48 hs antes de la extracción de espermatozoides de rete testis, la cual se realizó por punción.

### 2.3. Obtención de microsomas

#### 2.3.1. Microsomas de epidídimo

Se realizó una disección del órgano, a partir de tres a cinco animales, tomándose las porciones correspondientes a las cabezas, las cuales se reunieron, pesaron y cortaron en trozos finos utilizando tijeras. El tejido fue homogeneizado en 4 volúmenes (ml por g de tejido húmedo) de buffer Tris 20 mM pH 7,4 conteniendo EDTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM y sacarosa 0,25 M usando un homogeneizador Polytron (4 pulsos de 15 segundos en la velocidad "4"). Después de filtrar a través de una trama de nylon, se tomaron alícuotas de 0,2 ml para determinación de contenido de DNA y los homogenatos se centrifugaron a 12.000 x g en centrífuga refrigerada marca Sorvall durante 10 min. Los sobrenadantes resultantes fueron sometidos a una ultracentrifugación a

105.000 x g durante 1 h en centrífuga marca Spinco. Los sobrenadantes fueron cuidadosamente decantados y los precipitados se resuspendieron en 200  $\mu$ l de una solución de pH 7 con la siguiente composición: sacarosa 0,25 M, 2-mercaptoetanol 25 mM y EDTA 0,5 mM. Los microsomas resuspendidos se usaron inmediatamente en los ensayos enzimáticos. Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0 y 4°C.

### 2.3.2. Microsomas de hígado

Las fracciones microsomales de hígado de rata se obtuvieron de la manera descrita por Parodi y col. (82).

## 2.4. Ensayos enzimáticos sobre microsomas epididimarios

### 2.4.1. Medición de la actividad de manosil transferasa

GDP-manosa:Dol-P manosil transferasa (EC 2.4.1.83) se midió bajo las condiciones de Hemming (109). 100  $\mu$ g de proteína microsomal se agregaron a la mezcla de incubación que contenía sacarosa 0,15 M, buffer Tris-maleato 77 mM pH 7,7, 2-mercaptoetanol 92 mM, EDTA 3 mM,  $MnCl_2$  9 mM, Triton X-100 0,5%, Dol-P en concentraciones variables y GDP-( $^{14}C$ )manosa 2,8  $\mu$ M (70.000 cpm) en un volumen total de 65  $\mu$ l. Se dejó transcurrir la reacción durante 5 min a 30°C, tiempo éste en el que aún se mantiene la linealidad. La reacción se detuvo por agregado de 2 ml de  $Cl_3CH:CH_3OH$  (3:2 v/v). Después de centrifugar a 1.000 x g 5 min, se descartaron los precipitados microsomales y los sobrenadantes se transfirieron a otros tubos a los cuales se les agregó 0,33 ml de

MgCl<sub>2</sub> 4 mM resultando en la aparición de dos fases. Luego se realizó una extracción de Folch (31) que consistió en lo siguiente: se agregó a las fases inferiores 0,8 ml de Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (1:16:16 v/v/v). Luego de centrifugar a 1.000 x g 5 min, se eliminó la fase superior y a la fase inferior se le volvió a agregar Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (1:16:16) y se repitió la operación dos veces más. Esta serie de extracciones tiene por objeto eliminar metanol y sustancias acuosolubles (entre ellas el nucleótido azúcar remanente) que luego de la extracción quedan en las fases superiores, con el consiguiente enriquecimiento de las fases inferiores en cloroformo donde permanece el producto de la reacción, Dol-P-Man. Las fases inferiores se llevaron a sequedad bajo N<sub>2</sub> en viales de vidrio para contar radioactividad.

#### 2.4.2. Medición de la actividad de glucosil transferasa

Para la determinación de la actividad de UDP-glucosa:Dol-P glucosil transferasa (EC 2.4.1.78), se utilizó el mismo procedimiento que el descrito en el punto 2.4.1. excepto que el sustrato dador de azúcar fue UDP-(<sup>14</sup>C)glucosa 0,86 μM (100.000 cpm).

#### 2.4.3. Determinación de la incorporación de (<sup>14</sup>C)manosa a Dol-PP-oligosacáridos

Para medir esta incorporación, donde están involucradas varias enzimas (ver punto 1.2.2.2.1.) se usó la misma mezcla de incubación que se describió para manosil transferasa usando Dol-P 400 μM, pero la incubación fue de 30 min deteniéndola como en el punto 2.4.1. Los precipitados proteicos se

lavarón dos veces con  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:16:16) y luego se extrajeron dos veces con 0,5 ml de  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0.3). Por último se contó la radioactividad presente en estos últimos extractos reunidos y secos.

#### 2.4.4. Determinación de la incorporación de ( $^{14}\text{C}$ )manosa a proteína

Esta incorporación se midió sometiendo los precipitados lavados del ensayo descrito en 2.4.3. a un nuevo tratamiento de lavado con 0,5 ml de metanol dos veces. Luego los precipitados se solubilizaron con 0,4 ml de Protosol, añadiendo 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial para neutralizar la alcalinidad del Protosol antes de contar radioactividad en viales de vidrio.

#### 2.4.5. Determinación de Dol-P fosfatasa

La actividad de esta enzima se midió como indican Belocopitow y col. (9) utilizando 20  $\mu\text{g}$  de proteína microsomal epididimaria como fuente de enzima.

#### 2.4.6. Determinación de Dol fosfoquinasa

La medición de la actividad de esta enzima se realizó basándose en las condiciones de Rip y Carroll (88). La mezcla de incubación (100  $\mu\text{l}$ ) contenía ( $^3\text{H}$ )Dol 0,55  $\mu\text{M}$  (200.000 cpm) NaF 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, CTP 10 mM, Triton X-100 0,016%, buffer Tris-maleato 100 mM pH 7,3 y 20  $\mu\text{g}$  de proteína microsomal como fuente de enzima. La cuantificación del producto (Dol-P) y sustrato (Dol) remanente se realizó de acuerdo al método cromatográfico en capa delgada de Boscoboinik y col. (13).



## 2.5. Cuantificación de Dol-P en microsomas epididimarios

Microsomas epididimarios (entre 100 y 300  $\mu\text{g}$  de proteína) fueron extraídos con 2 ml de  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}$  (3:2). Luego de centrifugar a 1.000 x g durante 5 min, los sobrenadantes se saponificaron por tratamiento con NaOH 10 N a 37°C durante 15 min. Luego de realizar una extracción de Folch, las fases inferiores conteniendo lípidos no saponificables se secaron bajo  $\text{N}_2$  y en los mismos tubos se ensayó actividad de glucosil transferasa en ausencia de Dol-P exógeno de la manera indicada en 2.4.2. usando microsomas de hígado de rata (160  $\mu\text{g}$  de proteína) como fuente de enzima. ( $^3\text{H}$ )Dol-P fue utilizado como marcador de recuperación durante la saponificación y extracción de Folch. La recuperación global fue 78% y los datos se corrigieron teniendo en cuenta ese valor. Se realizó una curva de calibración en paralelo con cantidades conocidas de Dol-P (Fig. 2-1).

## 2.6. Condiciones de incubación de tejido

### 2.6.1. Extracción de epidídimos de los animales

Los animales correspondientes según el experimento fueron matados con éter, sus epidídimos fueron extraídos, luego de lo cual se cortaron con tijera, tomando las cabezas del órgano y descartando el resto (cuerpos y colas). Las cabezas de epidídimo mantenidas constantemente en medio de incubación a 0°C fueron cortadas con tijera en trozos con el fin de eliminar espermatozoides. Luego se continuó cortando el tejido hasta obtener partícu-

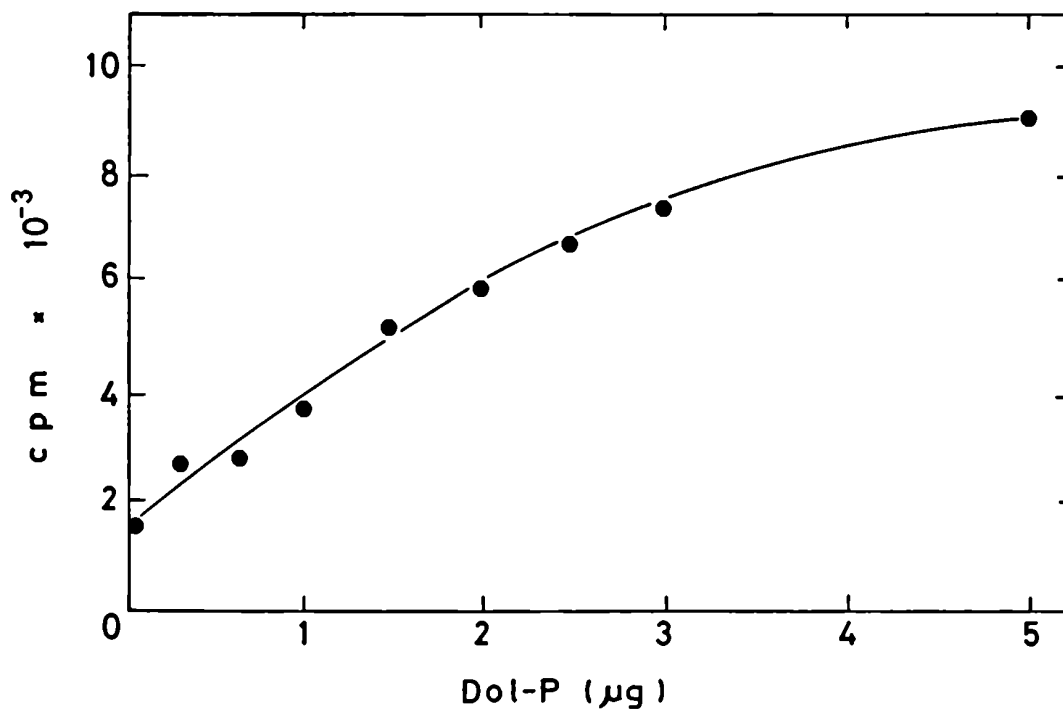


Fig. 2-1: Curva de calibración para la cuantificación de Dol-P de origen epididimario.

La actividad de glucosil transferasa en microsomas de hígado de rata (160 µg de proteína) fue determinada agregando diferentes concentraciones de Dol-P standard, tal como se indica en la Sección 2.5.

las de aproximadamente 1 mm de diámetro, las cuales se lavaron varias veces con medio de incubación frío con el objeto de eliminar espermatozoides, partículas de grasa y sustancias propias del lumen del órgano que pudieran haber quedado. El material metálico usado (pinzas y tijeras) fue embebido previamente en alcohol y el material de vidrio fue estéril para mantener condiciones de asepsia.

#### 2.6.2. Incubaciones con ( $^{14}\text{C}$ )glucosa

Las condiciones de incubación fueron similares a las adoptadas por Parodi y col. para otros sistemas biológicos (83). Cortes de cabeza de epidídimo (4 g) se incubaron en presencia de 250  $\mu\text{Ci}$  de ( $^{14}\text{C}$ )glucosa (125  $\mu\text{M}$ ) en MEM sin glucosa conteniendo piruvato de sodio 5 mM como fuente de energía durante 5 h a 37°C con agitación.

#### 2.6.3. Incubaciones con ( $2\text{-}^3\text{H}$ )manosa y otros precursores radioactivos

Las condiciones experimentales para las incubaciones de epidídimo con manosa radioactiva y otros precursores radioactivos están basadas en los trabajos de Alperin y col. (2) sobre corteza cerebral introduciendo ligeras modificaciones. Las partículas de tejido lavadas se incubaron inmediatamente en placas "multiwell" que contienen cavidades de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad en atmósfera húmeda de 5%  $\text{CO}_2$  en aire a 37°C. La cantidad de tejido en cada cavidad fue entre 4 y 10 mg de peso húmedo (40-100  $\mu\text{g}$  de proteína). MEM (que contiene aminoácidos, sales, vitaminas y glucosa 5 mM) sin agregado de suero (para facilitar análisis de proteínas secretadas al medio) se usó como medio

de incubación. Las alícuotas de las soluciones de los precursores radioactivos se secaron bajo N<sub>2</sub> en tubos estériles (para eliminar el solvente original), redisolviéron en 50  $\mu$ l de MEM y agregaron a las cavidades que contenían los trozos de tejido a las siguientes concentraciones: (2-<sup>3</sup>H)manosa, 100  $\mu$ Ci/cavidad en todos los experimentos excepto en las curvas de tiempo para poner a punto el sistema donde se usó 10  $\mu$ Ci/cavidad; <sup>14</sup>C-aminoácidos, 25  $\mu$ Ci/cavidad y <sup>32</sup>Pi, 25  $\mu$ Ci/cavidad en MEM libre de Pi. Cuando se requirió tunicamicina ésta se añadió a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml. Las incubaciones se interrumpieron transfiriendo el contenido de cada cavidad a tubos de vidrio junto con el líquido proveniente de los lavados de cada cavidad efectuados con PBS frío hasta completar 2 ml. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a 12.000 x g en centrífuga refrigerada durante 10 min, mediante lo cual se separaron tejido (en los precipitados) y medio (en los sobrenadantes).

## 2.7. Cuantificación de la incorporación de los precursores radioactivos a proteína

### 2.7.1. Proteína intracelular

Utilizando una metodología análoga a la desarrollada por Alperín y col. (2), los precipitados resultantes de la centrifugación indicada en 2.6.3. fueron tratados con 0,5 ml de TCA 10% y luego se sonicó a 50 W durante 30 seg. Se calentó a 90°C 10 min y luego de centrifugar a 1.000 x g 5 min se descartó el sobrenadante con pipeta Pasteur. Este último tratamiento tuvo por objeto eliminar oligosacáridos unidos a lípido. Después se agregó 0,5 ml de

H<sub>2</sub>O, sonicó y añadió 0,5 ml de TCA 20%; se volvió a sonicar (a esta altura el tejido estaba totalmente disgregado) y centrifugar en las mismas condiciones, descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó entonces con 1 ml de etanol:éter etílico (2:1 v/v) y luego con 1 ml de metanol. Se agregó 0,5 ml de metanol, se sonicó para homogeneizar y se tomaron 100 µl para determinación cuantitativa de proteínas. Luego se centrifugó y descartó el sobrenadante. El precipitado se secó al vacío y se trató con 0,2 ml de solubilizador de tejidos NCS y 10 µl de ácido acético glacial para neutralizar durante 30 min a 80°C. Finalmente, se contó radioactividad en viales de vidrio.

#### 2.7.2. Proteína liberada al medio

Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación indicada en 2.6.3. se trataron con TCA a una concentración final de 10%. Luego de calentar a 90°C durante 10 min, se filtró a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C (capaces de retener macromoléculas) en sistema de vacío. Los filtros se lavaron secuencialmente con 100 ml de TCA 5%, 100 ml de etanol y 100 ml de metanol, se secaron bajo lámpara infrarroja e introdujeron en viales de vidrio conteniendo solución centelleadora para contar radioactividad.

#### 2.8. Técnicas analíticas generales

### 2.8.1. Cromatografía en papel

Cromatografía descendente sobre papel SS 2043a (Schleicher & Schuell) se llevó a cabo utilizando los siguientes sistemas de solventes:

A, 1-propanol:nitrometano:agua (5:2:4)

B, 1-butanol:piridina:agua (4:3:4)

C, 1-butanol:piridina:agua (6:4:3)

Después de desarrollar el correspondiente cromatograma, la radioactividad presente en secciones transversales de 1 cm se monitoreó mediante centelleo líquido.

### 2.8.2. Electroforesis en papel

Electroforesis de alto voltaje se efectuó sobre papel SS 2043a (Schleicher & Schuell) a 30 V/cm en ácido fórmico 5% (pH 2). Los tiempos de corrida variaron en los distintos experimentos y se indicarán en Resultados. Luego de las corridas, las tiras de papel se pasaron por un radiocromatógrafo ("scanner") marca Packard modelo 7200 para detectar radioactividad o, alternativamente, se cortaron en bandas transversales de 1 cm cuya radioactividad se determinó mediante centelleo líquido.

### 2.9. Análisis estructural de oligosacáridos intracelulares de alta manosa

### 2.9.1. Oligosacáridos unidos a Dol-PP

Los precipitados obtenidos luego de las incubaciones de tejido se lavaron varias veces con EDTA 10 mM a 0°C, homogeneizaron en H<sub>2</sub>O, obteniéndose así una suspensión acuosa de 3 ml. Se agregó, entonces, 5 veces ese volumen de Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH (3:2), se agitó, centrifugó a baja velocidad y se descartaron las fases superiores e inferiores. La interfase se lavó dos veces con 12 ml de Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (3:2:1), luego con 6 ml de H<sub>2</sub>O, y finalmente se extrajo con 5 ml de Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (1:1:0,3) cuatro veces. Estos últimos extractos se combinaron, evaporaron y disolvieron en 1 ml de la última mezcla de extracción. La solución resultante fue pasada por una columna (0,6 cm x 6 cm) de DEAE-celulosa forma acetato. Luego de lavar con 17 ml de la misma mezcla, se eluyó con formiato de amonio 50 mM en la misma mezcla. El eluido se evaporó y sometió a hidrólisis ácida suave con HCl (pH 2, 10 min, 100°C) para romper las uniones lípido-oligosacárido, seguido de una partición en Cl<sub>3</sub>CH:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (3:2:1) donde en la fase superior se recuperaban los oligosacáridos liberados por ácido y que estaban previamente unidos a lípido. Luego de agregar resina aniónica Dowex AG-X-1 forma acetato para eliminar los cloruros, las muestras se separaban de la resina por centrifugación y evaporaban a sequedad en corriente de aire a 50°C, conservándose a -20°C hasta su uso con fines analíticos.

### 2.9.2. Oligosacáridos unidos a proteína

Los precipitados de proteína desnaturalizada resultantes de las extracciones con  $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0,3) mencionadas en el punto anterior se lavaron diez veces con  $\text{H}_2\text{O}$  e incubaron 10 días a  $37^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de tolueno en 1 ml de una solución que contenía Tris-HCl 0,05 M pH 8,5,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y una punta de espátula de proteasa, la cual se reponía cada dos días, ya que era autodegradada. Las reacciones se detuvieron con TCA a una concentración final de 10%, luego de lo cual se centrifugó a  $1.000 \times g$  durante 10 min, tomándose el sobrenadante que contiene los glicopéptidos liberados por la enzima. Dicho sobrenadante fue lavado cinco veces con 5 ml de éter (el cual fue evaporado bajo  $\text{N}_2$ ) y concentrado hasta 1 ml. Luego se le agregó Blue Dextran y se pasó por una columna (120 cm x 1,25 cm) de Bio-Gel P-6 (100-200 "mesh") equilibrada con buffer acetato-piridina 0,1 M pH 5,0. Se eluyó con el mismo solvente y se recogieron fracciones de 1,5 ml. Se reunieron las fracciones correspondientes a un volumen recogido de 72-95 ml, que corresponde a la elución de glicopéptidos que contienen entre 3 y 20 unidades de azúcar (83). Dicho "pool" se sometió a electroforesis en papel en ácido fórmico 5% durante 3 h. El pico que migró al cátodo (cargado positivamente) detectado en radiocromatógrafo se eluyó del papel con agua y luego se llevó a sequedad. Esta fracción se referirá como "(glico)péptidos purificados".

Los (glico)péptidos purificados fueron tratados con Endo-H de manera análoga a la indicada en 2.10.2.1. Los incubados se sometieron a electroforesis en papel en idénticas condiciones que anteriormente, para separar los



compuestos que no migran (oligosacáridos sensibles a Endo-H) de los que migran (glicopéptidos resistentes a Endo-H). En los casos en que se incubó con (2-<sup>3</sup>H)manosa, el precipitado de proteína lavado y extraído fue tratado -antes del tratamiento con proteasa- con 5 ml de NaOH 50 mM durante 24 h a temperatura ambiente y luego con TCA 10%. Dicho tratamiento tiene por objeto eliminar posible marca de oligosacáridos O-unidos a proteína, los cuales se liberan y no son precipitados por TCA, pudiendo ser cuantificados en el sobrenadante. Luego, el precipitado por TCA fue lavado tres veces con éter e incubado con proteasa como se explicó antes, para rendir N-glicopéptidos.

## 2.10. Metodología utilizada para el análisis de proteínas secretadas

### 2.10.1. Métodos cromatográficos

#### 2.10.1.1. Filtración molecular por geles

Se utilizaron los materiales Bio-Gel P y Bio-Gel A de Bio-Rad. Bio-Gel P constituye una serie de materiales compuestos de partículas esféricas porosas preparadas por copolimerización de acrilamida y N,N'-metilen-bis-acrilamida. Hay diferentes tamaños de poro en la serie, lo que determina el límite de exclusión con respecto a pesos moleculares. La serie Bio-Gel A está formada por partículas esféricas de agarosa y también las hay de varios tamaños de poro. En el presente trabajo, Bio-Gel P-6 (límite de exclusión: 6.000 de peso molecular en el caso de proteínas globulares) fue usada en una columna de vidrio de 25 cm x 0,8 cm equilibrada y eluida con PBS diluido 1/20. Después de cargar la columna con la muestra,

se recogieron fracciones de 0,5 ml, de las cuales se tomaron alícuotas para determinación de radioactividad. Bio-Gel P-60 y Bio-Gel A 1.5 m (límites de exclusión: 60.000 y 1.500.000 de peso molecular respectivamente) se utilizaron para preparar columnas de 45,5 cm x 0,9 cm con PBS como buffer de corrida. Luego de cargar la muestra, se recogieron fracciones de 0,5 ml para determinación de radioactividad o análisis electroforético. Blue Dextran y  $\text{CoCl}_2$  se usaron como marcadores de volumen muerto y final, respectivamente. Las velocidades de flujo fueron aproximadamente 5 ml/h en todos los casos.

#### 2.10.1.2. Cromatografía de afinidad mediante Concanavalina A-agarosa

Se utilizó una columna de vidrio de 4 cm x 0,6 cm conteniendo 42 mg de concanavalina A acoplada a 63 mg de agarosa. Después de agregada la muestra, la columna se dejó estacionada durante 30 min, luego se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y el material complejado se eluyó por acción de  $\alpha$ -metil manósido 2% en PBS.

#### 2.10.2. Tratamientos enzimáticos

##### 2.10.2.1. Tratamiento con Endo-H

Las muestras fueron disueltas en 100  $\mu\text{l}$  de buffer trietilamina-acetato 50 mM pH 5,5. Se añadieron 0,003 unidades de Endo-H y se incubó a 37°C durante 24 h. Las incubaciones se detuvieron evaporando las muestras a sequedad en corriente de aire a 50°C.

#### 2.10.2.2. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Las muestras fueron disueltas en 100  $\mu$ l de buffer Tris 100 mM pH 10. Se agregó 1,0 unidad de fosfatasa alcalina y se incubó a 37°C durante 24 h, luego de lo cual se evaporó a sequedad en corriente de aire a 50°C.

#### 2.10.3. Métodos electroforéticos

##### 2.10.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

PAGE en condiciones desnaturalizantes fue llevada a cabo en cubas de marca Bio-Rad para geles planos de 1,5 mm de espesor de acuerdo a la técnica de Laemmli (59) con las modificaciones de Thomas (112) para mejor resolución de pequeñas proteínas. El gel de corrida contenía acrilamida 18%, N,N'-metilen-bis-acrilamida 0,09%, buffer Tris 0,75 M pH 8,4 y SDS 0,1%. El gel de poro grande ubicado por encima del gel de corrida contenía acrilamida 5,1%, N,N'-metilen-bis-acrilamida 0,13%, buffer Tris HCl 0,062 M pH 6,8 y SDS 0,1%. El agente polimerizante del gel de corrida fue persulfato de amonio y el gel de poro grande se fotopolimerizó con riboflavina. Se usó TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina) como catalizador de la polimerización de ambos tipos de geles.

El buffer de corrida fue Tris 0,05 M-glicina 0,38 M pH 8,4 conteniendo SDS 0,1%.

Las muestras secas fueron disueltas y calentadas 2 min a 100°C en una solución de la siguiente composición: Tris 0,08 M, glicerol 10% v/v, SDS

2%, 2-mercaptoetanol 0,14 M y azul de bromofenol 0,01% como marcador del frente de corrida.

Los standards de peso molecular fueron: fosforilasa B, 97,4 KDa; BSA, 66 KDa; ovoalbúmina, 45 KDa; tripsinógeno, 24 KDa;  $\beta$ -lactoglobulina, 18,4 KDa y lisozima, 14,3 KDa.

Las corridas se realizaron a voltaje constante: 75 V mientras la muestra atravesaba el gel de poro grande y 150 V desde que el azul de bromofenol ingresaba al gel de corrida (momento en el que el amperaje fue 50 mA). Las corridas se interrumpieron cuando el color azul llegaba al borde inferior del gel de corrida (amperaje=35 mA). En estas condiciones, el tiempo total de corrida fue aproximadamente de 5 h.

Para visualización directa de proteínas, los geles se fijaron en metanol:ácido acético:agua (5:1:5) durante 45 min y luego se tiñieron con Coomassie Brilliant Blue 0,1% en la misma mezcla de solventes durante toda la noche. La decoloración se realizó con metanol:ácido acético:agua (1:1,5:17,5) renovando varias veces la solución decolorante. Los geles lavados con agua se secaron por combinación de calor y vacío en un secador de geles marca Bio-Rad modelo 224.

Las técnicas autorradiográficas se llevaron a cabo exponiendo el gel seco previamente tratado con salicilato de sodio 1 M (24) cuando se requirió visualizar marca de  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  a placas Kodak "pre-flasheadas" (61). En los casos de visualizar marca de  $^{32}\text{P}$  o  $^{125}\text{I}$  el tratamiento con salicilato no fue necesario.

#### 2.10.4. Métodos químicos para el análisis estructural de oligosacáridos

##### 2.10.4.1. Acetólisis

Se empleó la técnica de Kocourek y Ballou (53) con algunas modificaciones sugeridas por el Dr. G. Lederkremer (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar"). Previamente se realizó una reducción de los oligosacáridos por agregado a los residuos secos de 500  $\mu$ l de NaBH<sub>4</sub> 0,2 M e incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de un tratamiento con la resina catiónica Dowex 50, forma H<sup>+</sup>, el ácido bórico resultante se eliminó mediante repetida evaporación con metanol en corriente de aire a 50°C. Los oligosacárido-alcoholes se disolvieron en 200  $\mu$ l de una mezcla de piridina:anhídrido acético (1:1) y se calentó a 100°C durante 4 h para lograr la acetilación. Los oligosacáridos acetilados se liberaron del solvente por evaporación reiterada con 0,5 ml de tolueno. La acetólisis se llevó a cabo disolviendo los residuos en 0,2 ml de anhídrido acético:ácido acético:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10:10:1) y dejando a 37°C durante 10 h. La reacción se detuvo por agregado de 200  $\mu$ l de piridina y evaporación repetida con tolueno.

El residuo amarillento se extrajo con 1 ml de Cl<sub>3</sub>CH y 1 ml de H<sub>2</sub>O, separando la fase orgánica y reextrayendo la fase acuosa con 1 ml de Cl<sub>3</sub>CH tres veces. Los extractos clorofórmicos se reunieron, lavaron con H<sub>2</sub>O y evaporaron a sequedad.

Los productos de la acetólisis fueron de-O-acetilados en 2 ml de metóxido de sodio 0,05 N en metanol absoluto anhidro a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se agregó Dowex 50 H<sup>+</sup>, 1 ml de H<sub>2</sub>O y resina mixta

Amberlite MB-3, forma acetato. La solución fue separada de las resinas por centrifugación y evaporada a sequedad para su posterior análisis cromatográfico.

#### 2.10.4.2. Hidrólisis total de oligosacáridos

Se realizó sobre proteína secretada precipitada por TCA 10% con 1 mg de BSA como "carrier". El precipitado fue lavado de manera idéntica a la indicada en 2.7.1. excepto que la etapa de sonicación con metanol se reemplazó por sonicación con H<sub>2</sub>O. El sonicado se transfirió a ampolla de vidrio, la cual fue sellada a la llama luego de agregar HCl a una concentración final de 1,5 N. La hidrólisis fue llevada a cabo a 100°C durante 4 h, luego de lo cual se eliminó el HCl por evaporación repetida con H<sub>2</sub>O bajo corriente de aire a 50°C. La recuperación de radioactividad fue del 10%. Las muestras hidrolizadas secas se conservaron a -20°C hasta su utilización para análisis cromatográfico.

#### 2.11. Iodinación de proteínas

Se eligió el método Iodo-Gen, marca registrada de Pierce Chem. Co, (Rockford, IL) para el 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -difenilglicourilo (32), compuesto oxidante escasamente hidrosoluble, cedido gentilmente por Sergio Tisminetzky del Centro de Virología Animal, Buenos Aires.

Al tubo que contenía Iodo-Gen seco se le agregó 20  $\mu$ g de proteína y 1 mCi de Na<sup>125</sup>I. El producto de la iodinación se pasó por una columna de Bio-Gel P-6, recuperándose el material excluido, que corresponde a la pro-

teína iodada. El rendimiento fue cercano al 50%.

El material proteico iodado fue posteriormente purificado por cromatografía de afinidad con Concanavalina A y usado para los experimentos de unión a espermatozoides. La radioactividad específica final fue 2,8  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

## 2.12. Experimentos de unión a espermatozoides

Los espermatozoides fueron recogidos en PBS conteniendo BSA 1%, filtrados sobre trama de nylon y lavados por centrifugación 10 min a 200 x g. Con el fin de determinar el tiempo óptimo de incubación, la proteína iodada (0,03  $\mu\text{g}$ , 80.000 cpm) fue incubada con  $3 \times 10^6$  espermatozoides en PBS conteniendo BSA% a 37°C con suave agitación en ausencia o presencia de 3  $\mu\text{g}$  de proteína sin marca radioactiva en un volumen total de 0,4 ml. Las incubaciones se detuvieron agregando 2 ml de PBS conteniendo BSA 0,1% a 0°C a tiempos variables. En todos los experimentos de este tipo, los tubos se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 min y la cantidad de proteína marcada asociada a células se estimó por la radioactividad presente en los precipitados, cuyo lavado no afectó los resultados.

### 2.12.1. Parámetros de la unión

Los parámetros inherentes a la unión de proteína epididimaria a espermatozoides (constante de afinidad y número de sitios receptores/célula) fueron determinados por análisis de saturación y por análisis de competición. De acuerdo al primer enfoque,  $3 \times 10^6$  espermatozoides se equilibraron con diferentes concentraciones de proteína marcada (12.500-120.000 cpm) durante

120 min a 37°C. El grado de unión inespecífica fue evaluado en presencia de un exceso (100 veces más) de proteína sin marca. En los estudios de competición, el mismo número de células se incubó con 160.000 cpm de proteína marcada en presencia de variables cantidades de proteína sin marca (1,2-7.000 ng) en las mismas condiciones. Los datos fueron representados en gráficos de Scatchard (96), a partir de los cuales se calcularon los parámetros propios de la unión.

### 2.13. Determinaciones de radioactividad

Se efectuaron en un contador Beckman LS 1800 en los casos de muestras marcadas con  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{32}\text{P}$  sobre papel o fibra de vidrio previamente sumergidas en la siguiente solución de centelleo: 2,5 difeniloxazol 0,5% 1,4-bis-2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benceno 0,025% en tolueno. Muestras de tejido precipitadas por TCA fueron solubilizadas con Protosol (New England Nuclear) o NCS (Amersham, Reino Unido) y luego mezcladas con la misma solución de centelleo para determinación de radioactividad. Muestras acuosas, tales como eluidos de columna, fueron mezcladas con 20 volúmenes del líquido de centelleo descrito por Bray (14) y luego contadas. El instrumento, mediante programas adecuados, fue capaz de discriminar  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^{32}\text{P}$  entre sí. Muestras con menos de 500 cpm fueron contadas durante 50 min.

La actividad debida a  $^{125}\text{I}$  fue determinada en un contador Beckman Gamma 4000.



#### 2.14. Otras determinaciones

El contenido de proteína de las distintas muestras fue analizado por el método de Lowry y col. (65).

El contenido de DNA fue determinado por el método de Burton y col. (20).

#### 2.15. Análisis estadístico

En los experimentos en los cuales se midió la respuesta de diversos parámetros en grupos de animales frente a estímulos hormonales, las diferencias experimentales se evaluaron por análisis de varianza de dos vías. Las comparaciones entre promedios se hicieron utilizando el test de Newman-Keuls (121) a un nivel de significación de 5%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Dependencia androgénica de la N-glicosilación de proteínas en epidídimo de rata

La existencia de control hormonal de la N-glicosilación ha sido previamente demostrada en oviducto de gallina durante diferenciación inducida por estrógenos (66), y en cuanto a tejido epididimario, Brooks (16) ha dado evidencias de que la incorporación de manosa en proteína disminuye severamente después de la castración. Para obtener mayor información con respecto a este punto, se determinaron algunas actividades enzimáticas involucradas en el ciclo del dolicol, usando el epidídimo de rata en diferentes situaciones hormonales como modelo biológico.

##### 3.1.1. Efecto de testosterona administrada "in vivo" sobre actividades enzimáticas del ciclo del dolicol en microsomas epididimarios

##### 3.1.1.1. Influencia de la castración sobre las actividades de manosil y glucosil transferasas

Las actividades de UDP-glucosa:Dol-P glucosil transferasa (EC 2.4.1.78) y GDP-manosa:Dol-P manosil transferasa (EC 2.4.1.83) fueron determinadas en microsomas epididimarios de ratas castradas y mantenidas en esas condiciones por períodos comprendidos entre 2 y 11 días. Los resultados (Fig. 3-1) muestran que el período más corto post-castración estudiado, 2 días, fue suficiente para producir una abrupta caída en ambas actividades enzimáticas

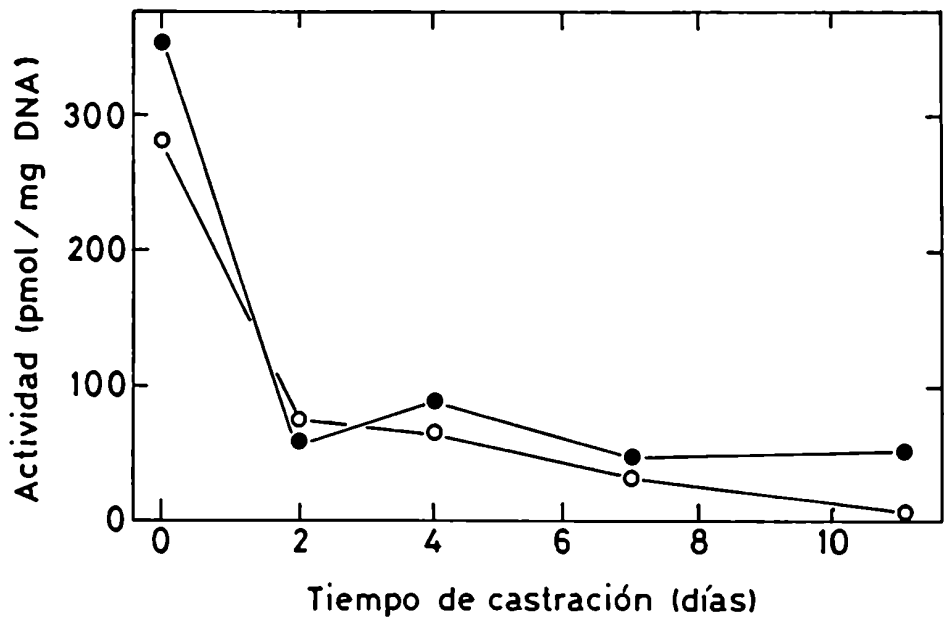


Fig. 3-1: Efecto de la castración sobre las actividades de manosil y glucosil transferasa.

Microsomas epididimarios fueron obtenidos de ratas intactas, o castradas y mantenidas durante 2-11 días hasta los ensayos de manosil transferasa (o) y glucosil transferasa (●), los cuales se efectuaron en presencia de Dol-P 20  $\mu$ M. El tiempo cero corresponde a animales no castrados. Las condiciones de incubación están indicadas en las Secciones 2.4.1. y 2.4.2. Los datos están expresados como la actividad enzimática correspondiente a una cantidad de muestra proveniente de un homogenato conteniendo 1 mg de DNA.

de aproximadamente 75% con respecto a los animales no castrados usados como controles (tiempo = 0). Estos últimos sólo tuvieron sus conductos eferentes ligados y de aquí en adelante se referirán como "animales intactos". La actividad de manosil transferasa continuó disminuyendo a medida que transcurrían tiempos más prolongados luego de la castración, siendo indetectable después de 11 días, mientras que la glucosil transferasa permaneció invariable entre los 2-11 días. Basándose en estas observaciones, las mediciones en todos los experimentos subsiguientes se realizaron 7 días luego de la castración.

#### 3.1.1.2. Efecto de testosterona sobre manosil transferasa

Dado que la transferasa más afectada fue la manosil transferasa, esta última se estudió en detalle con respecto a su respuesta frente a diferentes dosis del andrógeno. Su actividad disminuida luego de la castración fue ensayada después de un tratamiento "in vivo" con el andrógeno durante 4 días.

Los resultados en la Fig. 3-2 (barras vacías) muestran que la castración redujo la actividad en un 67,5% y que el propionato de testosterona (TP) en dosis entre 10 y 200  $\mu\text{g}/\text{día}$  produjo una relación dosis-respuesta lineal (coeficiente de correlación  $r = 0,69$  a un nivel de significación  $p < 0,001$ ). 20 y 50  $\mu\text{g}$  de TP/día aumentaron la actividad pero los valores no fueron significativamente diferentes de los encontrados en animales castrados, mientras que dosis mayores llevaron los valores a niveles control ( $116 \pm 6,6$  pmol de  $^{14}\text{C}$ manosil/mg de DNA). Con el objeto de asegurarse de la especificidad del efecto androgénico, se llevó a cabo un experimento en el cual ratas castradas fueron tratadas con TP (20  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) en

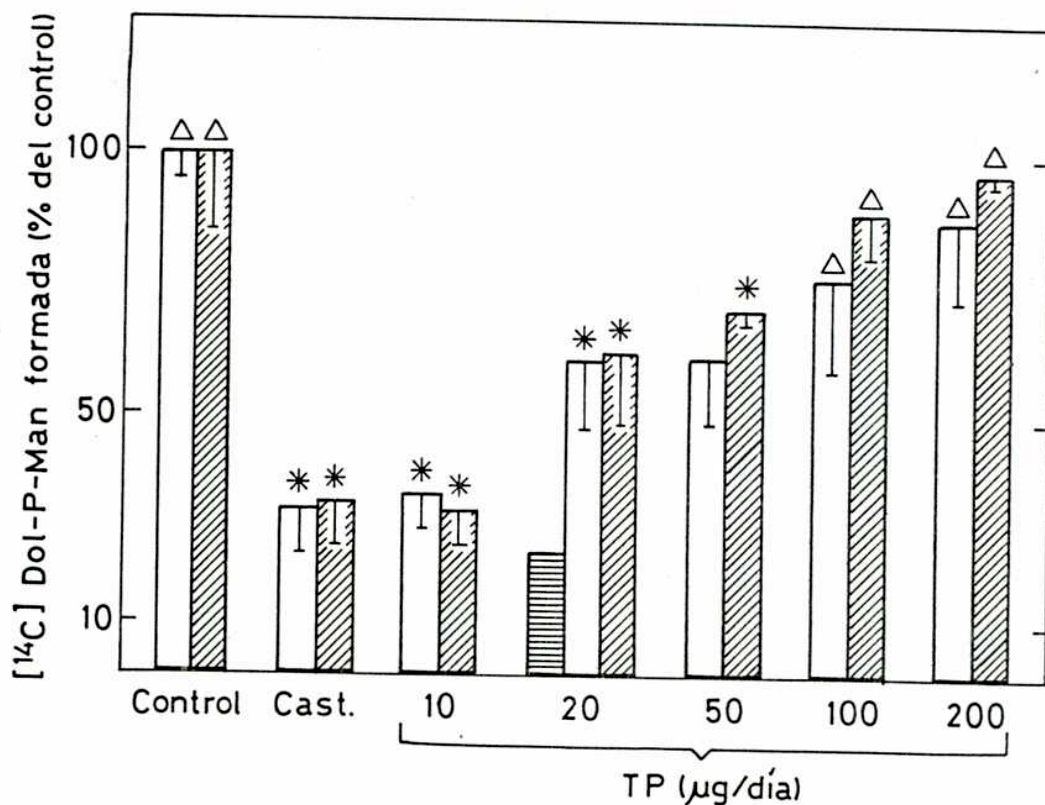


Fig. 3-2: Efecto de la administración de testosterona a ratas castradas sobre la actividad de manosil transferasa.

Las incubaciones se realizaron en ausencia (□) y presencia (▨) de Dol-P 400 µM. Los microsomas se obtuvieron a partir de ratas mantenidas castradas 7 días (Cast.) o en las mismas condiciones pero posteriormente tratadas con las dosis indicadas de TP durante 4 días. Un grupo de ratas castradas fueron tratadas con 20 µg de TP/día y 500 µg de CA/día (▨). Animales intactos fueron usados como controles. Los resultados están expresados como porcentajes con respecto al control. \*:  $P < 0,05$  vs. grupo control; Δ:  $P < 0,05$  vs. grupo castrado.

combinación con el antiandrógeno acetato de ciproterona (CA) (500  $\mu\text{g}/\text{día}$ ), esteroide que compite con la testosterona por su receptor (110). Si bien la dosis de TP utilizada no fue la que produjo máximo efecto, los resultados (Fig. 3-2, barras rayadas) indican que la administración simultánea de CA bloqueó el efecto inductivo de dicha dosis de TP sobre la actividad de manosil transferasa.

Para discriminar si la inducción por andrógenos se debe a niveles aumentados de enzima o de aceptor lipídico (Dol-P) en las membranas microsomales, los ensayos de actividad se realizaron en presencia de altas concentraciones de Dol-P exógeno. Para ello, previamente se determinó experimentalmente el comportamiento cinético de la enzima con respecto a su sustrato Dol-P. Los datos fueron graficados en forma directa (curva de saturación por sustrato) y según la representación de Lineweaver-Burk, como se muestra en la Fig. 3-3. Los datos revelaron un comportamiento de tipo michaeliano, arrojando un valor de  $K_m$  aparente igual a 33  $\mu\text{M}$ , mayor pero del mismo orden de magnitud que los valores hallados en otros tejidos (1,52,94). Se decidió, entonces, usar una concentración de Dol-P igual a 400  $\mu\text{M}$ , que equivale aproximadamente a 12 veces el valor de  $K_m$ , en los ensayos de actividad de manosil transferasa. Dicha concentración no es excesiva, y por lo tanto en la práctica fue perfectamente manejable sin necesidad de requerir mayores concentraciones de detergente para su solubilización. Además, para una enzima con comportamiento michaeliano, una concentración de sustrato igual a 12 veces el valor de  $K_m$  equivale a una cuasi-saturación, con el 92% de las moléculas unidas a sustrato, como surge de un fácil análisis:

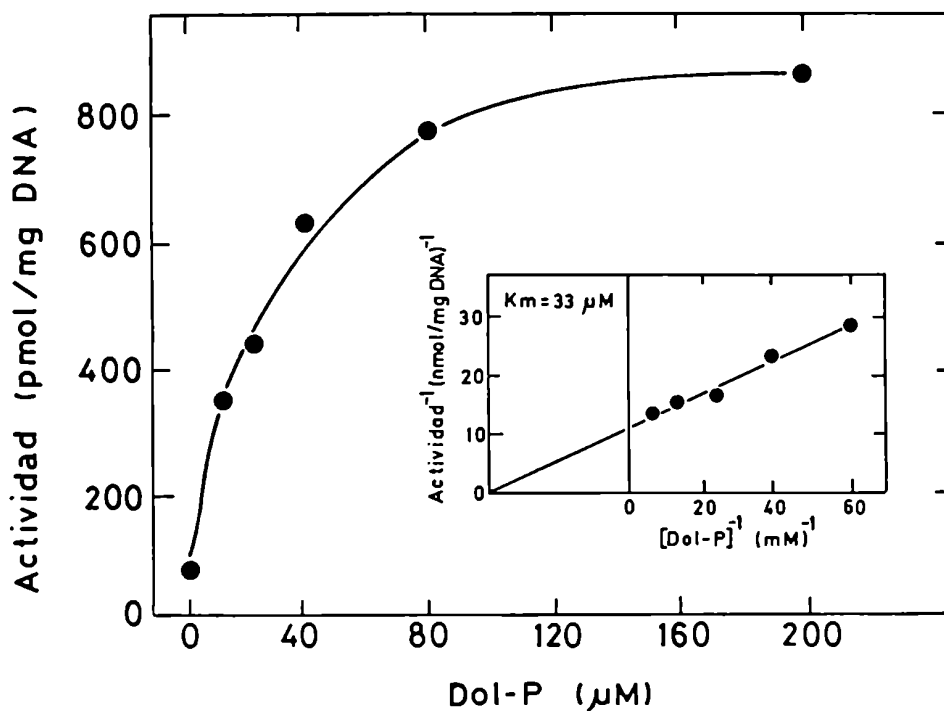


Fig. 3-3: Análisis cinético de manosil transferasa epididimaria con respecto a Dol-P.

Microsomos epididimarios de ratas intactas fueron incubados para la medición de actividad de manosil transferasa en presencia de concentraciones crecientes de Dol-P. Recuadro interno: los mismos datos presentados según el gráfico de dobles recíprocas.

$$\frac{[ES]}{[E_t]} = \frac{V}{V_m} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

donde:  $[ES]$  = concentración de complejo enzima-sustrato  
 $[E_t]$  = concentración de enzima total  
 $V$  = velocidad  
 $V_m$  = velocidad máxima  
 $[S]$  = concentración de sustrato

reemplazando  $[S]$  por  $12 K_m$ :

$$\frac{[ES]}{[E_t]} = \frac{V}{V_m} = \frac{12 K_m}{13 K_m} = 0,92$$

Los datos obtenidos con la concentración mencionada de Dol-P (Fig. 3-2, barras llenas) muestran efectos relativos similares a los obtenidos sin Dol-P exógeno en respuesta a privación y reemplazo de hormona. Una relación dosis-respuesta lineal se obtuvo para las diferentes dosis de TP ( $r = 0,765$ ;  $P < 0,001$ ). El análisis de varianza mostró que 100 y 200  $\mu\text{g}$  de TP/día produjeron un significativo aumento en la actividad enzimática sobre valores correspondientes a animales castrados ( $P < 0,05$ ) a un nivel similar al del control ( $641 \pm 100$  pmol de manosa/mg de DNA). Se concluye, entonces, que concentraciones cuasi-saturantes de Dol-P no fueron capaces de eliminar las diferencias en la actividad de manosil transferasa producidas por castración y tratamiento con andrógenos, descartando variaciones en el tamaño del "pool" de Dol-P en las diferentes situaciones fisiológicas estudiadas.

Los datos obtenidos han sido normalizados por cantidad de DNA presente en las muestras que dieron origen a los microsomas utilizados. El motivo de esta decisión obedece a que el contenido de DNA total en el tejido fluctuó en menor medida que el de proteína total microsomal como resultado de



privación y administración de testosterona, comparando siempre un mismo número de animales (Tabla 3-I). De esta manera, los resultados son representativos de los cambios en actividad enzimática en una célula, independientemente de las variaciones en la cantidad de proteína total en una célula.

Con el objeto de ver si las alteraciones en la actividad de manosil transferasa obedecen al hecho de que la enzima pre-existente es modulada positivamente por testosterona, o si alternativamente este esteroide induce "in vivo" mayor síntesis de la enzima, se realizó un experimento en el cual se agregó "in vitro" TP a la mezcla de incubación. Los resultados que se muestran en la Tabla 3-II descartan la primera posibilidad mencionada (la cual "a priori" era muy poco probable como se verá en "Discusión") y estarían de acuerdo con la segunda. Es pertinente hacer notar de que hay una tercera posibilidad consistente con los experimentos hasta aquí descritos: que un producto metabólico de testosterona que sólo "in vivo" pudiera formarse (y no en microsomas aislados) fuera el responsable directo de la modulación de la enzima pre-formada. Este punto será analizado en mayor detalle en la "Discusión".

### 3.1.1.3. Efecto androgénico sobre la incorporación de manosa en Dol-PP-oligosacáridos y en proteína

Datos preliminares obtenidos de ratas intactas habían evidenciado la transferencia por enzimas microsomales de ( $^{14}\text{C}$ )manosa (a partir de GDP-( $^{14}\text{C}$ )manosa y en presencia de Dol-P exógeno) en Dol-PP-oligosacáridos, lo cual, según el esquema de la Fig. 1-2, implica la existencia de UDP-GlcNac y/o Man<sub>0-8</sub>GlcNac<sub>2</sub>-PP-Dol endógenos presentes en los microsomas epididimarios

Tabla 3-I: Efecto androgénico sobre contenido de DNA y proteínas.

Grupo de animales	Proteína ( $\mu\text{g}$ )	DNA ( $\mu\text{g}$ )
Intactos	476	30
Castrados	192	28
Castrados + 10 $\mu\text{g}$ de TP	280	40
Castrados + 20 $\mu\text{g}$ de TP	308	20
Castrados + 50 $\mu\text{g}$ de TP	324	28
Castrados + 100 $\mu\text{g}$ de TP	328	16
Castrados + 200 $\mu\text{g}$ de TP	384	30

Se analizó el contenido de proteína y DNA totales en muestras provenientes de tres animales, ya sea intactos, castrados o castrados a los cuales se les administró las dosis indicadas de TP/día durante 4 días. El contenido proteico fue determinado en microsomas y el de DNA en homogenatos totales previo a la centrifugación diferencial para la obtención de microsomas. En ambos casos los datos están referidos a las alícuotas de microsomas utilizados para la medición de manosiil transferasa.

Tabla 3-II: Efecto de TP "in vitro" sobre actividad de manosil transferasa.

Agregado	Actividad enzimática (pmol/mg DNA)
Ninguno	191
TP $10^{-6}$ M	190

Microsomas de animales castrados fueron utilizados para medición de actividad de manosil transferasa. Se utilizó Dol-P  $20 \mu\text{M}$  en ausencia o presencia de TP  $10^{-6}$  M en la mezcla de incubación.

utilizados. También se había observado incorporación de ( $^{14}\text{C}$ )manosa en glicoproteína bajo las mismas condiciones experimentales, demostrando la existencia adicional de UDP-Glc y/o Glc-P-Dol endógenos en los microsomas.

Los antecedentes expuestos precedentemente determinaron que era metodológicamente posible investigar si los cambios observados en la actividad de manosil transferasa se reflejaban en similares variaciones en la síntesis de Dol-PP-oligosacáridos y N-glicoproteínas "in vitro". Los resultados de la Fig. 3-4 demuestran que la incorporación de ( $^{14}\text{C}$ )manosa en las fracciones estudiadas disminuyeron aproximadamente un 60% ( $P < 0,01$ ) como resultado de la castración. Una respuesta gradual al tratamiento androgénico se obtuvo para Dol-PP-oligosacáridos y glicoproteínas ( $r = 0,54$ ;  $P < 0,05$  y  $r = 0,57$ ;  $P < 0,05$  respectivamente). Una significativa reinducción de ambos parámetros se observó ya a  $20 \mu\text{g}/\text{día}$  ( $P < 0,05$ ), mientras que desde  $50 \mu\text{g}$  en más, los valores controles fueron restaurados ( $33,5 \pm 3,12$  y  $27,7 \pm 5,9$  pmol de manosa/mg de DNA, respectivamente).

#### 3.1.1.4. Efecto androgénico sobre Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa

Otras enzimas estudiadas fueron Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa, las cuales se acepta que modulan los niveles endógenos de Dol-P (12). La Tabla 3-III muestra pequeñas diferencias (10%) en la actividad de Dol-P fosfatasa entre animales intactos y castrados. En cuanto a la actividad de Dol fosfoquinasa, ésta resultó ser muy baja y las diferencias entre ambos grupos estuvieron en el orden del error experimental. En este caso, al no hallarse tendencia alguna asociada al status endócrino de las ratas, no se realizaron experimentos con tratamiento androgénico.

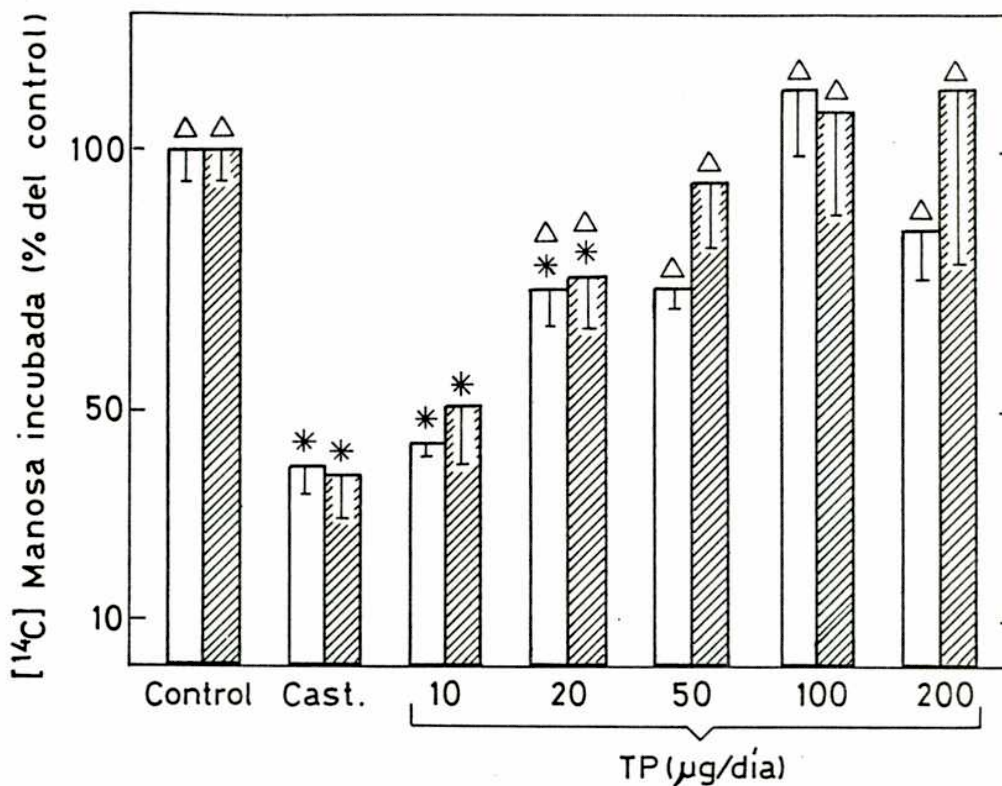


Fig. 3-4: Efecto androgénico sobre la incorporación "in vitro" de manosa en Dol-PP-oligosacáridos y glicoproteína.

□ : incorporación en Dol-PP-oligosacáridos; ▨ : incorporación en glicoproteína. El tratamiento de los animales, la obtención de las muestras y la forma de expresar los resultados fueron igual que como está indicado en la Fig. 3-2. Los ensayos de incorporación se realizaron en presencia de Dol-P 400 µM. Las demás condiciones de incubación, así como los detalles técnicos de medición están explicitados en las Secciones 2.4.3. y 2.4.4.

Tabla 3-III: Efecto de andrógenos sobre Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa.

Grupo de animales	Dol-P fosfatasa (pmol/mg DNA)	Dol fosfoquinasa (pmol/mg DNA)
Intactos	320	2,9
Castrados	352	2,6

Microsomas de animales intactos y castrados fueron utilizados para el ensayo de actividad de Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa como se indica en "Materiales y Métodos" (Secciones 2.4.5. y 2.4.6.).

### 3.1.2. Efecto de andrógenos sobre niveles de Dol-P endógeno

De los resultados presentados en 3.1.1.2. se desprende que la concentración de Dol-P endógeno no se altera como consecuencia de variaciones en los niveles androgénicos "in vivo". Como prueba adicional confirmatoria, los niveles de Dol-P endógeno fueron determinados aprovechando su capacidad aceptora de glucosilos utilizando una preparación enzimática de hígado. Paralelamente se construyó una curva de calibración con bajas concentraciones de Dol-P standard para conseguir respuesta aproximadamente lineal (Fig. 2-1). Se encontró que los niveles de Dol-P normalizados por masa de DNA no variaron en los diferentes grupos de animales (Tabla 3-IV), resultado que fue el esperado, ya que está de acuerdo con los mencionados anteriormente. En este caso, a diferencia de lo que ocurrió en otros experimentos, existieron variaciones significativas entre los niveles de DNA de las muestras provenientes de animales intactos y castrados. Como control, para verificar que otros lípidos no saponificables presentes en los extractos no interfieren en el ensayo, la actividad enzimática fue también determinada en presencia de extractos epididimarios a los cuales se agregaron cantidades conocidas de Dol-P puro. Se observó recuperación total de este standard interno en extractos obtenidos a partir de ratas intactas y castradas, por lo que se descartó la eventual presencia en los extractos de activadores o inhibidores que pudieran alterar la cinética de la enzima hepática.

Tabla 3-IV: Efecto de la castración sobre el contenido de Dol-P endógeno en microsomas epididimarios.

Muestra	Dol-P ( $\mu\text{g}/\text{muestra}$ )	Recuperación de Dol-P exógeno ( $\mu\text{g}$ )	DNA ( $\mu\text{g}/\text{muestra}$ )	Dol-P ( $\mu\text{g}/\text{mg DNA}$ )
Intacto	2,74		405 $\pm$ 11	6,80 $\pm$ 0,57
Intacto + Dol-P	3,82	1,08		
Castrado	1,36		207 $\pm$ 17	6,70 $\pm$ 1,03
Castrado + Dol-P	2,32	0,96		

Glucosil transferasa de hígado de rata fue ensayada en presencia de extractos lipídicos no saponificables provenientes de microsomas epididimarios de ratas intactas o castradas. El contenido de Dol-P en los extractos (con o sin agregado de 1  $\mu\text{g}$  de Dol-P) fue calculado por interpolación en la curva de calibración mostrada en la Fig. 2-1.



### 3.1.3. Análisis estructural de oligosacáridos intracelulares unidos a Dol-PP y unidos N-glicosídicamente a proteína. Evaluación de la influencia androgénica

Con el objeto de discriminar si los cambios en la N-glicosilación por variaciones en los tenores androgénicos son solamente cuantitativos, como ya se demostró, o si también son cualitativos, se decidió encarar el análisis de las estructuras de los oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína epididimaria, como así también de sus precursores unidos a Dol-PP. Este tipo de estudios se llevó a cabo utilizando cortes de tejido metabólicamente activo, en lugar de microsomas aislados, debido a los siguientes motivos:

- 1) El inconveniente operacional de baja incorporación de azúcares por enzimas microsomales en Dol-PP-oligosacáridos y sobre todo en glicoproteína a partir de nucleótido-azúcares.
- 2) La fracción microsomal, dependiendo de las condiciones de homogeneización, varía con respecto a su contenido en vesículas membranosas derivadas del aparato de Golgi (70), en el cual ocurre el procesamiento final de las N-glicoproteínas (10).
- 3) Aún en condiciones de homogeneización controlada para obtener microsomas en los cuales coexistan retículo endoplásmico y Golgi, es probable que el transporte de las glicoproteínas desde retículo endoplásmico hacia Golgi se vea afectado parcial o totalmente en microsomas aislados resultando en una composición de azúcares que no es más que un artefacto de laboratorio.
- 4) Siendo la transferencia del oligosacárido desde Dol-PP a proteína un fenómeno que ocurre en forma simultánea a la síntesis proteica y no

pudiendo existir ésta en microsomas aislados, el número de residuos de asparagina glicosilables es muy bajo, ya que no se crean nuevos sitios aceptores (la elongación del polipéptido está interrumpida) como sucede en una célula con activa síntesis de proteínas. Además, está el agravante de que los pocos sitios aceptores ya pueden estar glicosilados endógenamente. Lo expuesto en este punto bien puede ser la causa del inconveniente de índole metodológica mencionada en el punto 1).

Obedeciendo a las razones expuestas, las estructuras de los oligosacáridos se determinaron utilizando tejido biosintéticamente activo para simular lo más posible las condiciones a las que está sujeto el órgano "in vivo".

#### 3.1.3.1. Incubaciones de tejido con ( $^{14}\text{C}$ )glucosa

Dado que la ( $^{14}\text{C}$ )glucosa puede metabolizarse originando marca no sólo en cada uno de los monosacáridos hallados en glicoproteínas (97) sino también en aminoácidos, la purificación de los  $^{14}\text{C}$ -oligosacáridos debió hacerse teniendo en cuenta tal fenómeno. Para no diluir la marca, las incubaciones se realizaron en ausencia de glucosa no radioactiva y en presencia de piruvato como fuente de energía.

##### 3.1.3.1.1. Dol-PP-oligosacáridos

Para estudiar las estructuras químicas de los oligosacáridos previamente unidos a Dol-PP se buscó un método conocido que discrimine tamaño de moléculas oligosacáridicas neutras, tal como el de cromatografía en papel.

Los resultados cromatográficos obtenidos a partir de los oligosacáridos unidos a Dol-PP (Fig. 3-5) muestran que las especies predominantes provenientes de animales intactos son las que co-migran con los standards que contienen 8 y 9 unidades de manosa. También se detectaron sustancias que co-migraron con los compuestos glucosilados conteniendo 2 y 3 residuos de glucosa.

El perfil correspondiente a una misma masa de tejido de animales castrados es cualitativamente idéntico pero cuantitativamente diferente, por cuanto la cantidad de marca radioactiva presente es sustancialmente menor, lo cual es consistente con los resultados presentados anteriormente con respecto a un menor grado de incorporación de manosa en Dol-PP-oligosacáridos a partir de GDP-( $^{14}\text{C}$ )manosa usando microsomas aislados.

#### 3.1.3.1.2. Oligosacáridos unidos a proteína

Siguiendo el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos", Sección 2.9.2., se obtuvieron glicopéptidos purificados mediante digestión con proteasa, pasaje por Bio-Gel P-6 para acotar tamaño molecular y electroforesis a pH ácido (Fig. 3-6). Al pH usado, los glicopéptidos adquieren carga positiva y pueden ser separables de impurezas eléctricamente neutras. El resultado de la electroforesis, mostrado en la Fig. 3-6 (material proveniente de animales intactos), permite observar una zona heterogénea compuesta por sustancias que migraron hacia el cátodo, es decir, cargadas positivamente y que corresponden a la fracción denominada "(glico)péptidos purificados" (que también contiene  $^{14}\text{C}$ -péptidos no glicosilados). También se halló un pico que migró hacia el ánodo, o sea que corresponde a compuestos con carga eléctrica negativa, el cual no se analizó. Como se verá más adelante, existen estruc-

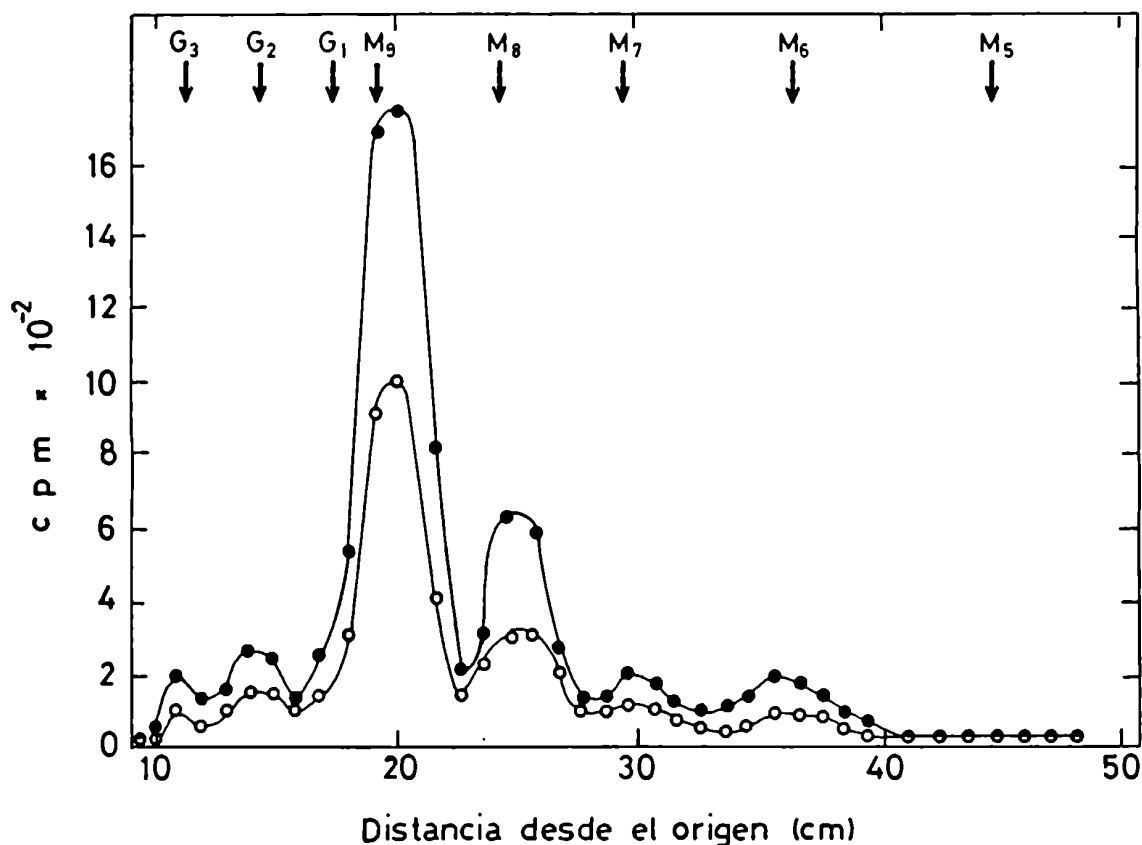


Fig. 3-5:  $^{14}\text{C}$ -oligosacáridos previamente unidos a Dol PP.

Aproximadamente 4 g de cabezas de epidídimo se incubaron con ( $^{14}\text{C}$ )glucosa y los Dol-PP-oligosacáridos se aislaron como está indicado en 2.9.1. Los oligosacáridos liberados de Dol-PP se trataron con Endo-H y se sometieron a cromatografía en papel durante 72 h en solvente A.

●--●, material proveniente de 9 animales intactos; ○--○, material proveniente de 15 animales castrados.

Standards:  $\text{M}_5$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNac}$ ;  $\text{M}_6$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNac}$ ;  $\text{M}_7$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNac}$ ;  $\text{M}_8$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNac}$ ;  $\text{M}_9$ ,  $\text{Man}_9\text{GlcNac}$ ;  $\text{G}_1$ ,  $\text{GlcMan}_9\text{GlcNac}$ ;  $\text{G}_2$ ,  $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNac}$ ;  $\text{G}_3$ ,  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}$ .

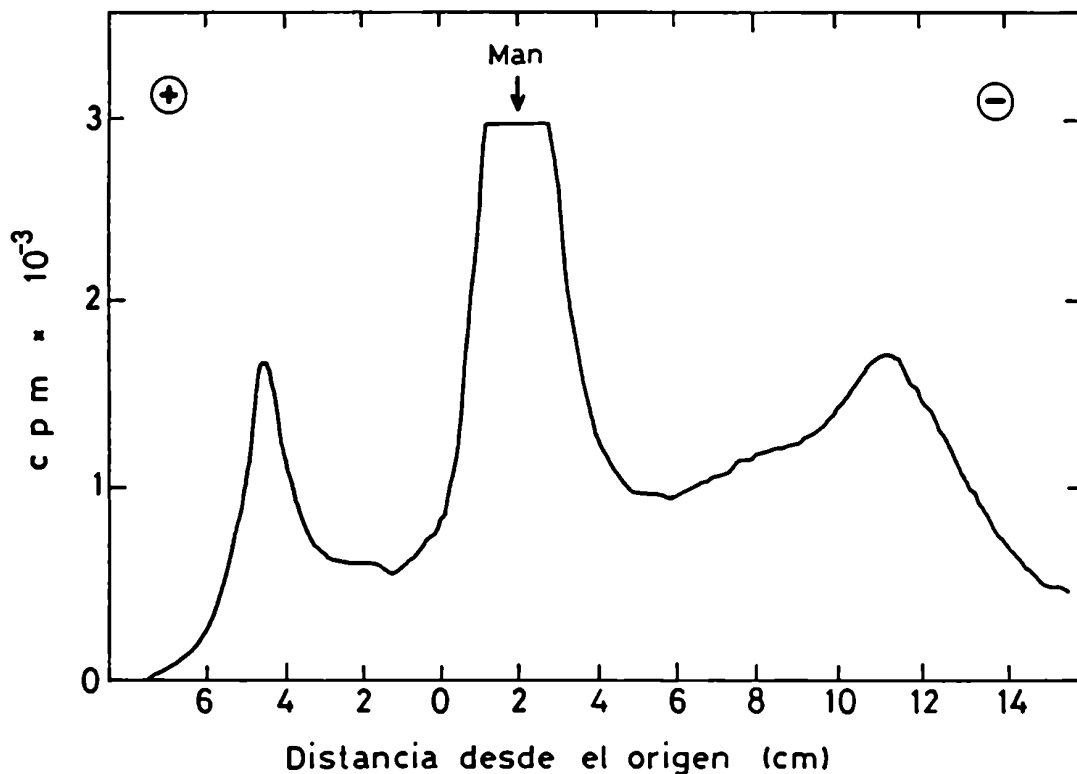


Fig. 3-6: Separación de <sup>14</sup>C-(glico)péptidos de las impurezas neutras.

Aproximadamente 4 g de cabezas de epidídimo (animales intactos) se incubaron con (<sup>14</sup>C)glucosa y los glicopéptidos se purificaron como se indica en 2.9.2., para lo cual el material parcialmente purificado proveniente de Bio-Gel P-6 se terminó de purificar mediante una electroforesis a pH 2 durante 3 h. La tira de papel se pasó por un radiocromatógrafo, cuyo registro gráfico se muestra.

La flecha indica la posición de manosa como indicador de electroneutralidad.

turas que justifican este último comportamiento electroforético.

Como se vio en Introducción, una herramienta útil para el estudio de las estructuras de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína es la enzima Endo-H, por cuanto es capaz de liberar de la proteína a oligosacáridos de "alta manosa" y no a los de tipo "complejo". Por lo tanto, el grado de sensibilidad a Endo-H de una mezcla de glicopéptidos es estimativo de la abundancia de oligosacáridos de "alta manosa" en dicha mezcla. Adoptando este enfoque, los "(glico)péptidos purificados" fueron tratados intensivamente con dicha enzima y posteriormente sometidos a una segunda electroforesis en las mismas condiciones (Fig. 3-7) para separar el producto de la reacción y el sustrato inatacable. Se halló un pico con movilidad nula que corresponde a los oligosacáridos neutros liberados por Endo-H y un pico heterogéneo que migró al cátodo (péptidos no glicosilados y glicopéptidos resistentes a Endo-H). La cuantificación de la radioactividad presente en el material sensible y en el resistente arrojó los valores que se muestran en la Tabla 3-V. Los resultados indican que hay una alta proporción de oligosacáridos sensibles a Endo-H (85-87%), supuestamente de "alta manosa" con respecto al total de péptidos y glicopéptidos purificados (estos últimos con uniones O- y N-glicosídicas).

Dado que en el procedimiento de purificación de glicopéptidos no se separaron los péptidos no glicosilados y los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a proteína, no se puede calcular a partir de los datos anteriores la relación entre la cantidad de oligosacáridos de "alta manosa" y la de "complejos". En otras palabras, el material resistente (13-15%) incluye una mezcla de péptidos no glicosilados, oligosacáridos unidos O-glicosídica y

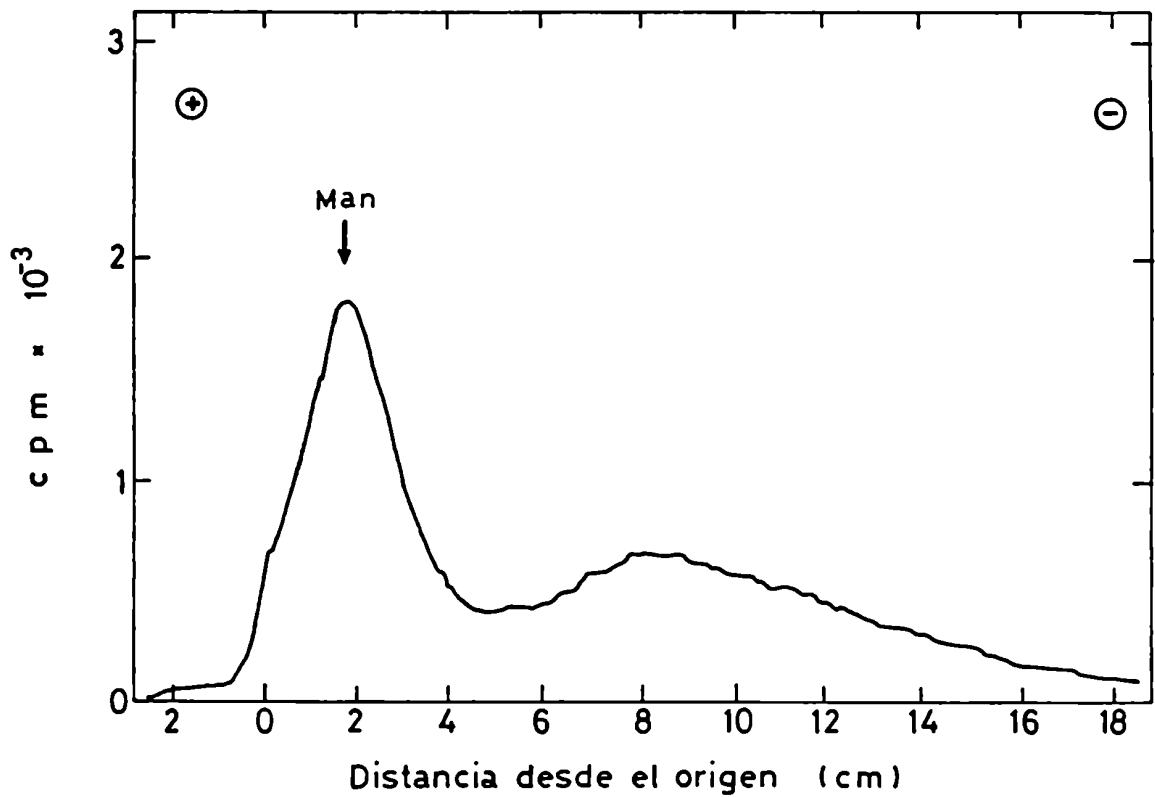


Fig. 3-7: Sensibilidad a Endo-H de los <sup>14</sup>C-glicopéptidos purificados.

El material del pico que migró al cátodo en la electroforesis de la Fig. 3-6 se eluyó del papel, trató con Endo-H y sometió a electroforesis en papel en las mismas condiciones que en la electroforesis de la Fig. 3-6.

La flecha indica la posición de manosa como indicador de electroneutralidad.

Tabla 3-V: Proporción de  $^{14}\text{C}$ -oligosacáridos sensibles a Endo-H.

	Origen de material			
	Animales intactos		Animales castrados	
	cpm	%	cpm	%
Oligosacáridos sensibles a Endo H	200.000	87,3	83,000	85,3
(glico)péptidos resistentes a Endo-H	29.000	12,7	14,300	14,7

El pico neutro (sensible a Endo-H) y el de carga positiva (resistente a Endo-H) de la Fig. 3-7 (animales intactos) y los equivalentes de una electroforesis similar (animales castrados) se cortaron del papel para posterior cuantificación exacta de radioactividad por centelleo líquido.



N-glicosídicamente, estos últimos generalmente de tipo "complejo".

Los oligosacáridos neutros sensibles a Endo-H se estudiaron con mayor detalle con respecto a su estructura química. En tal sentido, se empleó la técnica de cromatografía en papel, de manera de separar los oligosacáridos en función del tamaño molecular, es decir de acuerdo a número de unidades monosacáridicas, tal como se hizo para oligosacáridos previamente unidos a lípido. El cromatograma de la Fig. 3-8 muestra la presencia de las especies que contienen 9, 8, 7, 6 y 5 residuos de manosa en abundancia relativa decreciente, no detectándose especies glucosiladas. El perfil obtenido a partir de animales castrados fue similar al originado de una misma masa de tejido de animales intactos, pero los picos tuvieron menor radioactividad, fenómeno que se observó repetidamente a lo largo de la purificación previa de estos oligosacáridos, y que está de acuerdo con la ya demostrada menor incorporación de manosa a glicoproteínas en microsomas aislados. Las estructuras encontradas son del tipo de "alta manosa" y confirman la validez del enfoque adoptado de aislar estos compuestos de acuerdo al criterio de sensibilidad a Endo-H.

#### 3.1.3.2. Incubaciones de tejido con (2-<sup>3</sup>H)manosa

Se eligió (2-<sup>3</sup>H)manosa como trazador alternativo pues tiene la ventaja sobre el anterior utilizado de que pierde el átomo de <sup>3</sup>H de la posición 2 cuando se metaboliza a fructosa-6-P, ya sea para entrar en la glucólisis (función energética) o para rendir otros monosacáridos o aminoácidos (función estructural). De esta manera, la radioactividad presente en el tejido al finalizar las incubaciones es debida solamente a manosa y a fucosa (cuyo nucleótido-azúcar GDP-fucosa deriva de GDP-manosa sin cambio de configuración

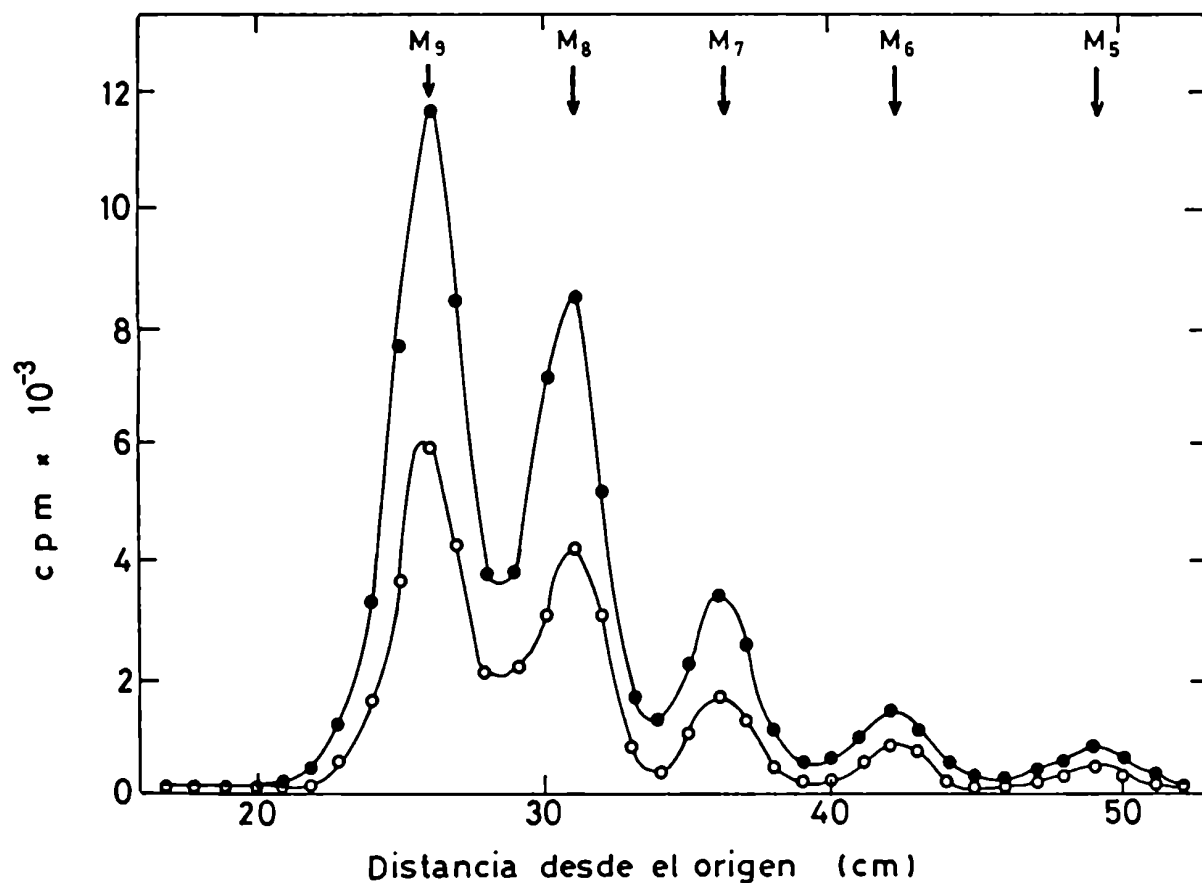


Fig. 3-8: Análisis de los  $^{14}\text{C}$ -oligosacáridos sensibles a Endo-H.

El material del pico con movilidad nula de la electroforesis mostrada en la Fig. 3-7 se eluyó del papel y sometió a cromatografía en papel durante 72 h en solvente A. ●--●, oligosacáridos provenientes de animales intactos; ○--○, oligosacáridos provenientes de animales castrados. Standards: como en la Fig. 3-5.

del átomo de C en posición 2, (97). Además, si bien los oligosacáridos unidos O-glicosídicamente pueden contener fucosa, generalmente carecen de manosa (97), por lo que (2-<sup>3</sup>H)manosa constituye un excelente marcador para aislar oligosacáridos unidos a asparagina. Por otra parte, este precursor permite la presencia de glucosa en concentraciones fisiológicas durante las incubaciones pues no existe dilución de marca, y así se evitan problemas ocasionados por ayuno de glucosa, como se observó con otro tipo de células (87).

En este caso, sólo se trabajó con cortes de tejido de animales intactos, pues ya se demostró la influencia androgénica utilizando (<sup>14</sup>C)glucosa como precursor.

#### 3.1.3.2.1. Dol-PP-oligosacáridos

El análisis cromatográfico de los <sup>3</sup>H-oligosacáridos purificados previamente unidos a Dol-PP revela la presencia de las especies G<sub>3</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>9</sub>, M<sub>8</sub>, M<sub>7</sub>, M<sub>6</sub> y M<sub>5</sub> (Fig. 3-9), a diferencia de los <sup>14</sup>C-oligosacáridos previamente unidos a lípido, de los cuales la especie con 5 unidades de manosa resultó indetectable (Fig. 3-5).

#### 3.1.3.2.2. Oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteína

De manera análoga a lo realizado con (<sup>14</sup>C)glucosa como precursor, se aisló una fracción denominada "glicopéptidos purificados" como resultado de incubaciones con (2-<sup>3</sup>H) manosa, con la ventaja de que en este caso dicha fracción carece de marca en péptidos no glicosilados. En esta instancia, teniendo como objetivo purificar glicopéptidos conteniendo solamente oligo-

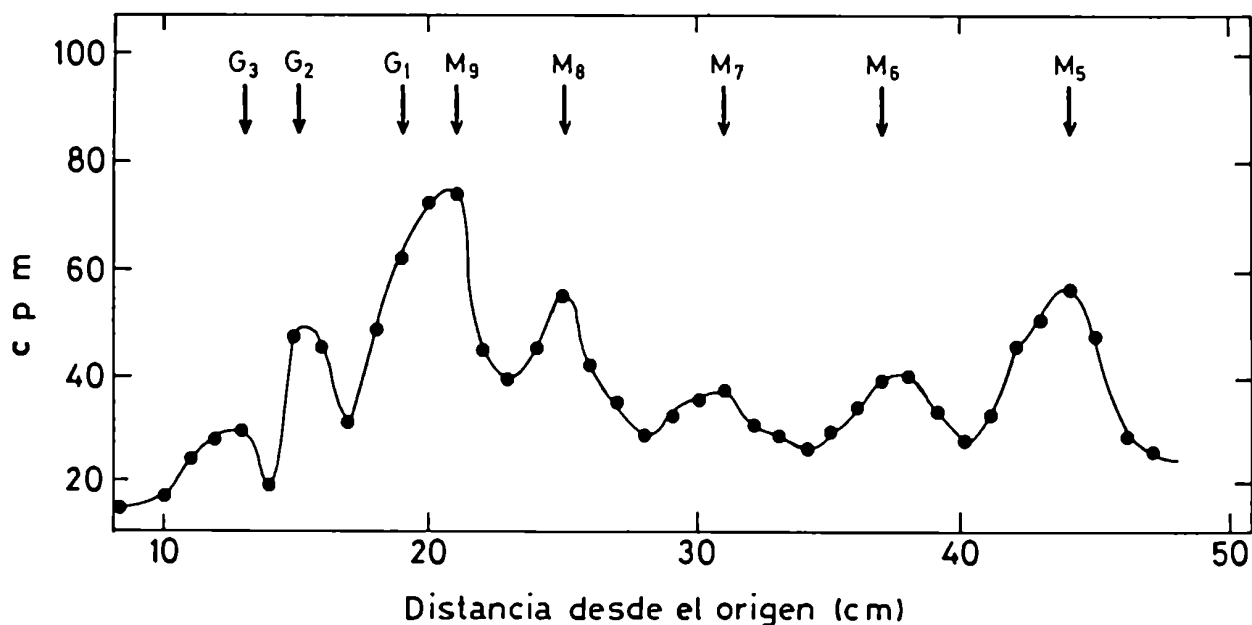


Fig. 3-9:  $^3\text{H}$ -oligosacáridos previamente unidos a Dol-PP.

Aproximadamente 100 mg de cabezas de epidídimo distribuidas en 11 cavidades de una placa "multiwell" se incubaron con (2- $^3\text{H}$ )manosa. Los oligosacáridos fueron liberados de Dol-PP, aislados como se detalla en 2.9.1 y luego de ser tratados con Endo-H fueron cromatografiados en papel durante 72 h en solvente A.

Standards: como en la Fig. 3-5.

sacáridos unidos N-glicosídicamente, el tejido precipitado y lavado luego de la incubación fue sometido a un tratamiento alcalino suave, que de acuerdo a la bibliografía (103) permite romper selectivamente la mayoría de las uniones O-glicosídicae de modo de liberar de la proteína a los oligosacáridos unidos a serina y treonina. Estos últimos pueden estar marcados radioactivamente, pero al haber sido liberados no son precipitables por TCA junto con el material proteico. Por lo tanto, luego del tratamiento alcalino, se precipitó con TCA, resultando un sobrenadante (denominado fracción "A") y un precipitado (denominado fracción "B"). "B" fue tratado exhaustivamente con proteasa y se cuantificó la radioactividad presente en la fracción soluble (llamada "C") y en la insoluble (llamada "D") originadas por un segundo tratamiento precipitante con TCA. Los resultados están presentados en la Tabla 3-VI. "A" corresponde a los oligosacáridos O-unidos a serina y treonina, presumiblemente marcados en fucosa; "B" corresponde a N-glicoproteínas totales; "C" está formado por N-glicopéptidos totales; "D" no se analizó y estaría presumiblemente constituido o bien por oligosacáridos de manosa y/o fucosa unidos a componentes no proteicos, o bien por N-glicoproteínas resistentes a proteasa.

Con el objeto de estudiar las estructuras de "alta manosa", la fracción "C" se analizó con respecto a su sensibilidad a Endo-H. Con tal propósito, los N-glicopéptidos de "C" se purificaron (igual que los  $^{14}\text{C}$ -glicopéptidos), trataron con Endo-H y sometieron a una electroforesis a pH ácido (Fig. 3-10) con fines separativos, obteniéndose un pico neutro (oligosacáridos sensibles a Endo-H) y una zona heterogénea cargada positivamente (glicopéptidos resistentes a Endo-H). La cuantificación de la radioac-

Tabla 3-VI: Proporción de  $^3\text{H}$ -oligosacáridos unidos O- y N-glicosídicamente.

Fracción	cpm	%
A	44.000	4,8
C	840.000	91,3
D	36.000	3,9

Cabezas de epidídimo se incubaron con (2- $^3\text{H}$ )manosa como se menciona en la Fig. 3-9. El tejido precipitado libre de Dol-PP-oligosacáridos se trató con NaOH 50 mM durante 24 h y luego con TCA 10%, rindiendo una fracción soluble identificada como "A" y una insoluble. Esta última se trató con proteasa y posteriormente con TCA 10% resultando en una fracción soluble ("C") y en otra insoluble ("D").

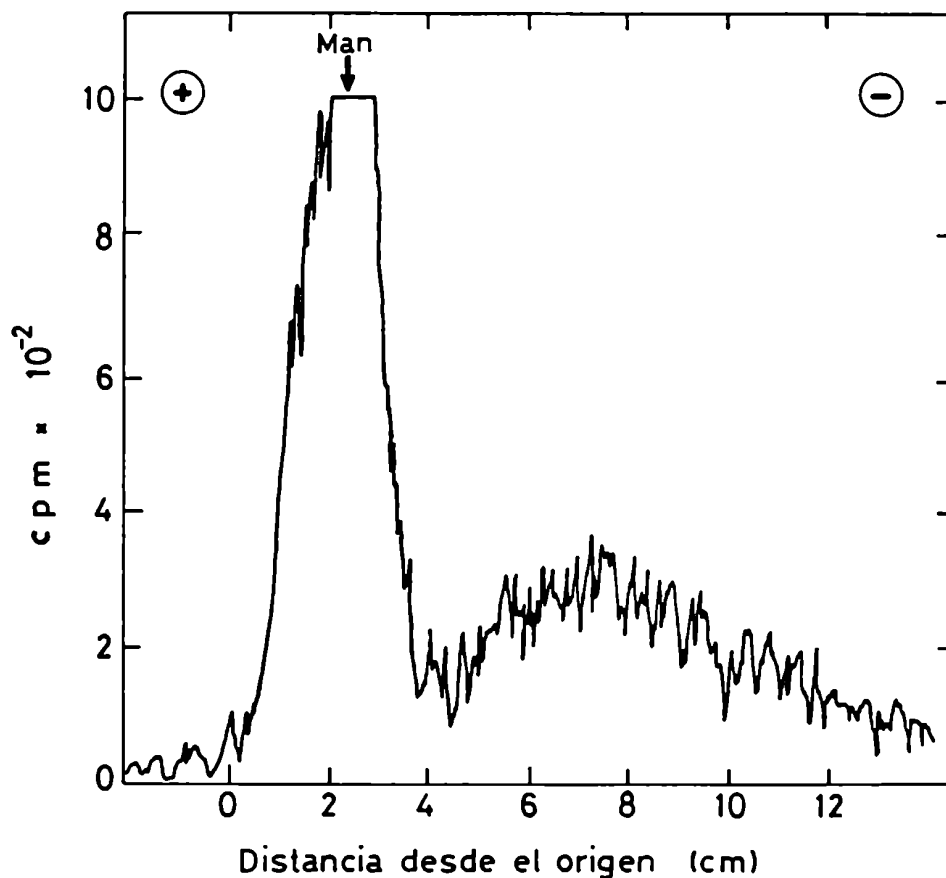


Fig. 3-10: Sensibilidad a Endo-H de los  $^3\text{H}$ -N-glicopéptidos purificados.

La mezcla de N-glicopéptidos purificados se obtuvo a partir de las mismas incubaciones con (2- $^3\text{H}$ )manosa que para aislar los Dol-PP-oligosacáridos, mediante la metodología explicada en 2.9.2. Dichos N-glicopéptidos purificados se sometieron a tratamiento con Endo-H y posterior electroforesis en papel a pH 2 durante 5 h.

La flecha indica la posición de manosa como indicador de electroneutralidad.

tividad de ambas zonas resultó en los datos que se muestran en la Tabla 3-VII. En este caso, dado que el material sometido a la enzima estaba formado exclusivamente por N-glicopéptidos totales, la proporción de oligosacáridos de "alta manosa" y "complejos" está dada directamente por las cantidades relativas de material sensible y resistente a Endo-H, es decir, 93 y 7%, respectivamente.

La secuencia de las etapas realizadas está resumida en el esquema de la Fig. 3-11.

A fin de analizar las estructuras de "alta manosa" presentes en la fracción sensible a Endo-H, ésta última fue sometida a cromatografía en papel (Fig. 3-12). El cromatograma demuestra la presencia de las especies manosiladas tal como se encontró habiendo incubado con ( $^{14}\text{C}$ )glucosa, pero con otras abundancias relativas. Se observa una mayor relación  $\text{M}_8/\text{M}_9$  y una mayor proporción de las especies más pequeñas  $\text{M}_6$  y  $\text{M}_5$ .

A manera de resumen a nivel cuantitativo, en la Tabla 3-VIII se indican las proporciones de cada especie oligosacáridica de "alta manosa" deducidas de los cromatogramas correspondientes obtenidos como resultado de incubaciones con glucosa y manosa radioactivas. Más adelante, en la "Discusión", se verá la significación de las diferentes abundancias relativas halladas empleando uno u otro sistema de marcación.

### 3.2. Aislamiento y caracterización de glicoproteínas secretorias

Dado que durante la circulación de los espermatozoides por el lumen del epidídimo, éstos se tornan aptos para la fecundación (7), se dirigió la atención hacia sustancias secretadas al lumen por las células epididimarias,



Tabla 3-VII: Proporción de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente sensibles y resistentes a Endo-H.

	cpm	%
oligosacáridos sensibles a Endo-H	160.000	93,2
glicopéptidos resistentes a Endo-H	11.600	6,8

El pico neutro (sensible a Endo-H) y la zona de carga positiva (resistente a Endo-H) obtenidos en la electroforesis de la Fig. 3-10 se cortaron del papel para la cuantificación exacta de su radioactividad por centelleo líquido.

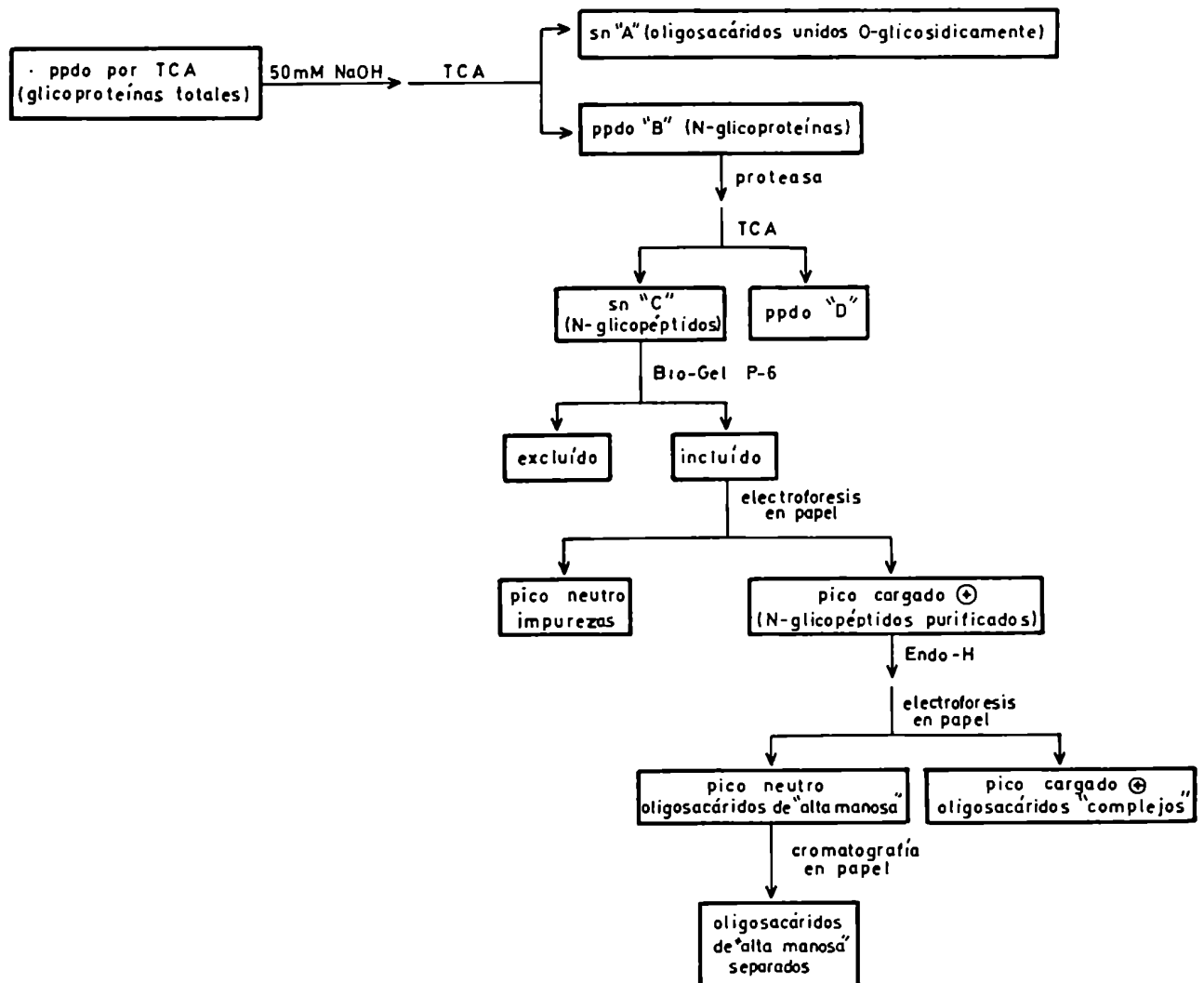


Fig. 3-11: Etapas realizadas para la obtención de  $^3\text{H}$ -oligosacáridos de "alta manosa" previamente unidos a proteína.

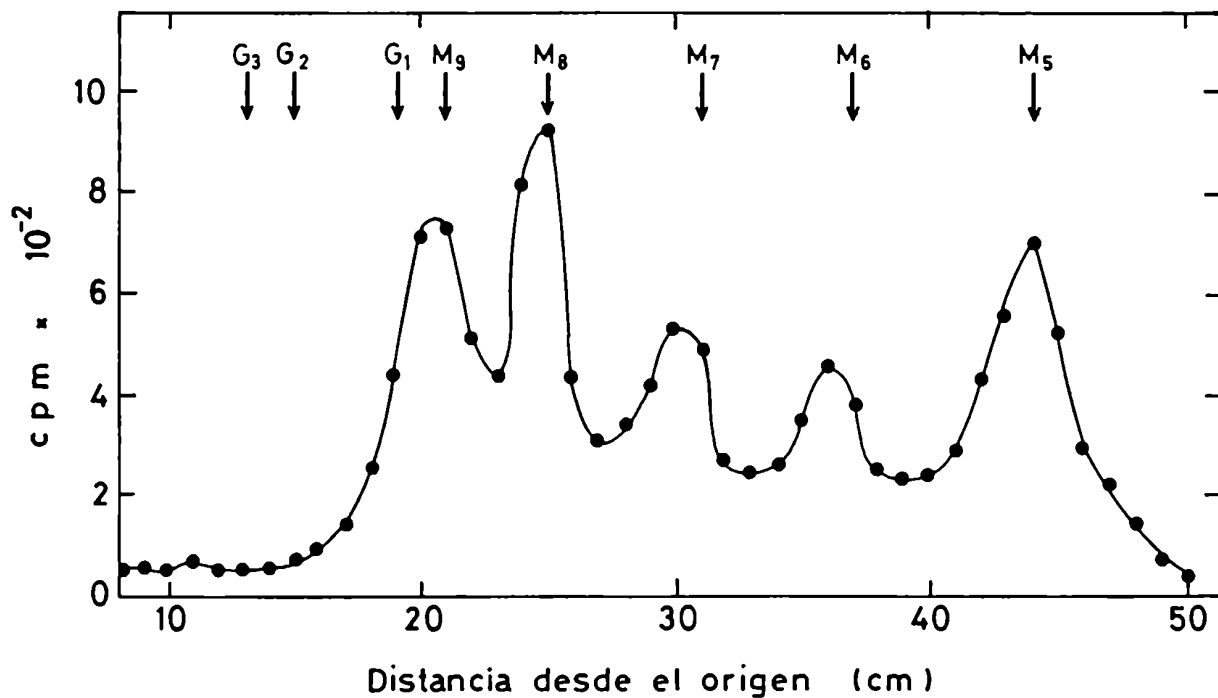


Fig. 3-12: Análisis de los <sup>3</sup>H-oligosacáridos sensibles a Endo-H.

El material del pico que no migró en la electroforesis de la Fig. 3-10 se eluyó del papel y luego se cromatografió en papel durante 72 h en solvente A. Standards: como en la Fig. 3-5.

Tabla 3-VIII: Proporciones de especies oligosacáridicas de "alta manosa".

incubación de tejido con especies	oligosacáridos unidos a lípido (%)		oligosacáridos unidos a proteína (%)	
	( <sup>14</sup> C)glucosa	(2- <sup>3</sup> H)manosa	( <sup>14</sup> C)glucosa	(2- <sup>3</sup> H)manosa
M <sub>5</sub>	0,0	21,0	3,8	26,2
M <sub>6</sub>	7,3	10,9	6,3	14,7
M <sub>7</sub>	8,6	9,4	12,5	17,4
M <sub>8</sub>	19,4	15,3	30,4	18,9
M <sub>9</sub>	55,4	30,9	47,0	22,8
G <sub>1</sub>	0,0	0,0	0,0	0,0
G <sub>2</sub>	6,5	9,9	0,0	0,0
G <sub>3</sub>	2,8	2,5	0,0	0,0

Los valores se calcularon en base a las áreas bajo cada pico en los correspondientes cromatogramas: para <sup>14</sup>C-oligosacáridos unidos a lípido, el de la Fig. 3-5; para <sup>3</sup>H-oligosacáridos unidos a lípido, el de la Fig. 3-9; para <sup>14</sup>C-oligosacáridos unidos a proteína, de la Fig. 3-8; y para <sup>3</sup>H-oligosacáridos unidos a proteína, de la Fig. 3-12.

lugar éste donde podrían interaccionar con los espermatozoides. Por otra parte, una activa maquinaria N-glicosilante en epidídimo es razonable suponer por el alto contenido de dolicol en este órgano (119), sumado a la presencia de enzimas del ciclo del dolicol y la alta proporción de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente demostradas en los resultados precedentemente presentados.

Asociando lo recientemente expuesto, se planeó la búsqueda de glicoproteínas secretorias del tipo asparagina, para su caracterización tanto del punto de vista estructural como funcional.

### 3.2.1. Cinética de incorporación de (2-<sup>3</sup>H)manosa a cortes de tejido

Dadas las ventajas de (2-<sup>3</sup>H)manosa como trazador de N-glicoproteínas (ver Sección 3.1.3.2.) se continuó utilizándolo en las incubaciones de tejido, con el fin de aislar N-glicoproteínas secretorias marcadas biosintéticamente. En tal sentido, había antecedentes alentadores (16). Para poner a punto las condiciones de incubación, se determinó la cinética de incorporación de marca en proteína de tejido (Fig. 3-13A) y en proteína liberada al medio (Fig. 3-13B). En este estado de las investigaciones, se supuso que las proteínas halladas en el medio extracelular eran secretadas por el tejido. Más adelante, en la "Discusión", se profundizará en la interpretación de resultados experimentales que convalidan dicha suposición.

Los resultados de la Fig. 3-13 indican que después de un período "lag" de 2 horas, se obtuvo una incorporación lineal hasta las 5 horas. En todos los experimentos siguientes, se eligió dicho tiempo para las incubaciones standard, al cabo del cual la marca incorporada en proteína dentro del tejido

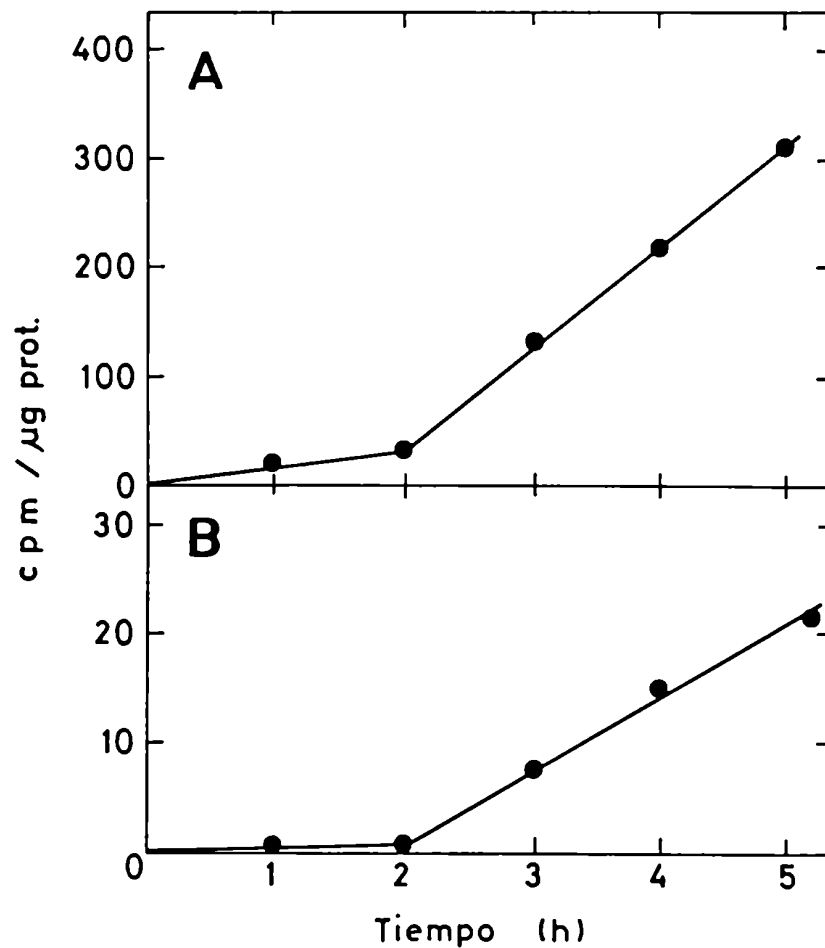


Fig. 3-13: Cinética de incorporación de (2-<sup>3</sup>H)manosa en glicoproteína.

Cortes de tejido se incubaron con 10  $\mu$ Ci de (2-<sup>3</sup>H)manosa como está indicado en 2.6.3. y a distintos tiempos el contenido de dos cavidades de la placa "multiwell" se procesó como fue explicado en 2.7.1 y 2.7.2. A, marca incorporada en proteína del tejido; B, marca incorporada a proteína liberada al medio.

fue aproximadamente 1% de la marca original suministrada, y la marca en proteína secretada fue alrededor del 10% de la incorporada a tejido, es decir, 0,1% de la originalmente presente.

En todos los experimentos de este tipo, se comprobó que la oferta de (2-<sup>3</sup>H)manosa al tejido se mantenía prácticamente constante a lo largo de la incubación hasta 5 h, es decir que el consumo de precursor radioactivo era despreciable con respecto a su concentración presente en el medio.

Otros trabajos realizados, extremando las precauciones de esterilidad, demostraron que la incorporación de (2-<sup>3</sup>H)manosa en glicoproteína intra y extracelular fue lineal hasta las 24 h de incubación (María J. Amoroso, comunicación personal).

### 3.2.2. Inhibición por tunicamicina de la incorporación de (2-<sup>3</sup>H)manosa en glicoproteína

Con el objeto de confirmar la naturaleza N-glicosídica del 95% de las uniones entre <sup>3</sup>H-azúcares y proteína intracelular (ver Tabla 3-VI), se realizaron incubaciones en presencia de tunicamicina (TM), que como ya se vio en "Introducción", es un inhibidor específico de la N-glicosilación. Además, se pensó que un efecto de este inhibidor sobre incorporación de manosa marcada en glicoproteína extracelular daría información preliminar acerca de la existencia de N-glicoproteínas secretorias, ya que hasta lo expuesto aquí, la marca en glicoproteína secretada (Fig. 3-13B) podría ser debida a fucosa formando parte de O-glicoproteínas.

En la Tabla 3-IX se muestran los resultados correspondientes al efecto de TM sobre la formación de glicoproteínas marcadas con manosa. Para visuali-

Tabla 3-IX: Efecto de tunicamicina sobre la incorporación de (2-<sup>3</sup>H)manosa en glicoproteína intracelular y extracelular.

	TM	<sup>3</sup> H (cpm)	<sup>14</sup> C (cpm)	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C	inhibición de <sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C %
intracelular	-	562.702	470.838	1,195	33
	+	467.165	580.410	0,805	
extracelular	-	33.402	95.917	0,348	58
	+	14.280	97.868	0,146	

Tejido epididimario fue incubado con (2-<sup>3</sup>H)manosa y <sup>14</sup>C-aminoácidos simultáneamente durante 5 h como está indicado en 2.6.3. en ausencia (-) o presencia (+) de 10 µg/ml de TM. La radioactividad en proteína fue cuantificada igual que en el experimento resumido en la Fig. 3-13.



zar el efecto indeseable que podría tener TM sobre la síntesis de polipéptidos, se realizaron incubaciones en presencia de  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos, además de (2- $^3\text{H}$ )manosa en forma simultánea. Se halló un 33% de inhibición en la incorporación de (2- $^3\text{H}$ )manosa en la fracción intracelular (valor más bajo que el esperado de 95%) y un 58% en la fracción extracelular, sugiriendo una diferente relación N-glicoproteínas/O-glicoproteínas entre las de localización intracelular y las normalmente destinadas a secreción. También se observa que TM no afectó la síntesis de proteína. En otros experimentos, con concentraciones mayores de TM, se consiguieron mayores grados de inhibición de la N-glicosilación, pero concomitantemente hubo efectos inespecíficos de inhibición sobre la síntesis de proteínas totales.

### 3.2.3. Identificación de N-glicoproteínas secretadas

Los sobrenadantes resultantes de las incubaciones realizadas con (2- $^3\text{H}$ )manosa se pasaron por una columna de Bio-Gel P-6 para eliminar el exceso de manosa no incorporada. Con el objeto de separar las glicoproteínas marcadas de acuerdo a su tamaño (aún desconocido en esta etapa del trabajo), el material excluido de Bio-Gel P-6 fue cromatografiado por medio de una columna de Bio-Gel A 1.5m, la cual presenta un ancho rango de operación, hasta proteínas de peso molecular igual a 1.500.000. Sorpresivamente, un único pico de radioactividad se eluyó 6 ml después del standard de fosfatasa alcalina (peso molecular=78.000), muy cerca del standard de Citocromo c (peso molecular=12.400) (Fig. 3-14), sugiriendo una cierta homogeneidad de tamaño molecular por lo menos en las glicoproteínas secretadas mayoritarias.

También se observó que la marca incorporada en este pico disminuyó un

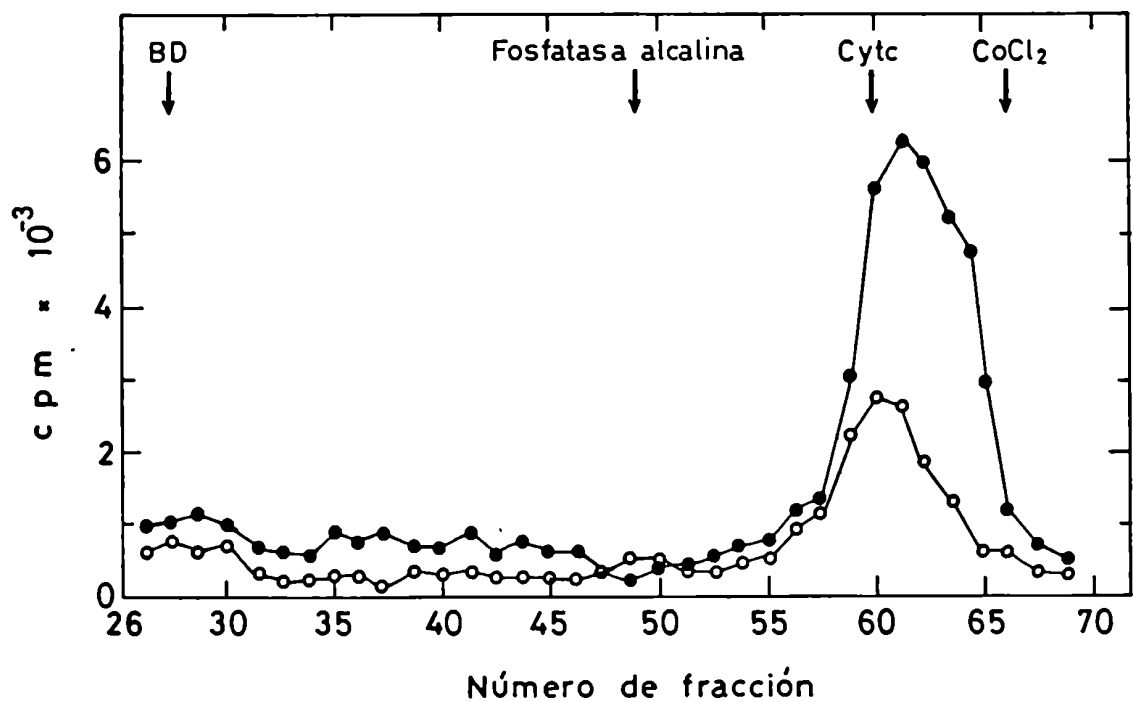


Fig. 3-14: Cromatografía de <sup>3</sup>H-glicoproteínas secretadas en Bio-Gel A 1.5m.

Sobrenadantes de incubaciones de tejido con (2-<sup>3</sup>H)manosa, en ausencia (●) o presencia (○) de 10 µg/ml de TM, fueron reunidos (de dos cavidades de una placa "multiwell") y pasados a través de Bio-Gel P6. El material excluido fue pasado a través de una columna de Bio-Gel A 1.5m como está indicado en 2.10.1.1. Las flechas indican las posiciones halladas para los marcadores: BD, Blue Dextran; Cyt c, citocromo c.

65% cuando TM había sido incluida en las incubaciones, consistente con lo mostrado en la Tabla 3-IX, línea 4, ya que se arrastró una menor cantidad de marca sembrada en la columna. Cuando este pico radioactivo se sometió a SDS-PAGE, un componente fue detectado por coloración de proteínas correspondiente a una masa molecular relativa de 17.000 (Fig. 3-15, carril 1). En este caso, la intensidad de la banda fue débil porque se sembró aproximadamente 1 ug de proteína, cerca del límite de detección del Coomassie Blue (112). Es obvio que no se puede concluir que hay una única proteína presente en el pico radioactivo, pero se puede afirmar que dicho pico contiene una proteína mayoritaria con una masa molecular de 17 KDa. Cuando se incluyó tunicamicina en las incubaciones, no se detectó dicha glicoproteína con Coomassie Blue (Fig. 3-15, carril 2), probablemente porque el 35-40% no inhibido por TM cayó por debajo del límite de detección del método analítico. De todos modos, este último resultado sugirió el hecho de que la proteína de 17 KDa es una N-glicoproteína. En la sección siguiente (3.2.3.1.) se describe un experimento para lograr un aumento de la sensibilidad de la detección utilizando aminoácidos radioactivos como precursores de proteínas biosintetizadas. La radioautografía del gel mostrado en la Fig. 3-15 no reveló ninguna banda radioactiva. También fue infructuosa la detección de radioactividad por métodos que consisten en contar radioactividad en trocitos cortados del gel húmedo y sumergidos en solubilizador de geles (117).

En un intento detectar radioactividad de  $^3\text{H}$  en los geles, se realizó una PAGE en condiciones desnaturizantes, es decir con SDS, del medio total post-incubación y posterior exposición prolongada a placas autorradiográficas (Fig. 3-16). Se observó una banda predominante otra vez correspondiente a

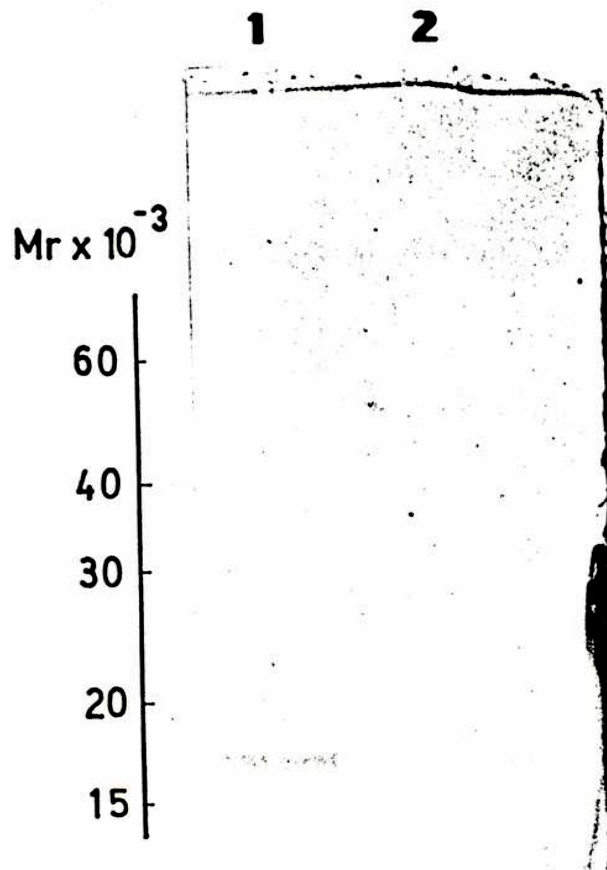


Fig. 3-15: Detección de componentes proteicos luego de SDS-PAGE de la fracción enriquecida en  $^3H$ -glicoproteínas secretadas proveniente de Bio-Gel A 1.5m.

Las fracciones 58-65 de la corrida en Bio-Gel A 1.5m (Fig. 3-14) fueron reunidas, concentradas y sometidas a SDS-PAGE. Las incubaciones de tejido con ( $2-^3H$ )manosa habían sido realizadas en ausencia (carril 1) o en presencia (carril 2) de 10  $\mu$ g/ml de TM. El gel fue teñido con Coomassie Blue.

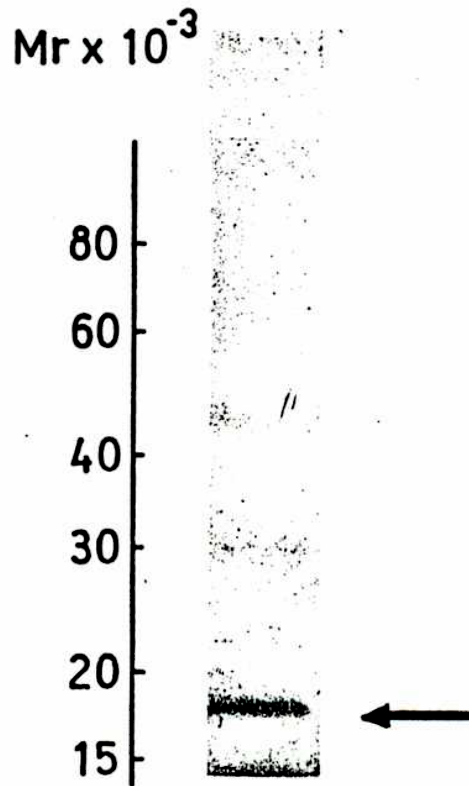


Fig. 3-16: Detección de radioactividad luego de SDS-PAGE de  $^3H$ -glicoproteínas secretadas totales.

Se efectuó SDS-PAGE de medio total (20.000 cpm en glicoproteína) proveniente de incubaciones de tejido con  $(2-^3H)$ manosa. La figura muestra la radioautografía del gel luego de 90 días de exposición. La flecha indica la posición correspondiente a 17 KDa.

17 KDa. A esta glicoproteína se la referirá de aquí en adelante como GP17. También se observan bandas muy débilmente marcadas en zonas de mayor peso molecular, que no alcanzaron a dar picos netos en Bio-Gel A 1.5m probablemente debido a su baja radioactividad. Es claro, entonces, que la radioactividad de  $^3\text{H}$  en el pico de Bio-Gel A 1.5m se debe casi exclusivamente a GP17.

### 3.2.3.1. Biosíntesis del esqueleto polipeptídico de GP17

Para confirmar que la porción proteica de GP17 se biosintetiza durante las incubaciones, se llevó a cabo SDS-PAGE de glicoproteínas secretadas provenientes de incubaciones con aminoácidos marcados radioactivamente y posterior radioautografía (Fig. 3-17), con lo cual se aumentó la sensibilidad de detección de proteínas, con respecto al método de Coomassie Blue. Como era de esperar, se observó, entre otras, una banda principal correspondiente a 17 KDa, lo cual confirma lo propuesto. Dicha banda disminuyó en intensidad cuando en las incubaciones se había incluido TM (Fig. 3-17, carril 2), reafirmando el hecho de que GP17 es una N-glicoproteína.

En incubaciones con doble marca, utilizando  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos y ( $2\text{-}^3\text{H}$ )manosa, el perfil cromatográfico de los sobrenadantes en Bio-Gel A 1.5m resultó como se observa en la Fig. 3-18. El pico con doble marca se sometió a SDS-PAGE, cuya radioautografía en condiciones de detectar sólo  $^{14}\text{C}$  (30 días) reveló una banda intensa correspondiente a 17 KDa, como era de esperar, además de otras bandas menos intensas (Fig. 3-19).

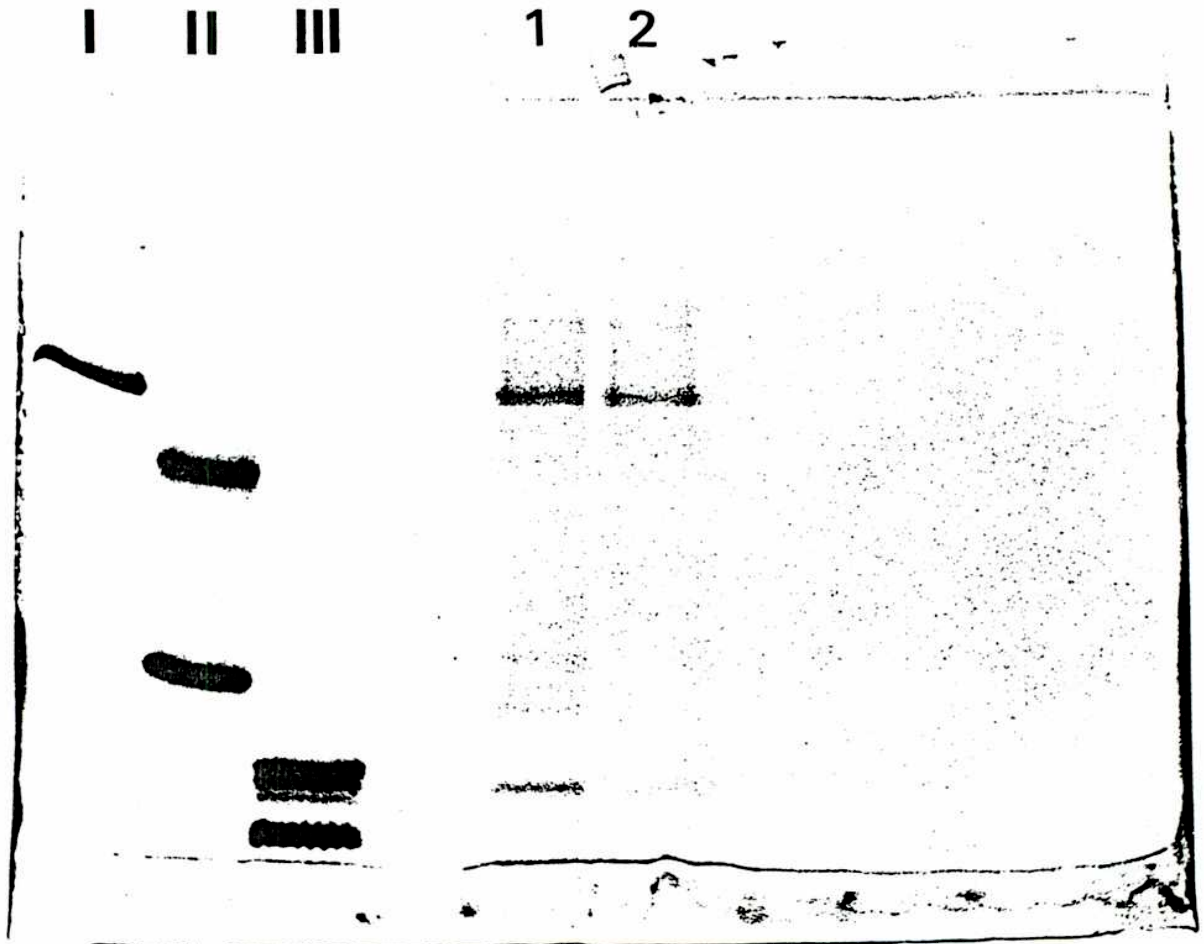


Fig. 3-17: SDS-PAGE de  $^{14}\text{C}$ -proteínas secretadas totales.

Los medios resultantes de incubaciones de tejido con  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos fueron sometidos a SDS-PAGE. La figura muestra la radioautografía del gel luego de 7 días de exposición. Carril 1, material proveniente de incubaciones en ausencia de TM; carril 2, material proveniente de incubaciones en presencia de  $10\ \mu\text{g/ml}$  de TM. A la izquierda se muestran las posiciones de los marcadores de peso molecular: carril I, fosforilasa B y BSA; carril II, ovoalbúmina y tripsinógeno; carril III,  $\beta$ -lactoglobulina y lisozima. La flecha indica la posición correspondiente a 17 KDa.

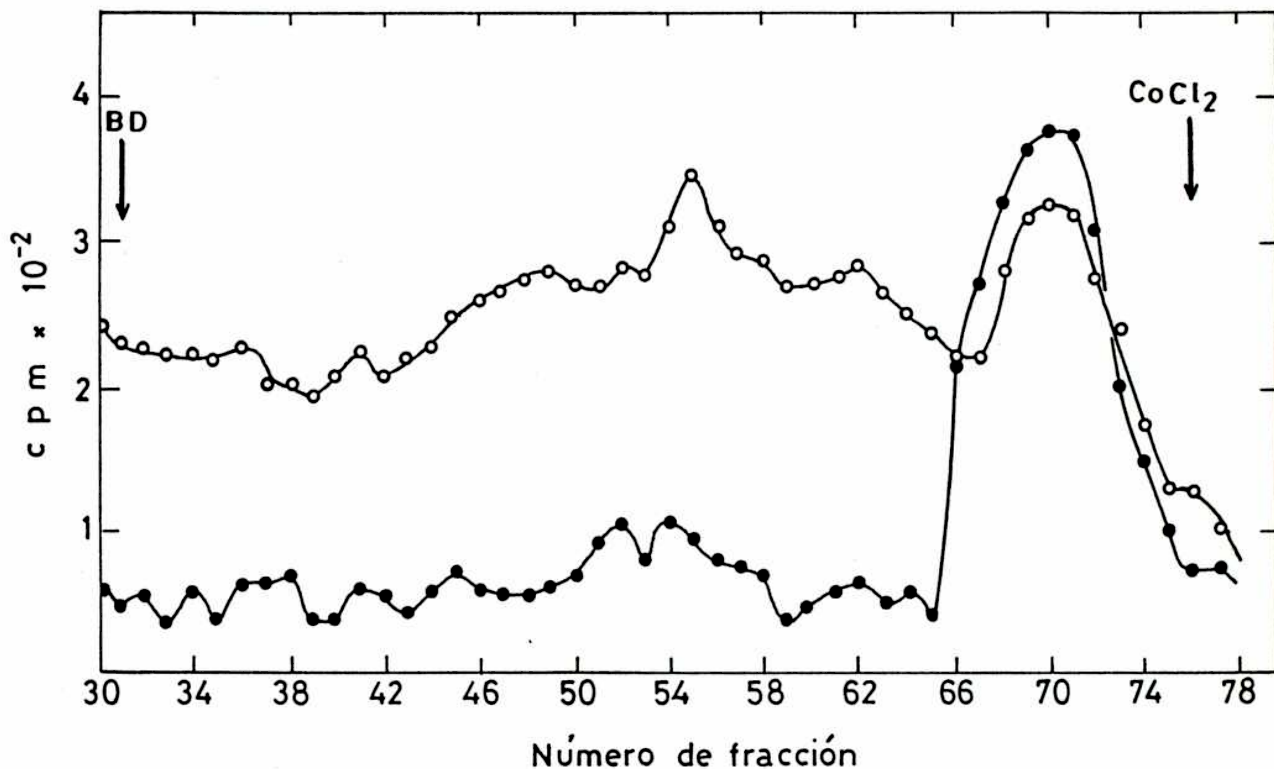


Fig. 3-18: Comportamiento en Bio-Gel A 1.5m de proteínas secretadas marcadas con  $(2\text{-}^3\text{H})$ manosa y  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos.

Sobrenadantes de incubaciones de tejido realizadas en presencia simultánea de  $(2\text{-}^3\text{H})$ manosa y  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos fueron pasados a través de Bio-Gel P6 como se indica en 2.10.1.1. El material excluido fue cromatografiado en una columna de Bio-Gel A 1.5m. ●--●, radioactividad debida a  $^3\text{H}$ ; ○--○, radioactividad debida a  $^{14}\text{C}$ . BD, Blue Dextran.



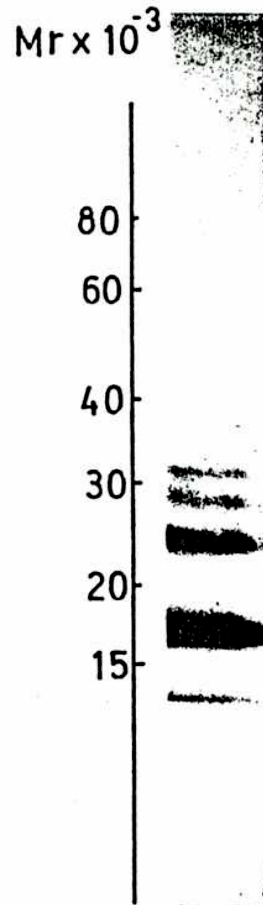


Fig. 3-19: SDS-PAGE del pico doblemente marcado con <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C proveniente de Bio-Gel A 1.5m.

Las fracciones 65-74 obtenidas en la cromatografía en columna de Bio-Gel A 1.5m mostrada en la Fig. 3-18 se reunieron, concentraron y sometieron a SDS-PAGE y radioautografía (30 días de exposición).

#### 3.2.4. Naturaleza ácida de GP17

En este estadio de las investigaciones se utilizó el pico de  $^3\text{H}$  indicado en la Fig. 3-14 como fuente de GP17 marcada porque, aunque ese pico contiene otras proteínas (Fig. 3-19), en éstas no se detectó marca apreciable de  $^3\text{H}$  (Fig. 3-16). En otras palabras, si se tienen en cuenta sólo glicoproteínas detectables por radioactividad de  $^3\text{H}$ , ( $^3\text{H}$ )GP7 está relativamente pura según SDS-PAGE monodimensional.

GP17 marcada biosintéticamente con (2- $^3\text{H}$ )manosa, migró predominantemente al ánodo como una zona heterogénea en electroforesis en papel a pH 2 (Fig. 3-20, pico I), indicando una carga neta negativa aun a dicho pH. Un pequeño pico migró hacia el cátodo (pico II, no analizado debido a su baja radioactividad) y una cierta cantidad de material radioactivo permaneció en el origen.

##### 3.2.4.1. Presencia de fosfatos

Buscando el grupo químico responsable de la carga negativa, se pensó en primer lugar en grupos fosfato esterificados, ya que forman parte de muchas proteínas, ya sea unidos a aminoácidos -como serina, treonina y en pequeña proporción tirosina (51)-, o bien unidos a oligosacáridos (106). La acidez propia de grupos fosfatos esterificados justificaría la existencia de cargas negativas a pH 2. Por ejemplo, el  $\text{pK}_{a1}$  de fosfoserina es igual a 2,6 y los  $\text{pK}_{a1}$  de fosfoazúcares oscilan en valores cercanos a 1,0 (28).

Otra posibilidad era la presencia de grupos sulfato, también ácidos,

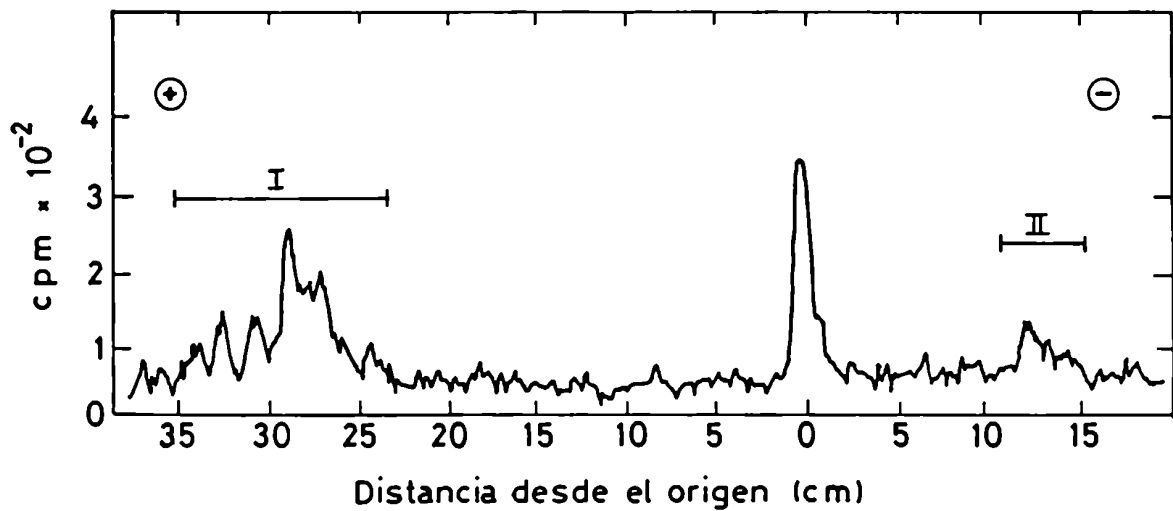


Fig. 3-20: Comportamiento electroforético en papel de <sup>3</sup>H)GP17 en medio ácido.

(<sup>3</sup>H)GP17 (pico de la Fig. 3-14 obtenido sin TM) fue sometido a electroforesis en papel a pH 2 como está detallado en 2.8.2. durante 15 h. La tira de papel fue pasada por un radiocromatógrafo, cuyo registro gráfico se muestra.

los cuales se sabe que modifican a ciertas proteínas (125).

La presencia de ácido siálico, componente frecuente de glicoproteínas, se descartó porque sería neutralizado a pH 2; aunque el pka de este monosacárido es 2,6 (40) debido al grupo ceto vecino al carboxilo en la forma de cadena abierta, la forma de anillo piranósico (obligada cuando forma uniones glicosídicas en oligosacáridos de glicoproteínas) carece de grupo ceto (debido a la formación de la unión hemiacetalica) y su acidez debe ser similar a la de cualquier ácido carboxílico típico, con un pka entre 4,0 y 5,0.

Teniendo en cuenta lo anterior, se probó la acción de fosfatasa alcalina sobre el material constituyente del pico negativo y se observó la ausencia de migración en una nueva electroforesis en las mismas condiciones (Fig. 3-21). Como control, la incubación con fosfatasa alcalina inactivada por calor no produjo abolición de la movilidad. El efecto de la fosfatasa alcalina sugirió la presencia de grupos fosfato expuestos en la molécula de GP17.

Con el objeto de disponer de más evidencias de la presencia de fosfatos en GP17, se realizaron incubaciones de epidídimo utilizando  $^{32}\text{P}_i$  como precursor de fosfoproteínas secretadas marcadas biosintéticamente. Los sobrenadantes resultantes de estas incubaciones se sometieron a SDS-PAGE, cuya radioautografía mostró la mayor parte de la marca sin penetrar en el gel y varias bandas radioactivas débilmente marcadas, entre ellas una correspondiente a 17 kDa de masa molecular (Fig. 3-22).

Cuando se incubó tejido con  $^{32}\text{P}_i$  y  $(2\text{-}^3\text{H})\text{Man}$  simultáneamente, los sobrenadantes libres de exceso de precursores radioactivos se pasaron por

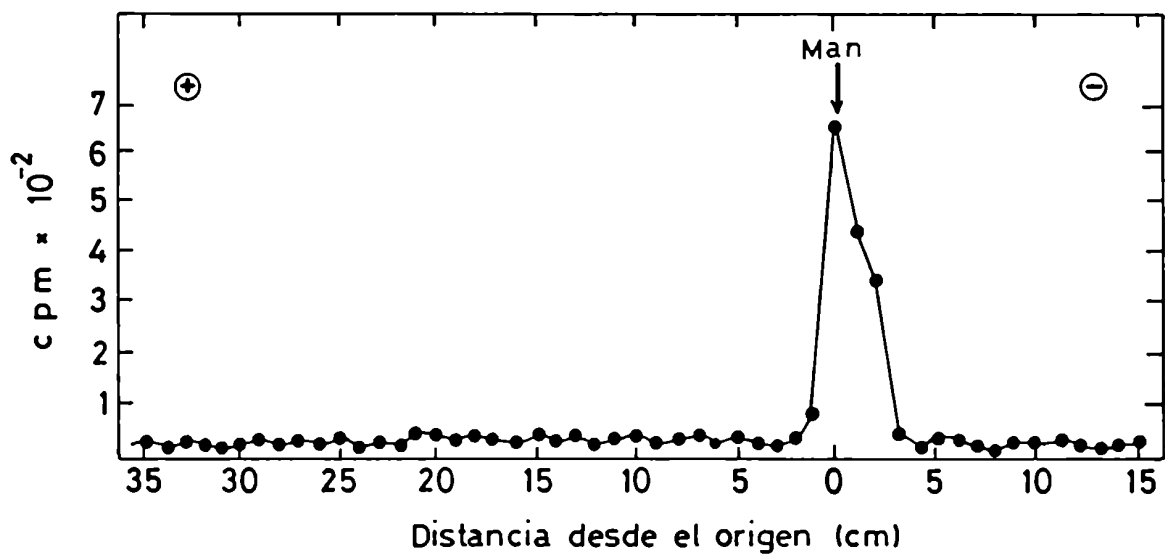


Fig. 3-21: Efecto de fosfatasa alcalina sobre el comportamiento electroforético en papel de (<sup>3</sup>H)GPI7 en medio ácido.

El pico I resultante de la electroforesis mostrada en la Fig. 3-20 fue eluido del papel, incubado con fosfatasa alcalina (ver 2.10.2.2.) y vuelto a correr electroforéticamente en las mismas condiciones. La tira de papel se cortó en bandas de 1 cm, las cuales se contaron por centelleo líquido. La flecha indica la posición de Man como indicador de electroneutralidad.

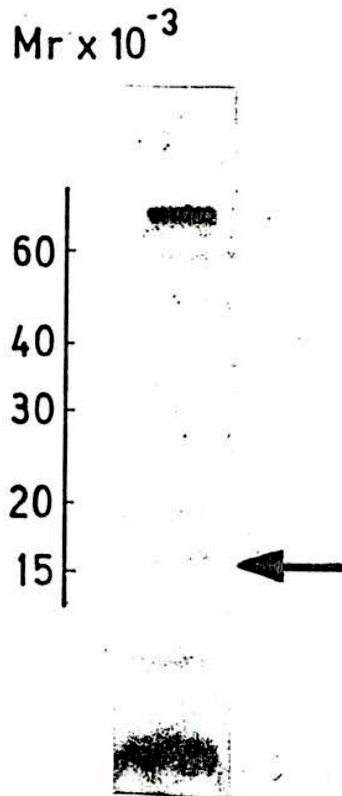


Fig. 3-22: Detección de proteínas fosforiladas liberadas al medio separadas por SDS-PAGE.

Tejido epididimario fue incubado en presencia de  $^{32}P_i$  como precursor radioactivo como se indicó en 2.6.3. Los sobrenadantes provenientes de dos cavidades de una placa "multiwell" se reunieron y pasaron por Bio-Gel P-6. Una alícuota del excluido (50.000 cpm) se corrió en SDS-PAGE, cuya radioautografía luego de 17 días de exposición se muestra en la figura. La flecha indica la posición correspondiente a 17 KDa.

Bio-Gel A 1.5m, observándose dos picos principales de  $^{32}\text{P}$ , uno excluido de la matriz y otro incluido coincidente con el único pico importante de  $^3\text{H}$  (Fig. 3-23) en la misma posición que en la cromatografía de  $(^3\text{H})\text{GP17}$  mostrada en la Fig. 3-14. Este último pico con doble marca se corrió en electroforesis en papel a pH 2 (Fig. 3-24), observándose un pico doblemente marcado que migró al ánodo, además de otro pico doblemente marcado que no migró, en forma similar que en la electroforesis en papel de  $(^3\text{H})\text{GP17}$  mostrada en la Fig. 3-20. A pesar de las limitaciones analíticas de SDS-PAGE monodimensional, filtración molecular y electroforesis en papel, los últimos datos tomados en conjunto demuestran que GP17 es una fosfoglicoproteína. Dado que se demostró que el fosfato era el responsable de la carga neta negativa de GP17, no se investigó su contenido en sulfatos.

### 3.2.5. Análisis de la porción sacarídica de GP17

#### 3.2.5.1. Sensibilidad a Endo-H

Como el tejido epididimario sintetiza una gran proporción de estructuras sacarídicas sensibles a Endo-H, de acuerdo a los datos de la Tabla 3-VII, se pensó que era probable que algunas glicoproteínas conteniendo dichas estructuras fueran destinadas a secreción; en otras palabras, era probable hallar N-glicoproteínas secretadas sensibles a Endo-H. Luego de incubar  $(^3\text{H})\text{GP17}$  (pico de la Fig. 3-14) con esta enzima, la electroforesis en papel reveló un único pico neutro (Fig. 3-25), lo cual sugirió la liberación por la enzima de oligosacáridos neutros de "alta manosa" expuestos en la molécula de GP17. Como control, la incubación con la enzima inactivada por calor no pro-

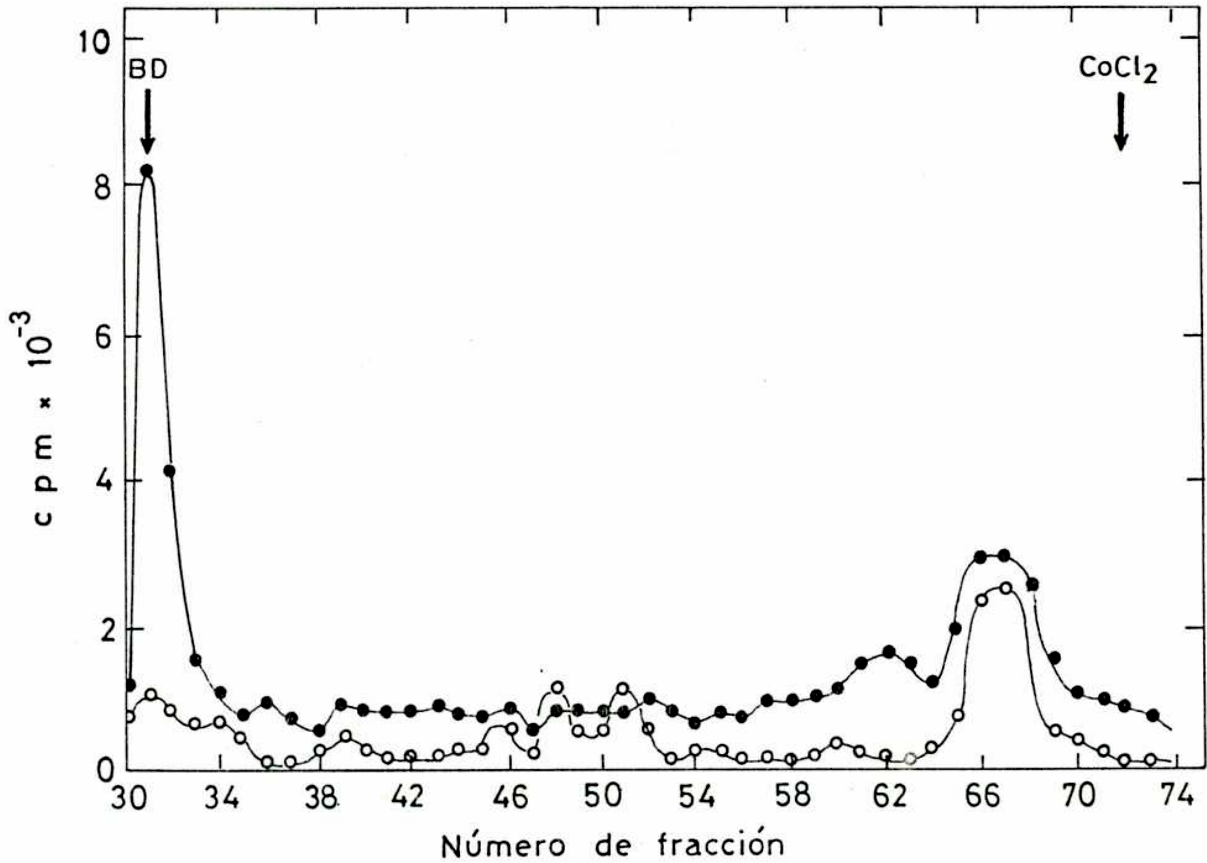


Fig. 3-23: Comportamiento en Bio-Gel A 1.5m de proteínas secretadas marcadas con (2-<sup>3</sup>H)manosa y <sup>32</sup>Pi.

Cortes de epidídimo se incubaron en presencia de (2-<sup>3</sup>H)manosa y <sup>32</sup>Pi simultáneamente. Los sobrenadantes provenientes de dos cavidades de una placa "multiwell" se reunieron y pasaron por Bio-Gel P-6. Una alícuota del excluido (50.000 cpm de <sup>32</sup>P y 15.000 cpm de <sup>3</sup>H) se pasó por una columna de Bio-Gel A 1.5m. ●--●, radioactividad debida a <sup>32</sup>P; ○--○, radioactividad debida a <sup>3</sup>H.



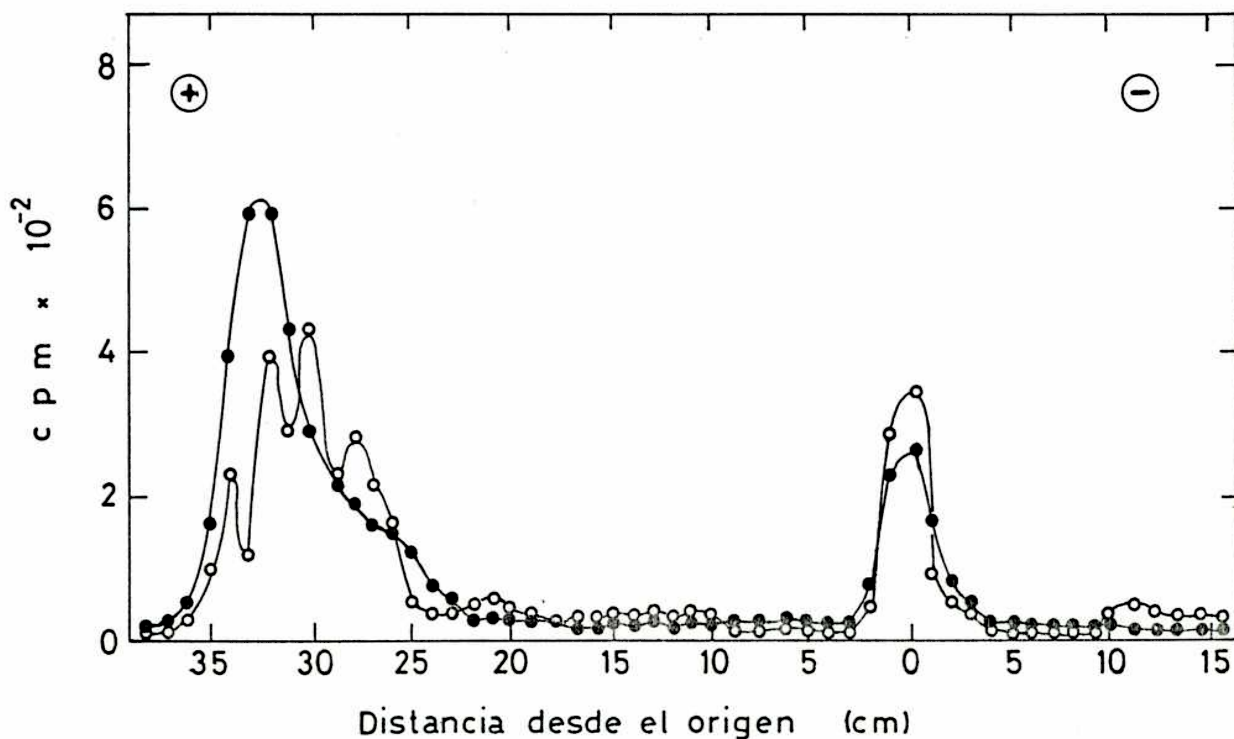


Fig. 3-24: Electroforesis en papel del pico doblemente marcado con <sup>32</sup>P y <sup>3</sup>H proveniente de Bio-Gel A 1.5m.

El pico doblemente marcado con <sup>32</sup>P y <sup>3</sup>H eluido de Bio-Gel A 1.5m (Fig. 3-23) se sometió a electroforesis en papel en idénticas condiciones para la corrida de la Fig. 3-20. La tira de papel se corrió en bandas de 1 cm para contar radioactividad por centelleo líquido. ●--●, radioactividad debida a <sup>32</sup>P; o--o, radioactividad debida a <sup>3</sup>H.

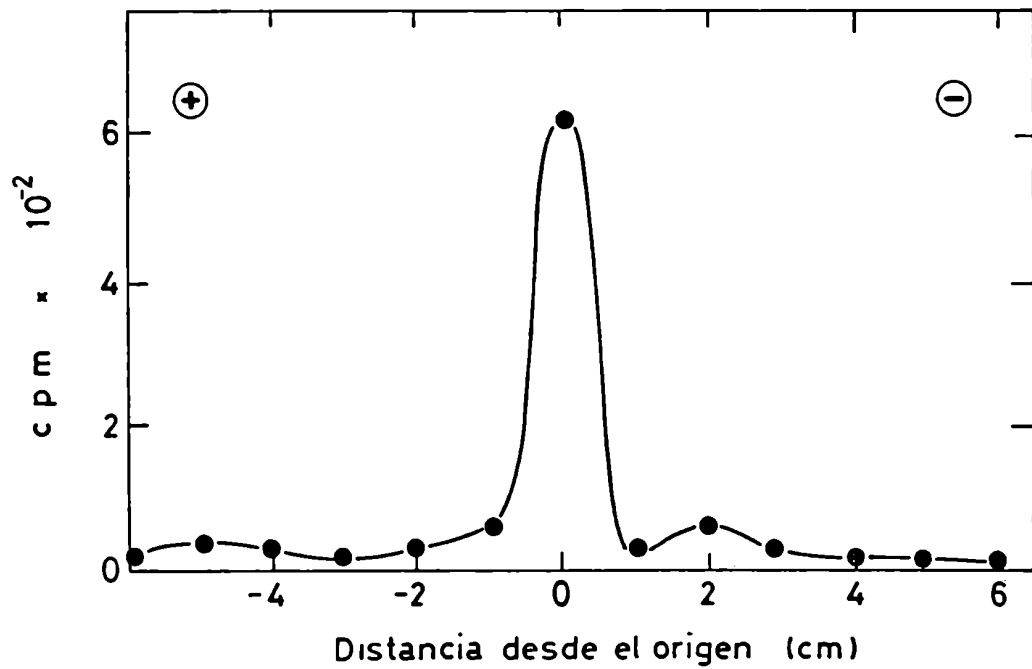


Fig. 3-25: Sensibilidad de GP17 a Endo-H.

(<sup>3</sup>H)GP17 (1.000 cpm) fue incubada con Endo-H como está detallado en 2.10.2.1. y luego sometida a electroforesis en papel como en la corrida de la Fig. 3-20. Fuera de la zona mostrada en la figura no se detectó radioactividad por encima del "background".

dujo efecto alguno.

De no haber habido efecto directo de Endo-H sobre GP17 se hubiera encarado la digestión previa de la glicoproteína con proteasas, con el objeto de obtener glicopéptidos que sirvieran como mejores sustratos a la enzima, y así probar o descartar la presencia de oligosacáridos estructuralmente sensibles pero estéricamente inaccesibles a la enzima. Debido a la observada acción directa de Endo-H sobre GP17, el pre-tratamiento con proteasas no fue necesario. La neutralidad de la porción sacarídica liberada por Endo-H descarta la presencia de fosfatos unidos al oligosacárido.

Cuando el pico doblemente marcado de la electroforesis en papel de la Fig. 3-24 se trató con Endo-H, la marca de  $^3\text{H}$  (pero no la de  $^{32}\text{P}$ ) se corrió hacia la zona neutra en una segunda electroforesis (Fig. 3-25), como era de esperar.

#### 3.2.5.2. Tamaño de la porción sacarídica

Para obtener información acerca del tamaño de los oligosacáridos previamente unidos a GP17, éstos fueron liberados por Endo-H y posteriormente sometidos a cromatografía en papel (Fig. 3-27). El cromatograma (que no mostró radioactividad en el origen, lo cual demuestra liberación total por la enzima) evidenció dos picos principales que co-migraron con los standards  $M_5$  y  $M_6$ , además de picos menores que co-migraron con los standards  $M_7$ ,  $M_8$  y  $M_9$ . Debido a la información previa en cuanto a especificidad de Endo H (103) y a estructuras de oligosacáridos de "alta manosa" en otros materiales biológicos de eucariotes (56), fue razonable suponer que los oligosacáridos aislados no sólo tenían el mismo tamaño sino también idéntica composición que

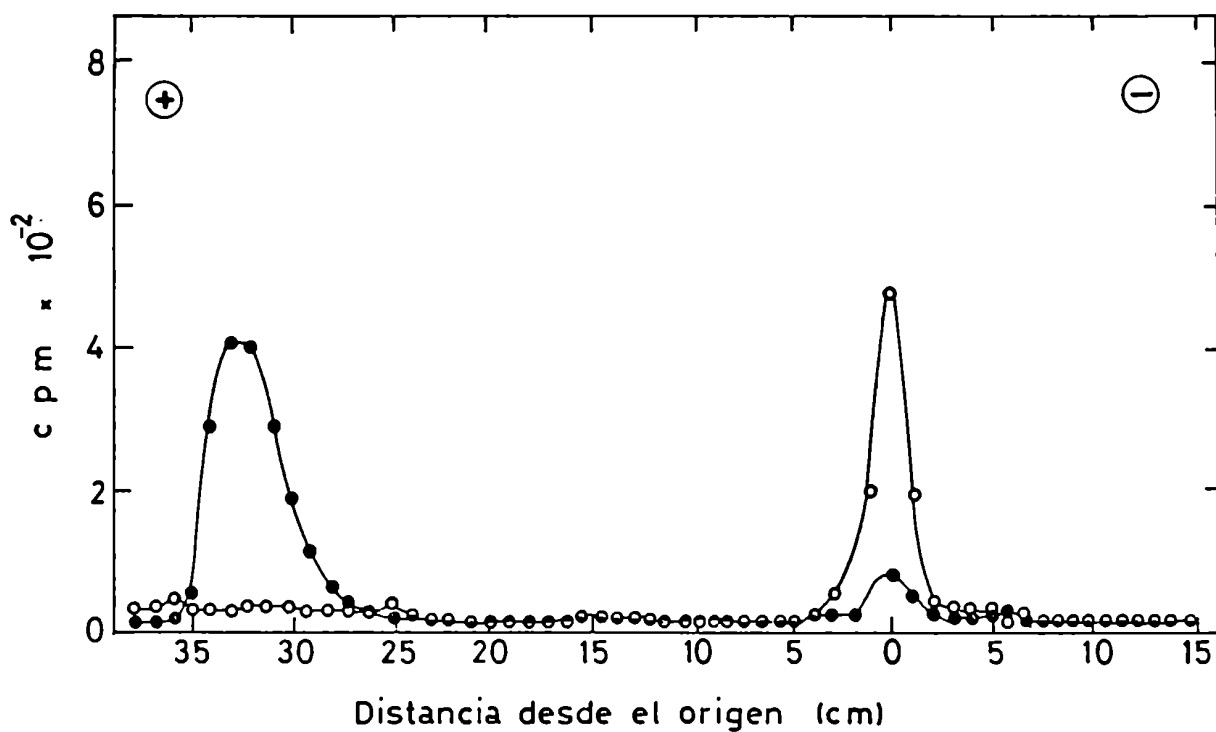


Fig. 3-26: Sensibilidad a Endo-H de  $(^{32}\text{P}, ^3\text{H})\text{GP17}$ .

El pico que migró al ánodo en la electroforesis de la Fig. 3-24 se eluyó del papel, trató con Endo-H y se volvió a correr en electroforesis en papel en las mismas condiciones. ●--●, radioactividad debida a  $^{32}\text{P}$ ; ○--○, radioactividad debida a  $^3\text{H}$ .

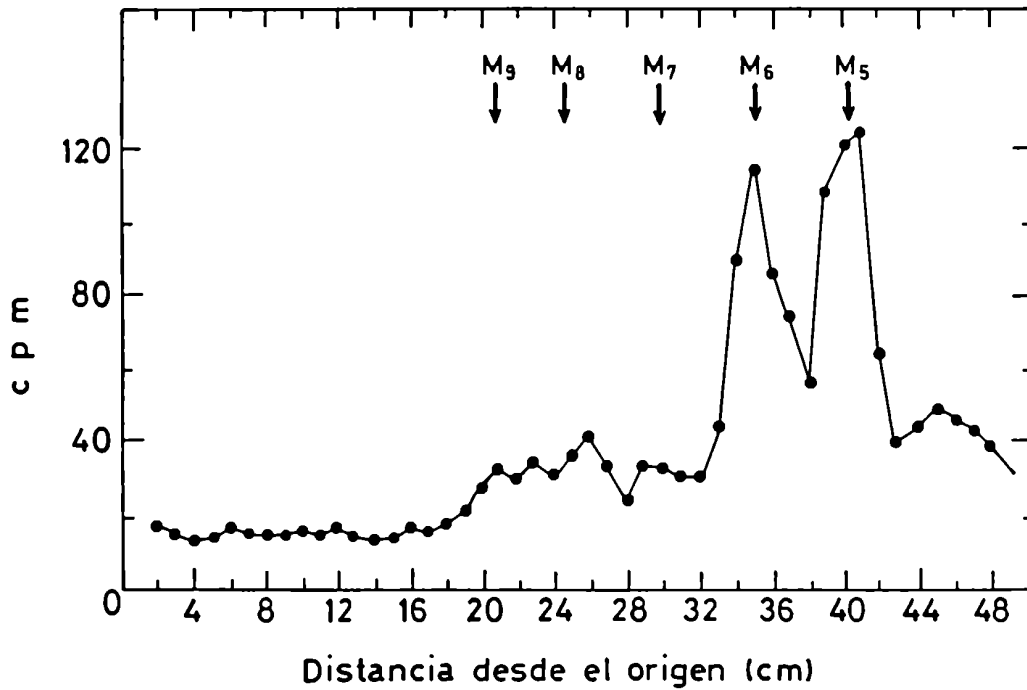


Fig. 3-27: Separación cromatográfica de los oligosacáridos de GP17 liberados por Endo-H.

El pico que no migró en la electroforesis mostrada en la Fig. 3-25 se eluyó del papel y se sometió a cromatografía en papel en solvente A durante 60 h. Las flechas indican las posiciones de migración de los oligosacáridos de "alta manosa" derivados de oviducto de gallina utilizados como standards, gentilmente cedidos por el Dr. A.J. Parodi.

los standards de alta manosa usados. De todos modos, se hicieron algunos experimentos adicionales que se muestran a continuación para confirmar la suposición.

#### 3.2.5.3. Identidad de las unidades monosacarídicas marcadas

(<sup>3</sup>H)GP17 fue precipitada por TCA y sometida a hidrólisis ácida fuerte como se detalla en 2.10.4.2. El producto de la hidrólisis se cromatografió en papel en condiciones de separar monosacáridos entre sí (Fig. 3-28). Se detectó solamente manosa marcada como monosacárido constituyente de los oligosacáridos originalmente presentes. La ausencia de fucosa está de acuerdo con las estructuras de alta manosa atribuidas a los oligosacáridos de GP17.

#### 3.2.5.4. Presencia de uniones glicosídicas $\alpha$ 1→6

Con el objeto de revelar la existencia de uniones glicosídicas  $\alpha$ 1→6, se utilizó el procedimiento de acetólisis, que provoca la ruptura preferencial de ese tipo de uniones (53), las cuales están presentes en los oligosacáridos de "alta manosa" conocidos (103). M<sub>5</sub> y M<sub>6</sub> provenientes de GP17 fueron sometidos a acetólisis como está indicado en 2.10.4.1. El cromatograma en papel del acetolizado de M<sub>5</sub> reveló un hexasacárido, un tetrasacárido y un disacárido (Fig. 3-29). Una interpretación coherente es que el hexasacárido corresponde a M<sub>5</sub> no atacado, mientras que el tetrasacárido y el disacárido corresponden a dos fragmentos previamente unidos por una unión  $\alpha$ 1→6, resultado coincidente con la estructura de M<sub>5</sub> de otras fuentes (25). La

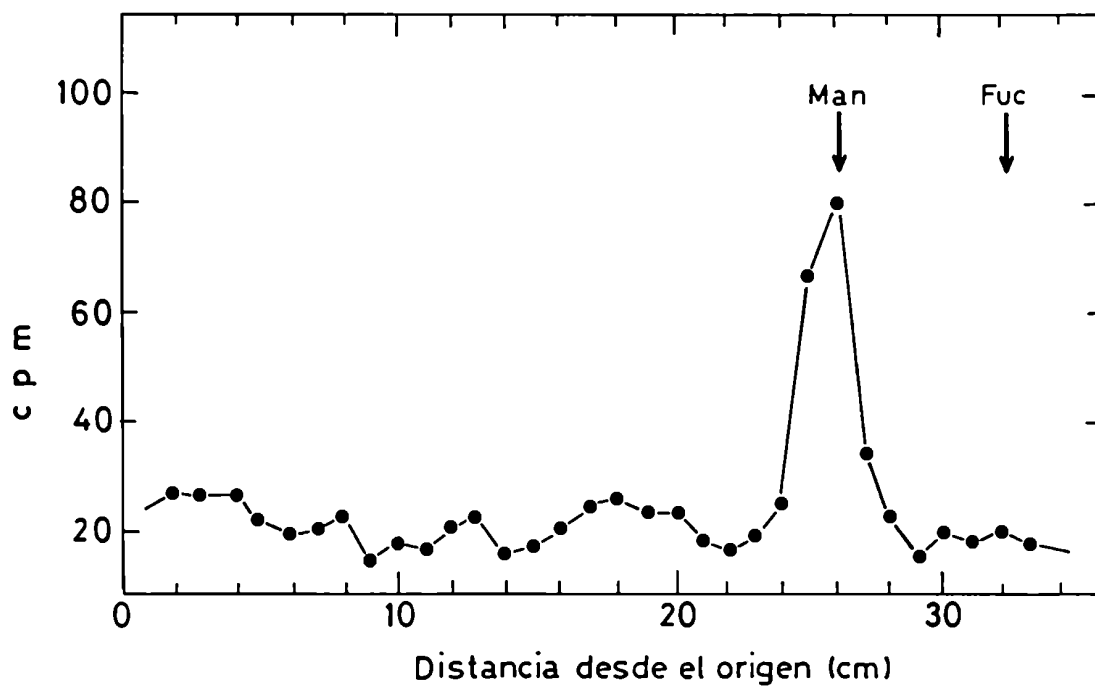


Fig. 3-28: Identificación de los  $^3\text{H}$ -monosacáridos constituyentes de la porción oligosacarídica de GPI7.

( $^3\text{H}$ )GPI7 fue sometida a hidrólisis ácida fuerte como está detallado en 2.10.4.2. El producto de la hidrólisis se cromatografió en papel en solvente C durante 30 h. Las flechas indican las posiciones donde migraron los standards Man y Fuc.

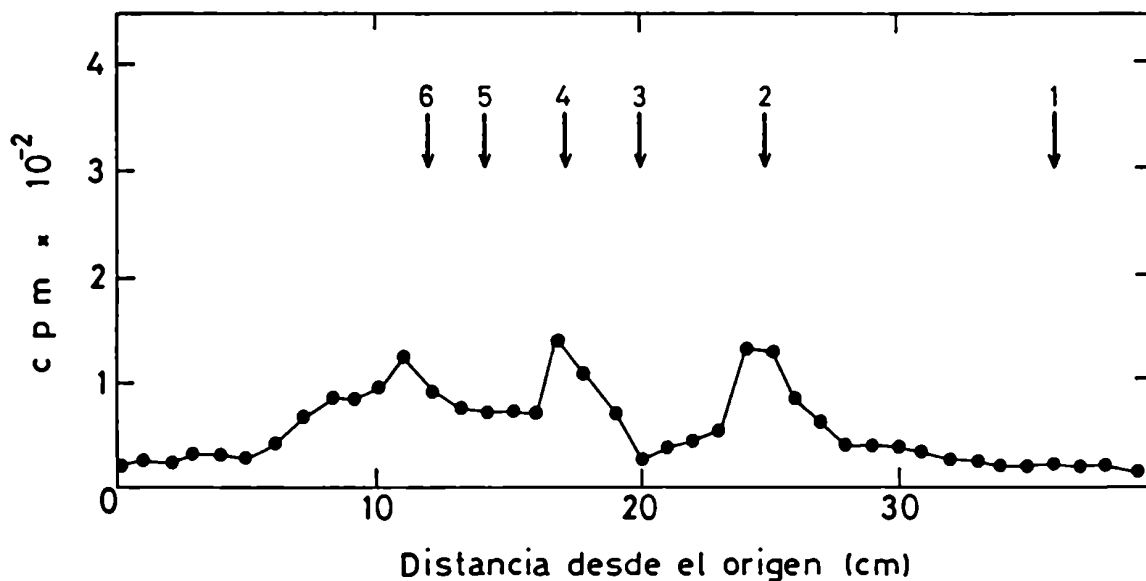


Fig. 3-29: Análisis cromatográfico de los fragmentos producidos por acetólisis de  $(^3\text{H})\text{M}_5$  previamente unido a GPI7.

$(^3\text{H})\text{M}_5$  (3.000 cpm) fue eluido de un cromatograma similar al de la Fig. 3-27 resultante de una preparación en mayor escala y sometido a acetólisis (ver 2.10.4.1.). El material resultante de la acetólisis fue cromatografiado en papel con solvente B durante 44 h. Las flechas muestran las posiciones halladas para los standards derivados de manano de levadura (gentilmente cedidos por G. Lederkremer y L. de la Canal). El número de unidades monosacáridicas que tiene cada standard está indicado sobre las flechas (1=Man; 2=Man<sub>2</sub>; etc.).



acetólisis de  $M_6$  no dio una clara distribución de fragmentos debido a la baja radioactividad recuperada en el correspondiente cromatograma.

### 3.2.6. Purificación de GP17

#### 3.2.6.1. Primera etapa: filtración molecular mediante Bio-Gel P-60

Con el propósito de ensayar la actividad biológica de GP17 frente a espermatozoides, se planeó su purificación para una posterior marcación radioactiva con  $^{125}\text{I}$ , la cual se sabe que ocurre en residuos tirosina (63). La radioactividad de ( $^3\text{H}$ )GP17 era muy baja para el propósito mencionado.

Se encaró la primera etapa de purificación mediante el uso de Bio-Gel P-60, por cuanto en principio sería capaz de excluir todas las proteínas de masa molecular mayor que 60 KDa y separar en su forma nativa, de acuerdo a tamaño molecular, las proteínas más pequeñas, entre ellas GP17. Se descartó el empleo de la columna de Bio-Gel A 1.5m anteriormente usada porque, debido a su ancho rango de operación, no permite separar proteínas pequeñas entre sí, como ya se vio (Fig. 3-19).

Para facilitar las técnicas de purificación, se procedió a obtener proteínas secretadas en escala preparativa (en el orden de  $\text{mg}$ ), para lo cual se realizaron incubaciones de epidídimo en un número relativamente grande de cavidades de una placa "multiwell". Los sobrenadantes resultantes fueron reunidos y pasados por una columna de Bio-Gel P-60. Las incubaciones y corridas en columna se repitieron varias veces. En una corrida típica se recogían 50 fracciones de 0.5 ml, observándose que el color azul del Blue Dextran eluía entre las fracciones 19-23. Para ubicar el volumen de elución de GP17,

preliminarmente se realizaron SDS-PAGE analíticas de alícuotas de las fracciones provenientes de Bio-Gel P-60. En la Fig. 3-30 se muestra el resultado de una SDS-PAGE de las fracciones recogidas de la columna agrupadas en "pools". En base a los resultados preliminares, se reunieron en un mismo "pool" las fracciones vecinas que mostraron un mismo perfil en previas corridas en SDS-PAGE. En el "pool" rotulado 1, que contenía las fracciones 19-22, se observó el grueso de las proteínas secretadas; en el "pool" llamado 2, que reunió a las fracciones 23-27, se observaron varias bandas de las anteriores pero con menor intensidad, y además algunas bandas correspondientes a pesos moleculares menores, entre ellas una muy tenue correspondiente a GP17; y en el "pool" rotulado 3, que contenía las fracciones "28-30", se detectó GP17 nítidamente además de otra en mucho menor proporción correspondiente a una masa molecular de 23 KDa, llamada de aquí en más P23. En las fracciones siguientes a la número 30 provenientes de Bio-Gel P-60 no se detectó GP17 según SDS-PAGE.

Con el objeto de estimar en forma aproximada el rendimiento en la obtención de GP17, se analizó el contenido proteico de cada uno de los "pools" anteriores. Los resultados que se presentan en la Tabla 3-X indican que en el "pool" 3 donde se halló la casi totalidad de GP17 parcialmente purificada, la masa proteica resultó ser 869  $\mu\text{g}$ , que equivale al 17% de toda la proteína secretada, aproximadamente 5 mg. Comparando visualmente la intensidad de las bandas en el carril 3 de la Fig. 3-30, se infiere que de ese 17%, la mayor parte corresponde a GP17.

Otras corridas similares en Bio-Gel P-60 de  $^3\text{H}$ -glicoproteínas secretadas resultaron en la esperada elución de radioactividad en las fracciones

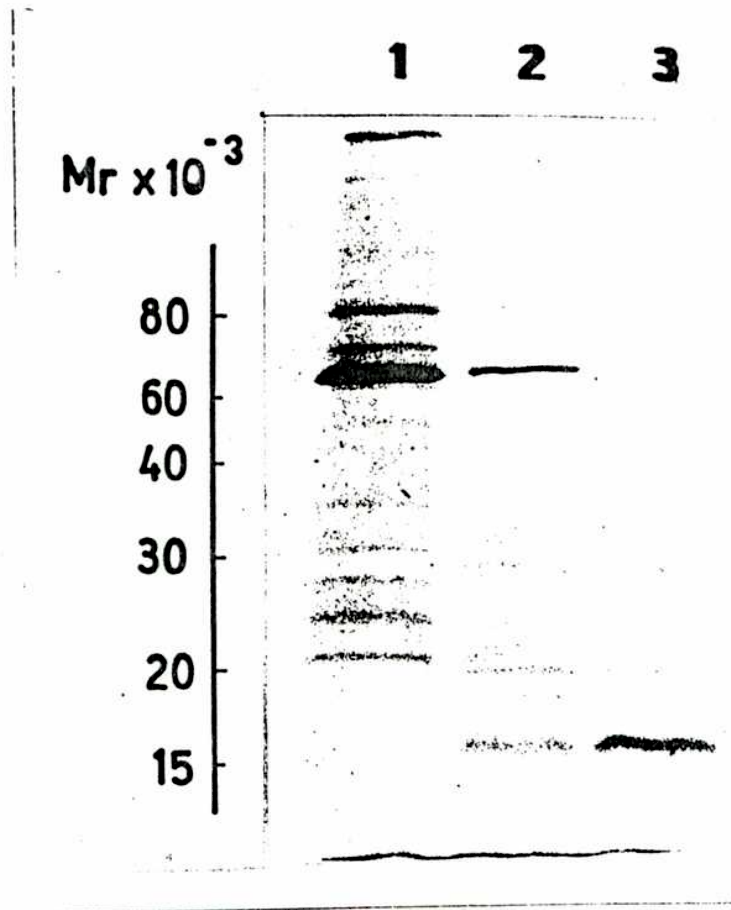


Fig. 3-30: SDS-PAGE de proteínas secretadas totales previamente fraccionadas por Bio-Gel P-60.

Los medios provenientes de 60 cavidades de una placa "multiwell" conteniendo tejido epididimario incubado en MEM fueron reunidos y pasados a través de una columna de Bio-Gel P-6. El material excluido fue cromatografiado en una columna de Bio-Gel P-60, de la cual las fracciones 19-22 que contenían Blue Dextran fueron reunidas y designadas "pool" 1; las fracciones 23-27 se agruparon bajo el rótulo "pool" 2; y las fracciones 28-30 se reunieron y rotularon "pool" 3. Alícuotas (1/50 del volumen) de los "pools" 1, 2 y 3 se sembraron en los carriles 1, 2 y 3, respectivamente, de la SDS-PAGE, la cual fue revelada con Coomassie Blue.

Tabla 3-X: Cuantificación de proteínas secretadas.

"pool"	Cantidad de proteína ( $\mu\text{g}$ )
1	2.945
2	1.275
3	869

Alícuotas de los "pools" definidos en la Fig. 3-30 fueron tomadas para determinación cuantitativa de proteína total según el método de Lowry (65). Los datos de cantidad de proteína están referidos al volumen total de cada "pool".

28-30, consistente con la naturaleza glicoproteica de GP17.

3.2.6.2. Segunda etapa: cromatografía de afinidad mediante Concanavalina A. Iodinación

Repetidas corridas en Bio-Gel P-60 no permitieron separar GP17 de P23 por más largas que se hicieron las columnas y por más pequeños que fueron los volúmenes de las fracciones recogidas, probablemente porque ambas proteínas están constituidas por moléculas que poseen el mismo valor de radio de Stokes, parámetro éste (y no el peso molecular) discriminado por la técnica de filtración molecular por geles (102).

Se pensó, entonces, dado que GP17 es la N-glicoproteína mayoritaria entre las proteínas secretadas (Fig. 3-16), en aprovechar precisamente la característica propia de GP17 de poseer manosa, aparentemente no compartida por P23, con el fin de lograr su separación. Para ello, se recurrió a Concanavalina A (Con A), cuya especificidad de interacción con residuos  $\alpha$ -D-manopiranosidos no reductores (36) permitiría unirse a GP17, que como ya se vio en secciones precedentes, contiene oligosacáridos de "alta manosa". Como prueba preliminar, se ensayó la capacidad de unión de una pequeña alícuota de ( $^3\text{H}$ )GP17 a Con A acoplada a un soporte inerte. El resultado expuesto en la Tabla 3-XI indica que GP17 efectivamente es capaz de unirse específicamente a Con A, ya que fue desplazada de la columna por acción de  $\alpha$ -metil manósido, compuesto por el que Con A tiene alta afinidad (36). Habiendo obtenido este último resultado alentador, se encaró la purificación por Con A del "pool" 3 proveniente de Bio-Gel P-60, donde se hallaban GP17 y P23. Pero aquí se tropezó con el siguiente inconveniente metodológico: al

Tabla 3-XI: Cromatografía de (<sup>3</sup>H)GP17 en Concanavalina A-agarosa.

Fracción	cpm
Percolado	78
Eluido por $\alpha$ -metil manósido	859

(<sup>3</sup>H)GP17 (1.000 cpm) fue pasada por una pequeña columna de Con A-agarosa, como se indicó en 2.10.1.2., recuperándose el percolado. Luego de lavar la columna con PBS, se eluyó agregando  $\alpha$ -metil manósido 2% en PBS. Se contó la radioactividad presente en el percolado y en el eluido por  $\alpha$ -metil manósido.

realizar SDS-PAGE de los eluidos de Con A-agarosa, se detectó por Coomassie Blue una proteína de aproximadamente 27 KDa ausente en las muestras originales sembradas en la columna. Era obvio que esa proteína provenía de la propia columna, y su identidad fue atribuida a Con A parcialmente desacoplada de la agarosa, ya que la masa de la proteína observada coincidía con el valor informado en la bibliografía para cada subunidad de Con A (6). Como estaba planeada la iodinación radioactiva de GP17, Con A contaminante también hubiera resultado indeseablemente marcada. Con el propósito de subsanar el inconveniente mencionado sin aumentar el número de etapas en la purificación, se decidió invertir el orden en las operaciones, es decir, realizar primeramente una marcación del "pool" 3 con  $^{125}\text{I}$  y posteriormente una purificación de  $^{125}\text{I}$ -GP17 mediante ConA inmovilizada. De esta manera, Con A contaminante no estaría marcada y por lo tanto no interferiría en los ensayos de unión a espermatozoides, donde la detección estaría basada solamente en radioactividad.

Teniendo en cuenta el razonamiento anterior, la iodinación se realizó sobre el "pool" 3, el cual, como ya se vio, estaba muy enriquecido en GP17 (Fig. 3-30, carril 3). Se siguió el protocolo indicado en 2.11., usando Iodo-Gen, que es un oxidante suave que preserva la conformación nativa de la proteína, requisito indispensable si se pretende ensayar luego actividad biológica de la proteína en cuestión. La fracción así iodinada se sometió luego a cromatografía de afinidad mediante una columna de Con A-agarosa. La Tabla 3-XII muestra la cantidad de marca radioactiva presente en el material que pasó de largo por la columna y en el material retenido y luego específicamente eluido por  $\alpha$ -metil manósido. Una conclusión apresurada que se

Tabla 3-XII: Evaluación cuantitativa del comportamiento en Concanavalina A-agarosa del "pool" 3 iodinado.

Fracción	cpm
Percolado	833.000
Eluido por $\alpha$ -metil manósido	236.000

El material proteico contenido en el "pool" 3 (fracciones 28-30 provenientes de Bio-Gel P-60) fue iodinado con  $^{125}\text{I}$  como se detalla en 2.11. Una alícuota del producto de la iodinación ( $1 \times 10^6$  cpm) fue pasado por una columna de Con A-agarosa, realizando las mismas operaciones que las indicadas en la leyenda de la Tabla 3-XI. Se determinó la radioactividad presente en el percolado y en el eluido por  $\alpha$ -metil manósido.



extrajo del experimento fue que GP17 se había unido parcialmente a Con A. Como se verá enseguida, tal interpretación fue errónea.

Para confirmar que el material retenido por Con A correspondía a GP17, se efectuó SDS-PAGE del material proteico no unido (Fig. 3-31, carril 1) y unido (Fig. 3-31, carril 2) a la lectina. Como se desprende del experimento, toda la GP17 se unió a Con A, hecho consistente, una vez más, con su contenido en oligosacáridos de manosa, mientras que P23 carece de afinidad por la lectina, probablemente porque no contiene los necesarios residuos sacarídicos específicos. Un hecho curioso que surge del análisis de la Tabla 3-XII y la Fig. 3-31 es que P23, que estaba presente en mucho menor proporción que GP17 en la muestra sometida a iodación (Fig. 3-30, carril 3), resultó mucho más iodada que GP17, lo cual había llevado a una primera interpretación errónea mencionada en el párrafo anterior. Una especulación consistente con el hecho observado es que P23 tiene un mayor contenido en residuos tirosina que GP17.

Un material obtenido de igual manera que el sembrado en el carril 2 de la SDS-PAGE de la Fig. 3-31 se utilizó como fuente de  $^{125}\text{I}$ -GP17 suficientemente purificada (libre de P23) para los ensayos de unión a espermatozoides que se describirán más adelante. Aparte de las conclusiones extraíbles acerca del contenido en oligosacáridos de las proteínas involucradas, queda claro que Con A resultó ser una excelente herramienta para obtener GP17 libre de P23. Como la radioactividad específica de las proteínas iodadas es muy alta (del orden de  $10^6$  cpm/ug) el hecho de encontrar a GP17 como banda muy mayoritaria en SDS-PAGE (Fig. 3-31, carril 2) indica un alto grado de pureza, ya que pequeñas cantidades de proteínas contaminantes indetectables por

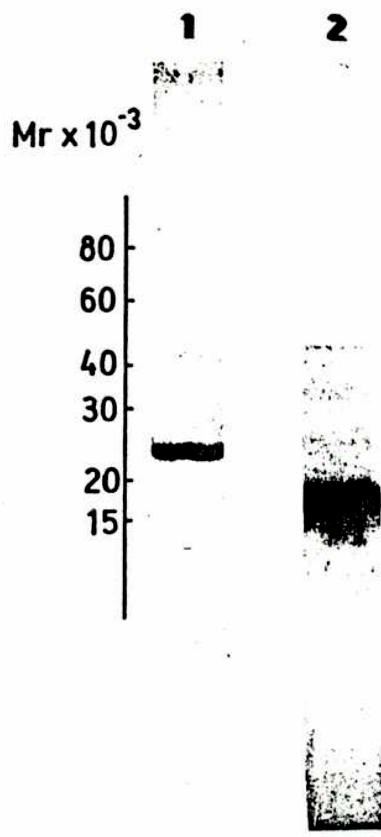


Fig. 3-31: Evaluación de la purificación de <sup>125</sup>I-GP17 conseguida mediante Concanavalina A-agarosa.

Las fracciones provenientes de Con A-agarosa cuya radioactividad se indicó en la Tabla 3-XII se sometieron a SDS-PAGE, la cual fue revelada a los 3 días por radioautografía. Carril 1, percolado (50.000 cpm); carril 2, eluido por  $\alpha$ -metil manósido (170.000 cpm).

Coomassie Blue hubieran resultado en bandas nítidamente marcadas en la radioautografía, lo cual no ocurrió en este caso, en el que las contaminaciones fueron insignificantes.

### 3.2.7. Unión de GP17 a espermatozoides

Para ensayar la capacidad de unión (o "binding") específica de GP17 a espermatozoides de rata, se utilizó la fracción iodinada y luego pasada por Con A, que como ya se vio en la sección anterior, estaba suficientemente pura (Fig. 3-31, carril 2).

Los experimentos se realizaron según la metodología típica para ensayos de "binding", que consiste en incubar en condiciones apropiadas el ligando marcado con las células de interés y luego determinar la radioactividad asociada a las células, las cuales se separan del medio por centrifugación. En el presente trabajo, el ligando marcado fue  $^{125}\text{I}$ -GP17 y las células estudiadas fueron espermatozoides de rata. Además, en este tipo de ensayos, es importante determinar la especificidad de la unión, lo cual se hace con un número limitante de células y diluyendo isotópicamente por presencia adicional de un gran exceso del mismo ligando no marcado, en base al siguiente razonamiento: si la unión ocurre vía receptores específicos en la membrana de la célula, el ligando homólogo no marcado debería competir con el marcado por los pocos sitios receptores existentes, y consecuentemente provocar una disminución de la cantidad de marca unida a las células. Por otra parte, sustancias estructuralmente no relacionadas al ligando no deberían reducir la cantidad de marca unida, dado que aquéllos o bien no se unen a la célula o bien lo hacen a otro tipo de receptores.

Primeramente, con el objeto de ver si existía o no afinidad de GP17 a espermatozoides, y en caso afirmativo, si el grado de maduración de éstos ejercía alguna influencia, se realizó un experimento preliminar incubando espermatozoides de diferentes regiones anatómicas en presencia de  $^{125}\text{I}$ -GP17. Tentativamente, el tiempo y el medio de incubación fueron 60 min y PBS/BSA, respectivamente. Paralelamente, se realizaron incubaciones con el agregado adicional de un gran exceso de GP17 no marcada para evaluar especificidad. La Tabla 3-XIII muestra los resultados obtenidos con espermatozoides testiculares y de cabeza, cuerpo y cola de epidídimo. Los datos indican que la unión específica cuantitativamente más importante fue la obtenida con espermatozoides testiculares, que resultó en un 44% de la unión total. Por lo tanto, el testículo fue usado como fuente de espermatozoides en todos los experimentos subsiguientes. Como células control, se emplearon glóbulos rojos de rata, a los que no se observó unión específica alguna por parte de GP17.

Otros medios de incubación, más complejos que PBS/BSA no influyeron positivamente sobre el grado de unión, de manera que se siguió usando PBS/BSA.

Con el objeto de optimizar las condiciones de incubación y mejorar el grado de unión entre  $^{125}\text{I}$ -GP17 y espermatozoides testiculares, se realizó una curva de tiempo (Fig. 3-32), según la cual, la unión específica fue máxima a los 120-180 min, disminuyendo luego. Por consiguiente, en todos los experimentos siguientes, las incubaciones se detuvieron a los 120 min.

La especificidad de la unión fue verificada y analizada más exhaustivamente realizando incubaciones de  $^{125}\text{I}$ -GP17 con un número limitante de espermatozoides (en una relación de aproximadamente 300.000 moléculas de pro-

Tabla 3-XIII: Grado de unión de  $^{125}\text{I}$ -GP17 a espermatozoides obtenidos de diferentes regiones anatómicas.

Tipo de células	Unión de $^{125}\text{I}$ -GP17		
	Total cpm	Inespecífica cpm	Específica cpm % del total
Espermatozoides de rete testis	2.128	1.188	940 44
Espermatozoides de cabeza de epidídimo	2.142	1.804	338 16
Espermatozoides de cuerpo de epidídimo	1.756	1.777	0 0
Espermatozoides de cola de epidídimo	2.461	2.339	122 5
Glóbulos rojos	768	812	0 0

$3 \times 10^6$  células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con  $^{125}\text{I}$ -GP17 4,4 nM (80.000 cpm) en PBS conteniendo BSA 1% en ausencia (para determinar unión total) o en presencia de GP17 440 nM (para cuantificar unión inespecífica). A los 60 min, el grado de unión en cada caso fue determinado midiendo la radioactividad asociada a células, tal como fue detallado en la Sección 2.12. Los datos de cpm de unión específica se calcularon sustrayendo los valores obtenidos de unión inespecífica a los correspondientes valores hallados de unión total.

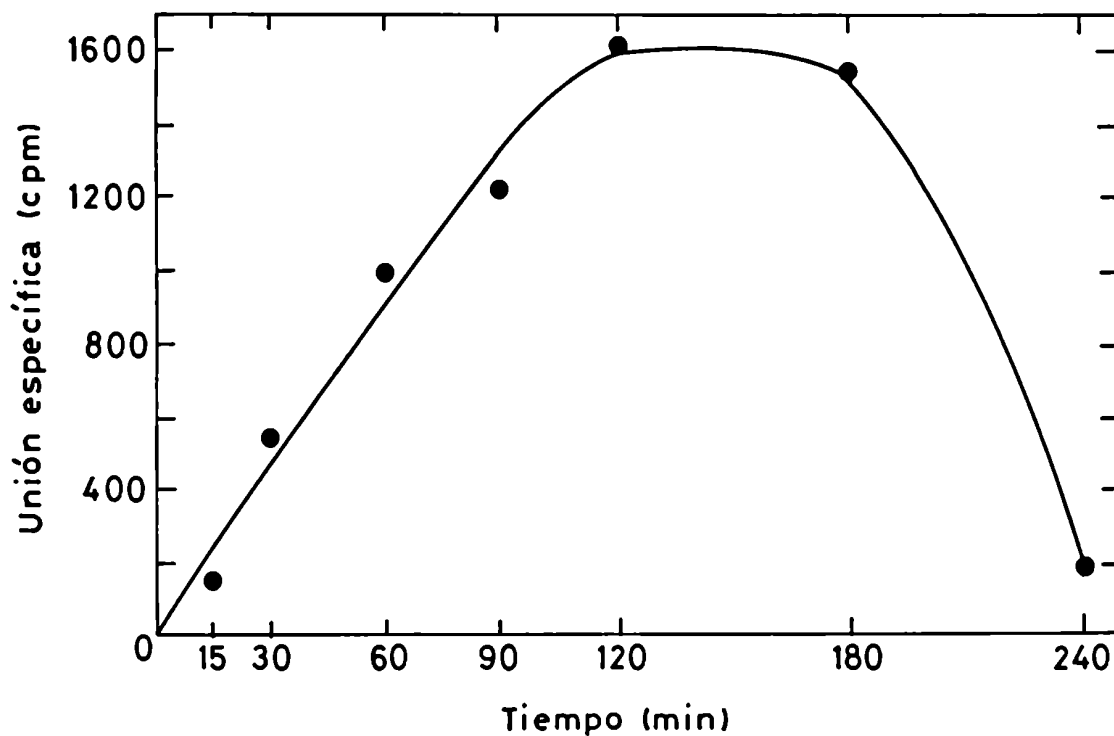


Fig. 3-32: Cinética de la unión de  $^{125}\text{I-GP17}$  a espermatozoides testiculares.

$^{125}\text{I-GP17}$  4,4 nM (80.000 cpm) fue incubada a 37°C con  $3 \times 10^6$  espermatozoides testiculares en PBS conteniendo BSA 1% en ausencia o presencia de GP17 440  $\mu\text{M}$ , durante tiempos variables. El grado de unión específica fue evaluado como se indicó en la leyenda de la Tabla 3-XIII.

teína marcada/célula) en presencia de un exceso de proteína sin marca, estructuralmente idéntica o bien no relacionada a la marcada. La Tabla 3-XIV resume los resultados de este último experimento, que señala que solamente GP17 (y no otras proteínas irrelevantes) fue capaz de disminuir la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -GP17 asociada a los espermatozoides, reafirmando el concepto de especificidad de la unión observada. De los datos se desprende que, en condiciones óptimas, el 66% de la unión resultó ser específica, la cual a su vez correspondió a casi un 4% de la radioactividad inicialmente presente.

#### 3.2.7.1. Parámetros inherentes a la unión. Afinidad y número de receptores

En la Fig. 3-33 se muestran graficados los datos de unión específicas (es decir, ya habiendo descontado las cpm no desplazables por un exceso de GP17 sin marca) obtenidos como resultado de incubaciones de espermatozoides testiculares y cantidades crecientes de  $^{125}\text{I}$ -GP17. El rango de concentraciones de la proteína marcada fue 0,62-6,0 nM, lo cual significó desde 50.000 moléculas hasta 500.000 moléculas/célula. Se observó una mayor cantidad de marca unida cuanto mayor fue la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -GP17 ofrecida a las células, con tendencia a la saturación.

La Fig. 3-34 corresponde a los datos de unión resultantes de incubaciones de espermatozoides y  $^{125}\text{I}$ -GP17 (600.000 moléculas/célula) en presencia de cantidades crecientes (graficadas en escala logarítmica) de GP17 no radioactiva, desde cantidades tan pequeñas como 1,2 ng (50 veces menos que la masa de la proteína marcada) hasta cantidades saturantes como 7  $\mu\text{g}$  (aproximadamente 100 veces más que la masa de la proteína marcada). Se observó desplazamiento de la marca unida a células ya a valores bajos de masa

Tabla 3-XIV: Especificidad de la unión de  $^{125}\text{I}$ -GP17 a espermatozoides testiculares.

Agregado	Unión (cpm)
-	4.704
Suero	4.470
Citosol de próstata	4.964
Citosol de testículo	4.526
Citosol de vesícula seminal	4.878
GP17	1.609

$3 \times 10^6$  espermatozoides testiculares fueron incubados con  $0.03 \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -GP17 ( $4.4 \text{ nM}$ ) en PBS conteniendo BSA 1% en ausencia o presencia de 100 veces más en masa proteica ( $3 \mu\text{g}$ ) de GP17 o de diferentes materiales biológicos derivados de rata, tales como suero o citosol (sobrenadante de una centrifugación de homogenato a  $100.000 \times g$  durante 1 h) de órganos sexuales accesorios. Las incubaciones se realizaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 120 min y la unión fue medida como se describió en 2.12.



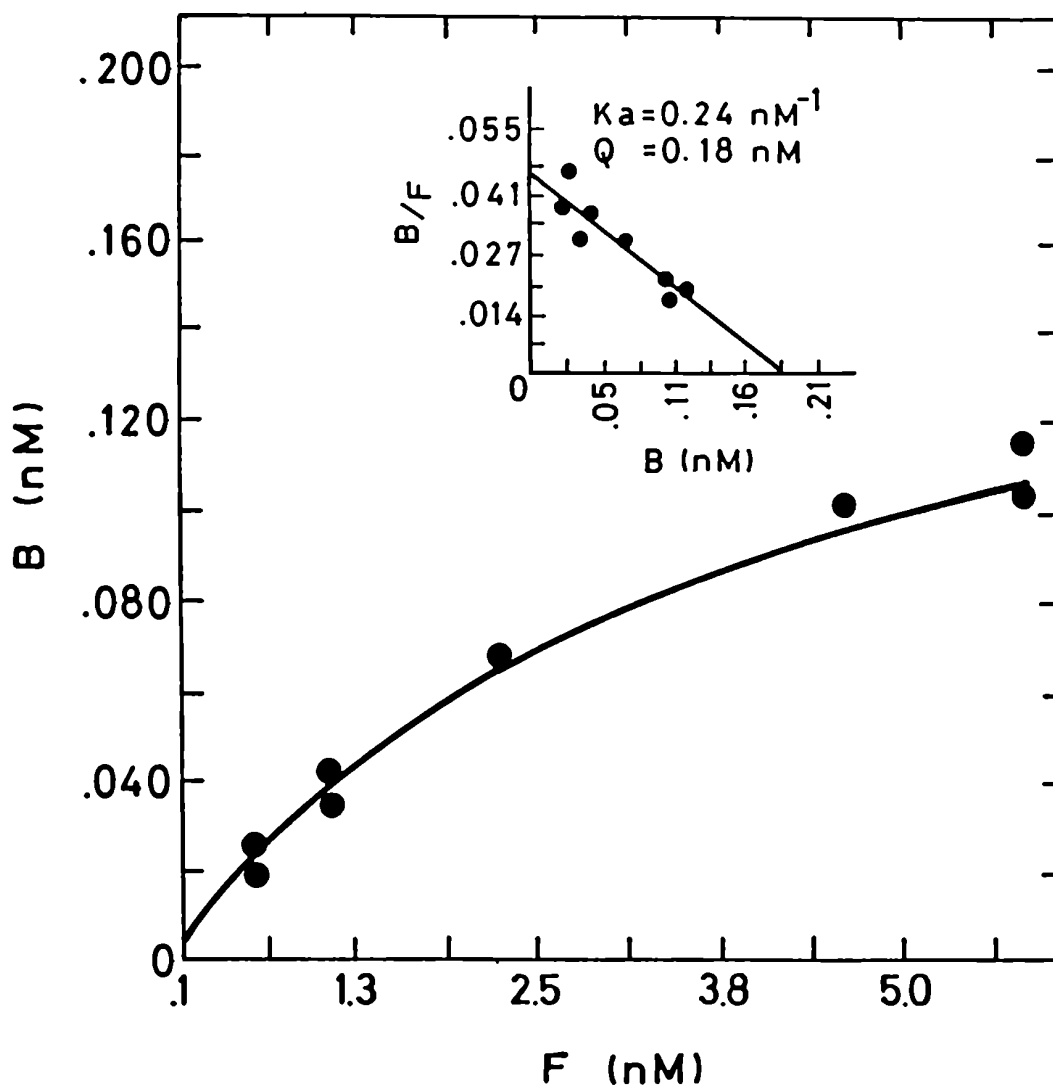


Fig. 3-33: Curva de saturación de la unión de  $^{125}\text{I}$ -GP17 a espermatozoides testiculares.

$3 \times 10^6$  espermatozoides fueron incubados con diferentes concentraciones de  $^{125}\text{I}$ -GP17, desde 0,62 nM (12.500 cpm) hasta 6,0 nM (120.000 cpm) en ausencia y presencia de exceso de GP17 (100 veces la concentración de  $^{125}\text{I}$ -GP17 en cada caso). Las incubaciones se realizaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 120 min en PBS conteniendo BSA 1%. Las uniones específicas fueron determinadas como se indicó en la Tabla 3-XIII. B: concentración de proteína unida específicamente; F: concentración de proteína libre.

Inserto: Gráfico de Scatchard derivado de los mismos datos.  $K_a$ : constante de afinidad;  $Q$ : concentración total de sitios receptores.

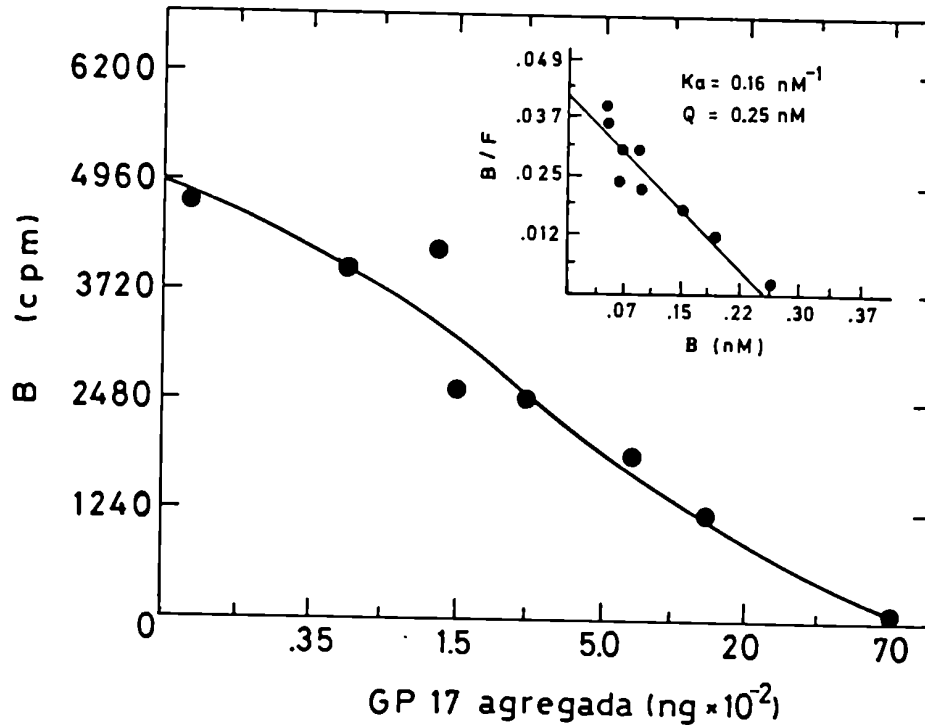


Fig. 3-34: Competición entre <sup>125</sup>I-GP17 y GP17 por sitios receptores en espermatozoides testiculares.

$3 \times 10^6$  espermatozoides fueron incubados con <sup>125</sup>I-GP17 8,8 nM (160.000 cpm) y concentraciones variables de GP17 (no radioactiva) entre 1,2 ng (0,16 nM) y 7  $\mu$ g (0,93  $\mu$ M). Las demás condiciones de incubación fueron igual que como está mencionado en la Fig. 3-33. Los valores de unión específica se calcularon sustrayendo la radioactividad obtenida en presencia de 7  $\mu$ g de GP17 (100 veces en exceso) a la radioactividad obtenida en cada caso. B: cantidad de proteína marcada unida específicamente.

Inserto: gráfico de Scatchard derivado de los mismos datos. B: concentración de proteína marcada unida específicamente; F: concentración de proteína marcada libre. Ka y Q: como en la Fig. 3-33.

de proteína competidora, aumentando tal desplazamiento a medida que se incrementaron las concentraciones de GP17 sin marca, como era de esperar de acuerdo a los datos preliminares sobre especificidad ya presentados. Cantidades de GP17 por encima de  $7 \mu\text{g}$  no lograron provocar un desplazamiento mayor que el ocasionado por  $7 \mu\text{g}$ , por lo que todos los valores de unión específica se calcularon como la unión total menos la que quedó (en sitios inespecíficos) en presencia de  $7 \mu\text{g}$  (100 veces en exceso).

Los datos de las curvas de saturación (Fig. 3-33) y competición (Fig. 3-34) fueron incorporados a un programa de computadora especialmente diseñado para resultados de "binding", a través del cual surgió una recta promedio como gráfico de Scatchard (96), es decir,  $B/F$  en función de  $B$ , donde  $B$  equivale a la concentración de proteína específicamente unida y  $F$  a la concentración de proteína libre, o sea, no unida. Los gráficos de Scatchard están incluidos como insertos en las Figs. 3-33 y 3-34.

El valor de la concentración total de sitios receptores (considerando el total de células en el ensayo) está designado en los gráficos como " $Q$ ", y se deduce fácilmente, por cuanto está dado por el valor de la abcisa de un gráfico de Scatchard cuando es interceptada por la recta, es decir, es la concentración de proteína unida ( $B$ ) cuando hay completa saturación (cuando  $F$  tiende a infinito, o lo que es lo mismo,  $B/F=0$ ).

A través de la computadora se calculó el valor de la constante de afinidad  $K_a$ , que no es más que la pendiente de la recta de Scatchard (en valor absoluto), ya que por definición:

$$K_a = \frac{B}{F(Q - B)} \quad \text{donde } (Q - B) \text{ es la concentración de receptores libres, es decir, no ocupados por ligando}$$

o lo que es lo mismo:

$$B/F = K_a Q - K_a B$$

que es la ecuación que rige las rectas graficadas, donde  $K_a$  y  $Q$  son constantes. Los valores calculados a partir de uno y otro gráfico de Scatchard

fueron similares y se promediaron, resultando en  $K_a=0,20 \text{ nM}^{-1}$  y  $Q=0,215 \text{ nM}$ .

Del valor promedio de  $Q$  se dedujo el número de sitios receptores/célula aplicando la siguiente fórmula:

$$n^\circ \text{ de sitios/célula} = \frac{V \times Q \times N}{n^\circ \text{ de células}}$$

donde:  $V$  = volumen de incubación  
 $Q$  ya fue definido (moles/litro)  
 $N$  = Número de Avogadro (moléculas/mol)

En el presente trabajo,  $V$  fue  $4 \times 10^{-4} \text{ l}$  y el  $n^\circ$  de células fue  $3 \times 10^6$ , lo cual arrojó un valor para el  $n^\circ$  de sitios/célula de 17.200.

En resumen, los experimentos de "binding" revelaron la presencia en cada espermatozoide de 17.200 sitios específicos para GP17, por la cual tienen una alta afinidad, cuantificada por una  $K_a = 0,20 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

#### 4. DISCUSION

##### 4.1. Efecto de andrógenos sobre las actividades de las enzimas del ciclo del dolicol

Es sabido que los niveles de actividad de ciertas enzimas del epidídimo de rata disminuyen como resultado de la castración. Estudios en tal sentido llevados a cabo por Brooks (15) demostraron que algunas enzimas involucradas en la glucólisis son sensibles a los niveles de andrógenos circulantes. En el presente trabajo, se ha verificado algo similar sobre algunas enzimas del ciclo del dolicol. Por ejemplo, la glucosil transferasa y la manosil transferasa resultaron afectadas por la caída de los niveles de andrógenos circulantes provocada por la castración. La manosil transferasa fue estudiada en mayor detalle, observándose que sus niveles volvían a sus valores iniciales luego de la administración "in vivo" de testosterona en cantidades fisiológicas.

El hecho de que los andrógenos provoquen las mismas variaciones relativas de la manosil transferasa, ensayada ésta en ausencia y presencia de Dol-P en concentraciones cuasi-saturantes, es indicativo de que la modulación producida por andrógenos ocurre a nivel de la enzima y no a nivel de su sustrato Dol-P. Si la castración produjera sólo una caída de los niveles de Dol-P endógeno, se hubiera hallado el mismo grado de transferencia enzimática de manosa desde GDP-Man a un exceso de Dol-P, tanto en animales castrados como en intactos, ya que el déficit de Dol-P endógeno se hubiera compensado con el provisto exógenamente.

En principio, los posibles mecanismos generales de acción de la hormona,

una vez que ésta entró a la célula, sobre la manosil transferasa, serían los siguientes:

- 1) La testosterona activa irreversiblemente a la manosil transferasa preexistente.
- 2) Un producto metabólico de la testosterona formado "in vivo" activa irreversiblemente a la enzima preexistente.
- 3) La testosterona induce "in vivo" una mayor síntesis de la enzima.
- 4) Un producto metabólico de la testosterona formado "in vivo" induce una mayor síntesis de la enzima.

Los resultados hallados permiten descartar el mecanismo 1), ya que la presencia de testosterona en el ensayo de manosil transferasa no produjo ninguna modificación en la actividad enzimática. Además, el mecanismo 1) "a priori" era poco probable debido al conocido mecanismo general de acción de los andrógenos, que consiste en la unión a un receptor citoplasmático y traslocación del complejo resultante al núcleo, induciendo la transcripción de ciertos genes específicos (115). El mecanismo 2), aunque no puede ser descartado por los resultados de los experimentos con microsomas (que serían incapaces de metabolizar la testosterona), también es poco probable, por lo menos como único operante, por las mismas razones enunciadas para el primer mecanismo.

Quedarían, entonces, los mecanismos 3) ó 4) como los más probables para explicar la acción de testosterona, o sea, que este andrógeno o un producto metabólico derivado activen la síntesis "de novo" de la enzima, por ejemplo, activando la transcripción del gen de la manosil transferasa, entre otros. El bloqueo del efecto androgénico producido por la simultánea administración del

anti-andr6geno CA (esteroide que se une al receptor) est1 de acuerdo con un mecanismo temprano mediado por un receptor, lo cual confirma la especificidad de la respuesta observada. Dicho mecanismo temprano se demostr6 que ocurre en epid6dimo, al existir un receptor de DHT, producto metab6lico de la testosterona (110), y est1 de acuerdo con los hipot6ticos mecanismos 2) y 4) enunciados anteriormente.

Para confirmar definitivamente el mecanismo 4), que es el m1s probable, habr1a que ensayar la manosil transferasa obtenida a partir de tejido incubado "in vitro" con testosterona en ausencia y presencia de una sustancia que inhiba directa o indirectamente la s1ntesis de prote1nas. Si el evento directamente estimulado por la hormona fuera la transcripci6n, un inhibidor apropiado ser1a actinomicina, que se une al DNA inhibiendo la formaci6n de mRNA (62). En el presente caso, si el mecanismo 4) fuera el que opera, el inhibidor impedir1a el incremento de actividad de manosil transferasa ocasionado por testosterona. Esta estrategia est1 muy difundida, y por dar s6lo un ejemplo relativamente reciente, fue utilizada para dilucidar el mecanismo de acci6n del factor de crecimiento derivado de plaquetas sobre la s1ntesis de ciertas prote1nas de linfocitos humanos (85). De acuerdo al dise1o experimental adoptado en este trabajo utilizando testosterona "in vivo", no fue posible el empleo de inhibidores de la s1ntesis proteica porque 6stos hubieran resultado letales a los animales.

La incorporaci6n de manosa a partir de GDP-Manosa en Dol-PP-oligosac1ridos intermediarios (proceso en el que intervienen varias enzimas) tambi6n sufri6 similares variaciones frente a los cambios en los niveles hormonales. Dichas variaciones eran de esperarse, ya que 6stas pueden

ser explicadas por los efectos ya discutidos sobre la manosil transferasa, cuyo producto Man-P-Dol es a su vez sustrato en la transferencia enzimática que resulta en la formación de Man<sub>6</sub>- $\alpha$ -GlcNac<sub>2</sub>-PP-Dol. No se descarta que además de la manosil transferasa hubiera modulación por andrógenos de las enzimas directamente involucradas en el alargue de la cadena oligosacáridica sobre Dol-PP.

La incorporación de manosa a partir de GDP-manosa en glicoproteína microsomal resultó cuantitativamente pobre, a pesar de tratarse de producto final (proteína N-glicosilada), lo cual es consistente con la ausencia de síntesis de proteínas aceptoras glicosilables en microsomas aislados, por carecer éstos de la apropiada maquinaria enzimática soluble (22). La N-glicosilación normalmente ocurre simultáneamente con la síntesis de cadenas polipeptídicas aceptoras, como fue demostrado en sistemas de traducción "in vitro" completos, que incluían tanto factores solubles como asociados a membranas (91).

Como la incorporación de manosa en glicoproteína también es un proceso que involucra varias etapas enzimáticas (Fig. 1-2), los experimentos realizados no permiten precisar la identidad de las enzimas moduladas hormonalmente. Los efectos observados referentes a dicha incorporación pueden ser justificados por los cambios en la actividad de manosil transferasa, no descartándose una adicional modulación o bien de cualquiera de las enzimas capaces de provocar directa o indirectamente cambios en la concentración de Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNac<sub>2</sub> unido a Dol-PP, o bien de la enzima que cataliza la transferencia de dicho oligosacárido a proteína.

Otra conclusión que se puede extraer de los experimentos, a partir de



los datos de contenido de DNA, es la de que el número de células que componen el tejido se mantiene prácticamente constante frente a los cambios en los niveles de andrógenos. En cambio, el contenido proteico total sufrió mayores oscilaciones, lo cual indica que la síntesis del grueso de las proteínas del tejido está sujeta a control hormonal. Como entre todas esas proteínas, probablemente habría muchas glicosiladas, tiene sentido suponer que el ciclo del dolicol "per se " también está sujeto a control hormonal a través de enzimas claves, regulando el funcionamiento global del ciclo del dolicol. Es claro que más experimentos serían necesarios para confirmar o descartar dicha hipótesis.

Contrariamente a lo encontrado para manosil y glucosil transferasa, las actividades de dolicol fosfato fosfatasa y dolicol fosfoquinasa resultaron independientes del nivel de andrógenos, sugiriendo que su síntesis es constitutiva, no regulando el funcionamiento del ciclo del dolicol en su conjunto.

Los resultados presentados demuestran que la N-glicosilación de proteínas está sujeta a modulación hormonal en epidídimo de rata. Otra instancia similar ocurre durante la diferenciación de oviducto de gallina inducida por estrógenos (66). Sin embargo, el aumento aparente en la actividad de manosil transferasa hallado en ese caso fue debido a la acumulación de un mayor "pool" de Dol-P como consecuencia de una incrementada actividad de dolicol fosfoquinasa (21). Por el contrario, la cantidad de Dol-P endógeno en microsomas de epidídimo no varió significativamente ante las diferentes situaciones hormonales como fue demostrado por:

- 1) el hecho de que un exceso de Dol-P exógeno no anulara las diferencias que la castración e inducción por andrógenos produjeron sobre la manosil

transferasa;

2) la medición indirecta de los niveles de Dol-P endógeno.

Concordante con estos resultados es la demostrada relativa independencia androgénica de la dolicol fosfoquinasa y la dolicol fosfato fosfatasa, enzimas que afectan la concentración intracelular de Dol-P.

Se concluye, entonces, que el Dol-P no tiene relevancia en el proceso de regulación androgénica.

#### 4.2. Análisis estructural de oligosacáridos

##### 4.2.1. Oligosacáridos unidos a Dol-PP

Las estructuras de los oligosacáridos unidos a lípido intermediario hallados en epidídimo (incubado simulando condiciones "in vivo") coinciden con las halladas por Robbins y col. en otras células eucariotas superiores tales como ováricas de hamster y fibroblastos de embrión de pollo (50), aunque en otras proporciones. Por ejemplo,  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  fue el compuesto predominante en epidídimo, marcando tanto con glucosa como con manosa,  $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  también se halló en proporciones significativas y  $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  fue abundante sólo cuando se usó manosa como precursor radiomarcado. En cambio, Robbins y col. hallaron  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  como lípido-oligosacárido predominante, además de  $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  y  $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2\text{-PP-Dol}$  en las células mencionadas marcadas con pulsos prolongados de manosa tritiada, con ligeras variaciones en las abundancias relativas en cada tipo celular. Pareciera que cada tipo celular sintetiza diferentes cantidades relativas de los lípido-oligosacáridos individuales, a pesar de que éstos aparentemente sirven como intermediarios para todas las proteínas

susceptibles de ser N-glicosiladas, independiente de su naturaleza u origen, y de que la diversidad existente en las porciones oligosacáridicas es consecuencia de modificaciones estructurales sobre las cadenas de azúcares ya transferidas a proteína (ver sección 1.2.2.2.).

Los Dol-PP-oligosacáridos fueron probablemente sintetizados en los últimos minutos de las incubaciones de epidídimo, suponiendo que la vida media de estos compuestos es del mismo orden en epidídimo que en los tipos celulares utilizados por Robbins (3-6 minutos), al ser sus porciones oligosacáridicas rápidamente transferidas a proteína.

#### 4.2.2. Oligosacáridos de "alta manosa" unidos a proteína

Los oligosacáridos de "alta manosa" unidos a proteína hallados en epidídimo contenían entre 5-9 unidades de manosa. Estructuras similares se encontraron en otras células de eucariotas superiores, aunque la distribución fue diferente (49). En el presente trabajo no se detectaron estructuras intermediarias del tipo  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ , es decir glucosiladas, unidas a proteína también debido probablemente a su corta vida media, al ser dichas estructuras rápidamente atacadas por glicosidasas del retículo endoplásmico (48). Algo similar ocurre en células de ovario de hamster infectadas con el virus de estomatitis vesicular, en las que a los 20-30 minutos luego de la marcación no se detectó el compuesto triglicosilado, aunque sí se detectó el monoglicosilado con trazas del diglicosilado (58). Extrapolando a partir de otros sistemas biológicos, tales como el mencionado (58), donde el procesamiento, si es que ocurre, se completa en 20-30 minutos, se supone que la mayoría de los oligosacáridos de "alta manosa" unidos a proteína hallados en

epidídimo luego de 5 horas de incubación son estructuras a las que se les dio la oportunidad de un total procesamiento, es decir que serían productos finales. A lo sumo, habría un 10% de estructuras parcialmente procesadas durante la última media hora de las incubaciones. Para asegurarse el completo procesamiento, sin dar lugar a la detección de radioactividad en estructuras intermediarias, habría que realizar incubaciones con pulsos de radioactividad y "chase", es decir, con interrupción de la oferta de precursor radioactivo durante la última parte de las incubaciones.

Las diferentes proporciones entre oligosacáridos individuales procesados (productos finales) unidos a proteína en cada tipo celular es fácil de comprender, ya que en cada tipo celular existen diferentes tipos de proteínas glicosiladas.

Las diferencias entre animales castrados e intactos fueron cuantitativas, lo cual está de acuerdo con los resultados de Brooks (16), y no cualitativas, hallándose las mismas estructuras en ambas situaciones hormonales.

#### 4.2.3. Comparación entre los sistemas de marcación con $^{14}\text{C}$ glucosa y $(2\text{-}^3\text{H})$ manosa

La única variación importante entre ambos sistemas de marcación fue la concentración de glucosa ofrecida. En el primer caso fue  $125\ \mu\text{M}$  (debido sólo a la glucosa marcada) y en el segundo fue  $5\ \text{mM}$ , que es la concentración de glucosa presente en MEM y que corresponde a la concentración fisiológica en fluidos extracelulares. La distribución de oligosacáridos de "alta manosa" unidos tanto a lípido como a proteína fue diferente en ambos casos. Usando la

concentración de glucosa fisiológica se encontró una mayor proporción de oligosacáridos pequeños, conteniendo 5 y 6 residuos de manosa, que la hallada con glucosa  $125 \mu\text{M}$ , a expensas de los que contenían 8 y 9 residuos de manosa. Una posible explicación es que el ayuno de glucosa impide el normal procesamiento de los oligosacáridos de "alta manosa". Resultados que muestran alteraciones estructurales de oligosacáridos de "alta manosa" ante el ayuno de glucosa han aparecido en la literatura (87).

Según los protocolos utilizados en las incubaciones de epidídimo con  $(2\text{-}^3\text{H})$ manosa, fue posible establecer la proporción de oligosacáridos de "alta manosa" y "complejos" con respecto al total de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente, de acuerdo al criterio de sensibilidad a Endo-H. Los resultados indicaron que los de "alta manosa" constituyen un 93%, mientras que los "complejos" un 7%, es decir una relación de 13,3/1 a favor de los de "alta manosa". El dato de liberación por álcali de los  $^3\text{H}$ -oligosacáridos no puede ser utilizado para la estimación de la proporción de oligosacáridos O-unidos a proteína, porque en ese caso se liberaron también oligosacáridos O-unidos no marcados (los que no contienen manosa y fucosa).

La proporción exacta de oligosacáridos unidos O-glicosídicamente a proteína no puede ser deducida a partir de los datos de las incubaciones con  $(^{14}\text{C})$ glucosa porque en la fracción denominada "(glico)péptidos purificados" había péptidos marcados no glicosilados. Dicha fracción estaba formada por un 87% sensible a Endo-H (oligosacáridos de "alta manosa") y un 13% resistente (oligosacáridos complejos, O-unidos y péptidos no glicosilados). Aprovechando el dato anterior de 13,3/1 para la relación entre "alta manosa" y complejos, se puede concluir la siguiente distribución de marca de  $^{14}\text{C}$ :

oligosacáridos N-unidos de "alta manosa":	87%		
oligosacáridos N-unidos "complejos":	$\frac{87}{13,3} =$	6,5%	} 13%
oligosacáridos O-unidos			
$^{14}\text{C}$ -péptidos no glicosilados		6,5%	

es decir, que la suma de oligosacáridos unidos O-glicosídicamente y  $^{14}\text{C}$ -péptidos no glicosilados constituye un 6,5%; de manera que el rango de oligosacáridos unidos O-glicosídicamente es de 0-6,5% del total de oligosacáridos.

En resumen, la distribución de oligosacáridos que finalmente se puede concluir es la siguiente:

oligosacáridos unidos O-glicosídicamente:	0-6,5%
oligosacáridos unidos N-glicosídicamente "complejos":	6,5-7%
oligosacáridos unidos N-glicosídicamente "alta manosa":	87-93%

La incertidumbre de no conocer el porcentaje de marca que corresponde a  $^{14}\text{C}$ -péptidos no glicosilados hace que no se pueda calcular los valores exactos de porcentaje, sin rangos.

Por último, cabe recordar que todos los resultados sobre estructura de oligosacáridos representan un promedio de todas las estructuras presentes en la célula, y corresponden a la totalidad de las glicoproteínas. Por tal motivo se encaró el estudio sobre N-glicosilación de entidades proteicas definidas, lo cual se discute a continuación.

### 4.3. Análisis de glicoproteínas secretadas

Hay resultados experimentales en favor de que la observada liberación de proteínas al medio de cultivo de epidídimo representa un real proceso de secreción y no una pérdida del contenido intracelular debido a lisis celular durante las incubaciones. En primer lugar, la cinética de aparición de glicoproteínas radioactivas en el medio muestra un período "lag" de 2 horas antes de la linealidad, lo cual es consistente con la demora entre síntesis de proteínas secretorias y su exportación hacia el exterior de la célula (78). Tal cinética parece improbable si tiene lugar una lisis, la cual, de existir, podría ocurrir desde el principio de las incubaciones, y siguiendo una cinética irregular. Brooks (16), siguiendo un razonamiento similar, llega a la misma conclusión. En segundo lugar, el grado de inhibición de la glicosilación proteica producida por tunicamicina es diferente cuando se comparan proteínas secretadas e intracelulares, lo cual refuerza la idea de que se mantiene la integridad de la barrera que separa ambos compartimientos. Un corolario que además se puede deducir es que la relación N-glicoproteínas/O-glicoproteínas normalmente es diferente en ambos compartimientos, la cual hubiera resultado artificialmente idéntica en el caso de haberse llegado a un equilibrio entre ambos compartimientos debido a lisis celular.

#### 4.3.1. GP17

Los resultados muestran que bajo las condiciones experimentales probadas, el epidídimo de rata sintetiza y secreta una N-glicoproteína de 17 kDa de masa molecular, llamada en este trabajo GP17, la cual resultó mayoritaria entre las glicoproteínas secretadas y constituyó alrededor del 15% del total de las proteínas secretadas. Brooks, en cambio, encontró varias glicoproteínas secretorias marcadas con (2-<sup>3</sup>H)manosa bajo condiciones similares (16), no siendo claro el origen de la discrepancia.

En las condiciones ensayadas, 1 g de tejido secreta 5 mg de proteína total y 0,6 mg de GP17 en 5 horas. Estos rendimientos permitieron que se iniciaran estudios sobre su estructura química y función biológica.

##### 4.3.1.1. Estructura de GP17

Según SDS-PAGE monodimensional, la N-glicoproteína secretada mayoritaria resultó ser una proteína homogénea con una masa molecular de 17 kDa, aunque cabe aclarar la limitación de dicho método analítico, el cual no discrimina proteínas con la misma masa molecular pero con diferente carga eléctrica neta. Es posible, entonces, que la estructura proteica denominada GP17 esté compuesta por dos o más polipéptidos de 17 kDa con diferente punto isoeléctrico.

La ausencia de secreción de una forma no glicosilada de GP17 (por lo menos en cantidades detectables por radioautografía de <sup>14</sup>C) después del tratamiento con tunicamicina indica que en este caso la glicosilación es un pre-



requisito para la secreción en cantidades normales. Un fenómeno similar ocurre en otros sistemas de secreción de glicoproteínas, tales como los de IgA e IgE (46).

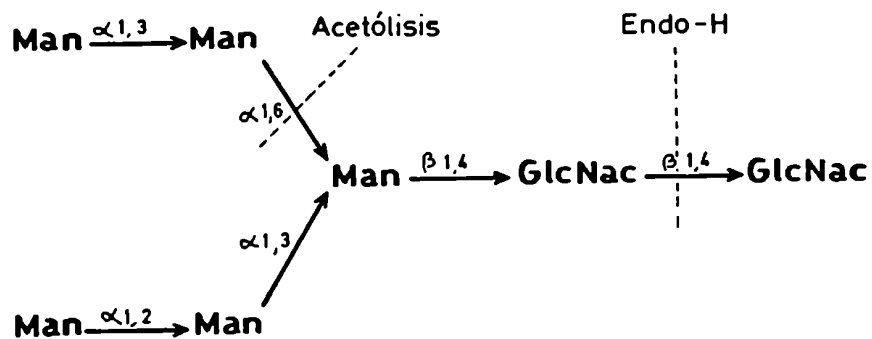
Los resultados también indican que GP17 contiene grupos fosfato unidos a su porción polipeptídica. La fosforilación de GP17 y de otras proteínas epididimarias permite explicar el hallazgo de los péptidos cargados negativamente a pH ácido, obtenidos por proteólisis durante la purificación de los oligosacáridos de "alta manosa" intracelulares. La heterogeneidad de GP17 observada en electroforesis en papel podría deberse a microheterogeneidad en el número de grupos fosfato en las distintas moléculas de glicoproteína. Del mismo modo, se puede especular acerca del contenido escaso o nulo de fosfatos en la fracción que no migró en electroforesis en papel. La presencia de fosfatos no es una característica usual de proteínas secretorias, aunque han aparecido informes de la existencia de proteínas naturalmente fosforiladas, tales como fibrinógeno (29) y parathormona (86). Si bien la co-migración o co-elución de las marcas de  $^{32}\text{P}$  y  $^3\text{H}$  en los diferentes sistemas analíticos no demuestra la coexistencia de manosa y fosfato en una misma molécula, la capacidad de la fosfatasa alcalina de alterar la movilidad de GP17 marcada en el oligosacárido sí es concluyente al respecto.

La porción oligosacáridica de GP17 está suficientemente expuesta en la molécula de GP17 nativa, como fue demostrado por:

- 1) la acción directa de Endo-H sobre GP17 nativa sin ningún pre-tratamiento;
- 2) la unión de GP17 en condiciones nativas a Concanavalina A.

La composición de la porción oligosacáridica conteniendo 2 residuos de GlcNac y 5-6 de manosa no fue sorprendente dado que el 93% del total de

las N-glicoproteínas intracelulares son del tipo de "alta manosa". IgM, otra glicoproteína secretoria, contiene oligosacáridos con la misma composición (25). No es posible establecer, a partir de los experimentos, si las cadenas de azúcar conteniendo diferente número (cinco y seis) de residuos de manosa están presentes en la misma molécula glicoproteica o alternativamente, en diferentes moléculas tratándose de un caso de microheterogeneidad. La composición hallada es consistente con la unión de GP17 a Concanavalina A, la cual es específica para residuos de manosa (36). Aprovechando el conocimiento previo acerca de la estructura general del núcleo o "core", como así también del tipo de uniones glicosídicas comunes a oligosacáridos de "alta manosa" (103), y de acuerdo a los datos obtenidos a partir de acetólisis, la estructura propuesta para  $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$  de GP17 es la siguiente:



Con respecto a la purificación de GP17, ésta resultó simple, ya que el perfil de proteínas secretadas es relativamente sencillo, conteniendo no más de una veintena de proteínas en total. Solamente dos etapas de purificación fueron necesarias: filtración molecular a través de Bio-Gel P-60 y cromatografía de afinidad a Con A, aprovechando su bajo peso molecular y su contenido de oligosacáridos de manosa, respectivamente. La cromatografía de afinidad a Con A demostró además que todas las moléculas de GP17 están glicosiladas, ya que no se halló GP17 marcada en la porción polipeptídica dentro de la fracción proteica incapaz de unirse a Con A. Esto último es además una prueba de que la marcación con  $^{125}\text{I}$  en los residuos tirosina no afectó la accesibilidad del oligosacárido a Con A.

Recientemente, se ha informado el clonado molecular de cDNA de dos proteínas de epidídimo de rata secretadas mayoritarias (18). Aunque la masa molecular de estas proteínas (18,5 KDa) es cercana a la de GP17 y dentro del error experimental, los autores aclaran que dichas proteínas no están glicosiladas. La discrepancia entre dichos resultados y los de esta Tesis no es clara.

#### 4.3.1.2. Unión de GP17 a espermatozoides. Implicancias biológicas

Varios informes han demostrado interacción entre proteínas epididimarias y espermatozoides en varias especies (54,68). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en otros laboratorios son indirectos en el sentido de que utilizaron proteínas epididimarias citosólicas, infiriendo la presencia de éstas sobre la superficie del espermatozoide a partir de evidencias de unión a este tipo de células de anticuerpos dirigidos contra las proteínas

purificadas en cuestión. En el presente trabajo, se encaró la problemática adoptando un enfoque más directo, utilizando proteínas secretadas, ya que es el lumen del epidídimo el sitio donde se produciría la interacción con los espermatozoides. Por otra parte, es un hecho general conocido que las N-glicoproteínas no están localizadas en la fracción soluble intracelular, sino que debido a su génesis y modo de transporte intracelular, están asociadas a estructuras membranosas (101). Un estudio enfocado de manera análoga al presente trabajo es llevado a cabo por Brooks (17). El autor demuestra "binding" del grueso de las proteínas secretadas a espermatozoides y también a glóbulos rojos. Esta unión inespecífica podría ser atribuida, según el autor, a eventuales características hidrofóbicas de dichas proteínas, las que facilitarían su unión a los fosfolípidos de la membrana, independientemente del origen de ésta. De ser así, no sería afectada la función, ya que las únicas células presentes en el lumen epididimario son espermatozoides.

En esta Tesis se demostró la unión específica de GP17 a espermatozoides inmaduros obtenidos de testículo sólo cuando GP17 fue radioiodinada bajo condiciones suaves que no alteraran significativamente su conformación nativa. De acuerdo a experimentos preliminares no incluidos aquí, GP17 no poseería características hidrofóbicas. Además, GP17 fue incapaz de unirse a glóbulos rojos.

La unión resultó ser a un solo tipo de receptores y con alta afinidad. El orden de magnitud de  $K_a$  es comparable a la hallada por Wong (122) para la unión entre una proteína de 32 KDa obtenida de fluido epididimario y espermatozoides. El valor de  $K_a$  del sistema de Wong es  $0,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  y

constituye el único dato de "binding" específico entre proteínas epididimarias y espermatozoides encontrado en la bibliografía, aparte de los resultados del presente estudio. En otros sistemas biológicos no relacionados, las uniones entre proteínas solubles y sus receptores en las superficies celulares también ocurren con afinidad similar; por dar sólo un ejemplo, la  $K_a$  calculada a partir de la unión entre un antígeno proteico soluble y la inmunoglobulina específica de linfocitos B humanos es  $10^8 \text{ M}^{-1}$  (60). Estos valores de  $K_a$  indican que el ligando a una concentración de  $10^{-8} \text{ M}$  ocupa la mitad de los sitios receptores en la célula en cuestión. En el caso de GP17, no es posible calcular la fracción de sitios receptores ocupados en la superficie de la célula espermática, dado que no se conoce la concentración de GP17 en fluido epididimario. Sin embargo, suponiendo que la composición proteica de la fracción secretada hallada en este estudio (GP17 constituyendo un 15% del total) es idéntica a la existente en fluido epididimario, y además tomando el dato de Turner de  $25 \mu\text{g/ml}$  (114) para la concentración proteica total en fluido de cabeza epididimaria, es posible deducir que la concentración de GP17 en fluido epididimario sería aproximadamente  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ , lo que ocasionaría una ocupación prácticamente total de los sitios receptores en el espermatozoide.

Cabe aclarar que el valor de  $K_a$  hallado es válido suponiendo que hasta los 120 minutos de incubación no existe la internalización del ligando con reciclaje de receptor que ocurre en otros sistemas (47). De ocurrir esto último, habría tenido lugar "binding" de más cantidad de GP17 de la que permite el equilibrio en un instante dado, al eliminarse ligando unido del equilibrio, y consecuentemente los cálculos hubieran sobreestimado el ver-

dadero valor de  $K_a$ . Con el fin de descartar dicha posibilidad, habría que realizar experimentos de "binding" a menores temperaturas o con células metabólicamente inactivas.

El hecho de que el "binding" cae luego de haber alcanzado el equilibrio no es fácilmente interpretable. En principio se podría deber o bien a lisis de los espermatozoides, por lo cual se producirían fragmentos de membrana unidos a GP17 y no precipitables por centrifugación, o bien a degradación del ligando marcado a través del tiempo, con la consecuente pérdida de afinidad, como ocurre en el caso del factor de crecimiento derivado de plaquetas (45). Dado que observaciones paralelas permitieron comprobar la integridad de los espermatozoides al terminar las incubaciones, la segunda alternativa podría ser la responsable del fenómeno observado, pero no ha sido verificada.

Los receptores localizados en espermatozoides no dieron reacción cruzada con proteínas ajenas al sistema estudiado. Las aproximadamente 17.000 moléculas receptoras en cada espermatozoide probablemente se hallan ubicadas en la porción acrosomal, ya que ésta es la involucrada en la unión a la zona pellucida del ovocito (84). En el presente trabajo, no se describen experimentos que intenten determinar la localización de dichos receptores, aunque ello sería factible mediante técnicas radioautográficas con células fijadas.

La incapacidad de unión de GP17 a espermatozoides epididimarios puede reflejar la ocupación de sitios por GP17 endógena, lo cual estaría de acuerdo con los resultados de Kohane (55), quien demostró la acumulación progresiva de glicoproteínas sobre la superficie del espermatozoide, a medida de que estas células avanzaban a lo largo del conducto.

La naturaleza acídica de GP17, debido a sus fosfatos, podría contribuir al aumento de densidad de cargas negativas observado en la membrana plasmática de espermatozoides durante el trayecto a través del órgano (124). En este contexto, se sabe que glicoproteínas cargadas negativamente conteniendo ácido siálico están presentes en el fluido epididimario y en la superficie del espermatozoide (113).

La unión de GP17 a espermatozoides inmaduros sugiere la participación de esta glicoproteína en el proceso de maduración espermática que ocurre en el epidídimo. Para la demostración definitiva, habría que realizar experimentos que consistieran en la incubación de GP17 con espermatozoides inmaduros y verificar si luego éstos adquieren capacidad para fertilizar ovocitos homólogos. Aunque cabe aclarar que un resultado negativo no descartaría la participación de GP17, porque es posible que varios factores secretados por el epidídimo, entre ellos GP17, actúen orquestadamente para producir la maduración, es decir, que la unión de GP17 sea un requisito necesario pero no suficiente. Una manera de atacar esta problemática sería mediante experimentos de reconstitución con todos los factores aislados por separado, y así poder sacar conclusiones de aquéllos que son indispensables. Otra alternativa consistiría en evaluar el efecto (negativo) de un anticuerpo dirigido contra GP17 en la eventual capacidad de inducir maduración por parte del conjunto de las proteínas secretadas. Otros laboratorios han dado evidencias de inducción de la maduración espermática por parte de proteínas epididimarias. En efecto, la incubación de espermatozoides funcionalmente inmaduros de hamster (37) y de rata (77) con proteínas de origen epididimario (no bien caracterizadas bioquímicamente) indujo la habilidad de aquellas células germinales de

interactuar con la zona pellucida homóloga, lo cual es un pre-requisito para que la fertilización tenga lugar. Estos resultados, aunque no dan directas evidencias de un "binding", indican la participación de dichas proteínas en el proceso de maduración espermática y sugieren que las mismas están involucradas en el ensamblado o activación de un nuevo sitio receptor para el ovocito sobre la superficie del espermatozoide durante la maduración.

Sería interesante investigar si las cadenas de azúcar de GP17 están involucradas en la unión al espermatozoide, o en la eventual unión del espermatozoide recubierto de GP17 a la zona pellucida del ovocito homólogo.

En cuanto a la dependencia androgénica de GP17, hay evidencias a favor (M.J. Amoroso, comunicación personal), las que según todo lo expuesto anteriormente encajan muy bien con la sabida modulación por andrógenos de funciones epididimarias tales como síntesis de proteínas que se asocian con espermatozoides (55) y adquisición de capacidad fertilizante por parte de espermatozoides (76).

Analizando la bibliografía referente al tema, se observa que ningún trabajo hasta la fecha da evidencias de todos los requisitos que en principio (según las ideas aceptadas hasta ahora) debería reunir una sustancia de origen epididimario para atribuirle un rol en la fertilidad, sino que cada estudio toma aspectos parciales. Tales requisitos pueden ser enunciados como los siguientes:

- 1) detección en fluido epididimario;
- 2) secreción por parte de tejido epididimario;
- 3) unión a espermatozoides;
- 4) detección endógena en la membrana de los espermatozoides;



5) participación en la maduración espermática.

Resumiendo los logros de este trabajo, se puede afirmar que éste aporta evidencias de la interacción con alta afinidad entre una glicoproteína secretoria de epidídimo de rata y receptores presentes en espermatozoides inmaduros, es decir, se demuestran los requisitos 2) y 3) enunciados precedentemente. Estudios ulteriores sobre las características de la unión y la naturaleza de los receptores serán cruciales en la comprensión de los mecanismos moleculares de la maduración espermática.

Los resultados aquí presentados permiten postular el modelo para el rol fisiológico de GP17 que se presenta en la Fig. 4-1, haciendo la salvedad de que más experimentos harían falta para adoptarlo definitivamente como representativo de la realidad, pero mientras tanto dicho modelo puede tener valor predictivo en el diseño de nuevos experimentos.

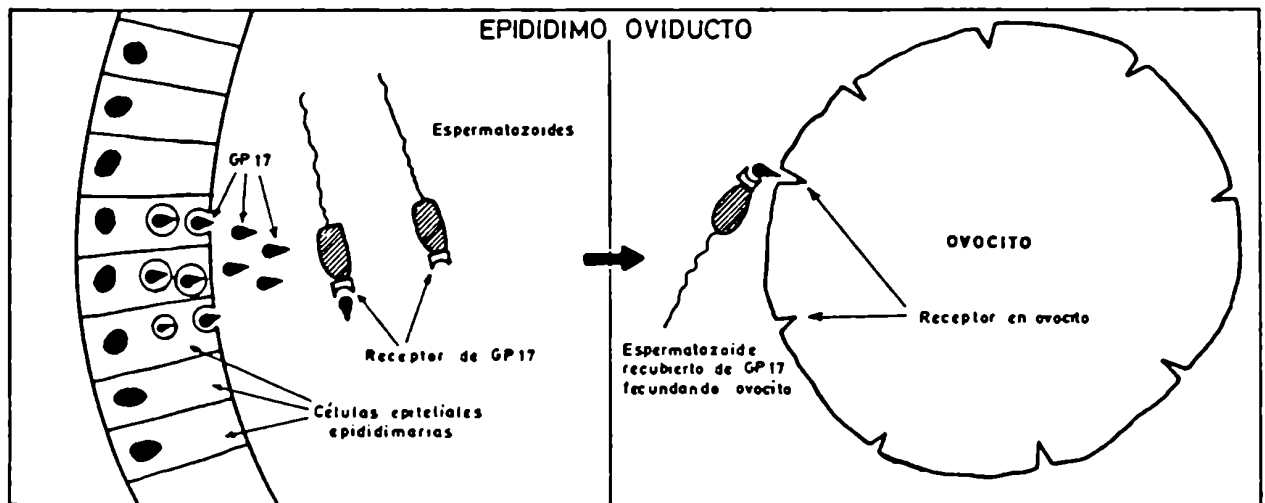


Fig. 4-1: Modelo propuesto para la acción de GP17.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) Los niveles de actividad de GDP-manosa:Dol-P manosil transferasa de epidídimo de rata estên sujetos a control androgénico.
- 2) La incorporación de manosa a partir de GDP-manosa en Dol-PP-oligosacáridos y en glicoproteínas está también regulada por andrógenos.
- 3) Los niveles de Dol-P endógeno, al igual que los de Dol-P fosfatasa y Dol fosfoquinasa, no sufren modificaciones significativas frente a las variaciones de los tenores androgénicos.
- 4) Los oligosacáridos unidos a Dol-PP producidos más abundantemente en epidídimo en condiciones semejantes a las fisiológicas fueron en orden decreciente:  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ .
- 5) El epidídimo contiene una grán proporción de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente a proteínas intracelulares, siendo el 93% del tipo "alta manosa".
- 6) Los oligosacáridos de "alta manosa" unidos a proteínas intracelulares epididimarias -hallados en condiciones similares a las "in vivo"- son de orden decreciente de abundancia:  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .
- 7) El epidídimo de rata sintetiza y secreta una N-glicoproteína de masa molecular relativa igual a 17.000, que constituye el 15% de todas las proteínas secretadas, llamada en este trabajo de Tesis "GP17".
- 8) GP17 es la N-glicoproteína secretada más ampliamente mayoritaria.
- 9) GP17 fue purificada del medio de incubación mediante filtración molecular por geles y cromatografía de afinidad a Concanavalina A.

- 10) GP17 contiene oligosacáridos de "alta manosa" con las composiciones  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ , los cuales parecen ser indispensables para que el proceso de secreción tenga lugar.
- 11) GP17 está fosforilada en la porción proteica.
- 12) GP17 se une específicamente con alta afinidad ( $K_a=0,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ) a receptores presentes en espermatozoides testiculares inmaduros.

W. J. J. J. Robert

REFERENCIAS

- 1) Adamany, A.M. & Spiro, R.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2830-2841.
- 2) Alperín, D.M., Idoyaga-Vargas, V.P. & Carminatti, H. (1986) J. Neurochem. 47, 355-362.
- 3) Anderson, J.S., Matsushashi, M., Haskin, M.A. & Strominger, J.L. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 53, 881-889.
- 4) Baccetti, B., Bigliardi, E. & Burrini, A.G. (1978) Develop. Biol. 63, 187-196.
- 5) Bar-Shavit, Z., Ofek, I., Goldman, R., Mirelman, D. & Sharon, N. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 455-460.
- 6) Becker, J.W., Cunningham, B.A., Reeke, G.H. Jr., Wang, J.L. & Edelman, G.M. (1976) en: "Concanavalin A as a tool" (Bittiger, H. & Schnebli, H.P., eds.) pp. 33-54, Wiley, Londres.
- 7) Bedford, J.M. (1975) en: "Handbook of physiology", sección 7, vol. 5 (Hamilton, D.W. & Greep, R.O., eds.) pp. 303-317, American Physiological Society, Washington, D.C.
- 8) Behrens, N.H. & Leloir, L.F. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 153-159.
- 9) Belocopitow, E. & Boscoboinik, D. (1982) Eur. J. Biochem. 125, 167-173.
- 10) Berger, E.G., Buddecke, E., Kamerling, J.P., Kobata, A., Paulson, J.C. & Vliegenthart, J.F.G. (1982) Experientia 38, 1129-1158.
- 11) Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975) J. Cell. Biol. 67, 852-862.
- 12) Boscoboinik, D.O. (1985) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 13) Boscoboinik, D.O. & Belocopitow, E. (1981) Anal. Biochem. 114, 42-45.
- 14) Bray, G.A. (1960) Anal. Biochem. 1, 279-285.
- 15) Brooks, D.E. (1976) Biochem. J. 156, 527-537.
- 16) Brooks, D.E. (1981) Biol. Reprod. 25, 1099-1117.

- 17) Brooks, D.E. (1983) Gamete Res. 4, 367-376.
- 18) Brooks, D.E., Means, A.R., Wright, E.J., Singh, S.P. & Tiver, K.K. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4956-4961.
- 19) Burgos, J., Hemming, F.W., Pennock, J.F. & Morton, R.A. (1963) Biochem. J. 88, 470-482.
- 20) Burton, K. (1956) Biochem. J. 62, 315-323.
- 21) Burton, W.A., Lucas, J.J. & Waechter, J.C. (1981) J. Biol. Chem. 256, 632-635.
- 22) Campbell, P.N., Brown, P. & McIlreavy, D. (1976) Biochem. Education 4, 30-32.
- 23) Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E. & Paladini, A.C. (1950) J. Biol. Chem. 184, 333-350.
- 24) Chamberlain, J.P. (1979) Anal. Biochem. 98, 132-135.
- 25) Chapman, A. & Kornfeld, R. (1979) J. Biol. Chem. 254, 816-823.
- 26) Chapman, A., Li, E. & Kornfeld, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10243-10249.
- 27) Courtens, J.L. & Fournier-Delpech, S. (1979) J. Ultrastructure Res. 68, 136-148.
- 28) Dawson, R.M.C., ed. (1979) en: "Data for Biochemical Research" pp. 103-121, Clarendon Press, Oxford.
- 29) Doolittle, R.F., Watt, K.W., Cottrell, B.A., Strong, D.D. & Riley, M. (1979) Nature (Lond.) 280, 464-468.
- 30) Elbein, A.D. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 219-221.
- 31) Folch, J., Lees, M. & Sloane, S.G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- 32) Fraker, P.J. & Speck, J.C. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80,

- 849-857.
- 33) Garberi, J.C., Fontana, J.D. & Blaquier, J.A. (1982) *Int. J. Androl.* 5, 619-626.
  - 34) Garberi, J.C., Kohane, A.C., Cameo, M.S. & Blaquier, J.A. (1979) *Mol. Cell. Endocrinol.* 13, 73-82.
  - 35) Gibson, R., Kornfeld, S. & Schlesinger, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 456-462.
  - 36) Goldstein, I.J. (1976) en: "Concanavalin A as a tool" (Bittiger, H. & Schnebli, H.P., eds.) pp. 55-65, Wiley, Londres.
  - 37) González Echeverría, M.F., Cuasnicú, R.S., Piazza, A., Piñeiro, L. & Blaquier, J.A. (1984) *J. Reprod. Fert.* 71, 433-437.
  - 38) Gottschalk, A. (1960) en: "The chemistry and biology of sialic acids and related substances", Cambridge Univ. Press, Londres.
  - 39) Gottschalk, A. (1972) en: "Glycoproteins. Their composition, structure and function" (Gottschalk, A., ed.) pp. 24-30, Elsevier, Amsterdam.
  - 40) Gottschalk, A. (1972) en: "Glycoproteins. Their composition, structure and function" (Gottschalk, A., ed.) pp. 417, Elsevier, Amsterdam.
  - 41) Grinna, L.S. & Robbins, P.W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8814-8818.
  - 42) Hamilton, D.W. (1975) en: "Handbook of Physiology", sección 7, vol. 5 (Hamilton, D.W. & Greep, R.O., eds.) pp. 259-301, American Physiological Society, Washington DC.
  - 43) Hamilton, D.W. (1980) *Biol. Reprod.* 23, 377-385.
  - 44) Harpaz, N. & Schachter, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4894-4902.
  - 45) Heldin, C.H., Westermark, B. & Wasteson, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 3664-3668.

- 46) Hickman, S., Kulczycki, A., Lynch, R.G. & Kornfeld, S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4402-4408.
- 47) Howard, J.C. (1985) *Nature (Lond.)* 314, 494-495.
- 48) Hubbard, S.C. & Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50, 555-583.
- 49) Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4568-4576.
- 50) Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11782-11793.
- 51) Hunter, T., Sefton, B.M. & Cooper, J.A. (1981) en: "Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation", vol. 8 ("Protein phosphorylation") (Rosen, O.M. & Krebs, E.G., eds.) pp. 1190-1202, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- 52) Kean, E.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5622-5629.
- 53) Kocourek, J. & Ballou, C.E. (1969) *J. Bacteriol.* 100, 1175-1181.
- 54) Kohane, A.C., Garberi, J.C., Cameo, M.S. & Blaquier, J.A. (1979) *J. Steroid Biochem.* 11, 671-674.
- 55) Kohane, A.C., González Echeverría, F.M., Piñeiro, L. & Blaquier, J.A. (1980) *Biol. Reprod.* 23, 737-742.
- 56) Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 217-237.
- 57) Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 1-34, Plenum Press, Nueva York.
- 58) Kornfeld, S., Li, E. & Tabas, I. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7771-7778.
- 59) Laemmli, U.K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680-685.
- 60) Lanzavecchia, A. (1985) *Nature* 314, 537-539.
- 61) Laskey, R.A. & Mills, A.D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 335-341.
- 62) Lehninger, A.L. (1970) en: "Biochemistry" pp. 680, Worth Publishers,



Nueva York.

- 63) Li, C.H. (1942) J. Am. Chem. Soc. 64, 1147-1152.
- 64) Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7762-7770.
- 65) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 66) Lucas, J.J. & Levin, E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4330-4336.
- 67) Mier, J.W. & Gallo, R.C. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 6134-6138.
- 68) Moore, H.D.M. (1980) Biol. Reprod. 22, 705-718.
- 69) Morell, A.G., Irvine, R.A., Sternlieb, I., Scheinberg, I.H. & Ashwell, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 155-159.
- 70) Morr e, D.J. (1971) en: "Methods in Enzymology" (Jacoby, W.B., ed.) vol. XXII, pp. 130-148, Academic Press, Nueva York.
- 71) Neufeld, E.F., & Ashwell, G. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 241-266, Plenum Press, Nueva York.
- 72) Nicolson, G.L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. & Smith, J.R. (1977) J. Cell. Biol. 74, 950-962.
- 73) Olden, K., Bernard, B.A., Humphries, M.J., Yeo, T-K., Yeo, K-T., White, S.L., Newton, S.A., Bauer, H.C. & Parent, J.B. (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 78-82.
- 74) Olden, K., Parent, J.B. & White, S.L. (1982) Biochim. Biophys. Acta 650, 209-232.
- 75) Opheim, D.J., Touster, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1017-1023.
- 76) Orgebin-Crist, M.C., Danzo, B.J. & Davies, J. (1975) en: "Handbook of

- Physiology", sección 7, vol. 5 (Hamilton, D.W. & Greep, R.O., eds.) pp. 319-338, American Physiological Society, Washington, DC.
- 77) Orgebin-Crist, M.C. & Fournier Delpech, S. (1982) *J. Androl.* 3, 429-433.
- 78) Palade, G. (1975) *Science* 189, 347-358.
- 79) Parodi, A.J. (1986) en: "Bioquímica y Biología Molecular; temas de actualidad para graduados" (Ochoa, S., Leloir, L.F., Oro, J. & Sols, A., eds.) pp. 159-166, Salvat, Barcelona.
- 80) Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. & Carminatti, H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3268-3272.
- 81) Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 599, 1-37.
- 82) Parodi, A.J., Mordoh, J., Krisman, C.R. & Leloir, L.F. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 132, 111-117.
- 83) Parodi, A.J., Quesada-Allue, L.A. & Cazzulo, J.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6201-6205.
- 84) Phillips, D.M. (1975) en: "Handbook of Physiology", sección 7, vol. 5 (Hamilton, D.W. & Greep, R.O., eds.) pp. 405-419, American Physiological Society, Washington, DC.
- 85) Pledger, W.J., Hart, C.A., Locatelli, K.L. & Scher, C.D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4358-4362.
- 86) Rabbani, S.A., Kremer, R., Bennett, H.P. & Goltzman, D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2949-2955.
- 87) Rearick, J.I., Chapman, A. & Kornfeld, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6255-6261.
- 88) Rip, J.W. & Carroll, K.K. (1982) *Can. J. Biochem.* 60, 36-41.
- 89) Rosenberg, S.A., Grimm, E.A., McGrogan, M., Doyle, M., Kawasaki, E.,

- Kohts, K. & Mark, D.F. (1984) *Science* 223, 1412-1415.
- 90) Rossignol, D.P., Lennarz, W.J. & Waechter, C.J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10538-10542.
- 91) Rothman, J.E. & Lodish, H.F. (1977) *Nature* 269, 775-780.
- 92) Rotundo, R.L. & Fambrough, M. (1980) *Cell* 22, 595-602.
- 93) Rugar, C.A. & Carroll, K.K. (1978) *Lipids* 13, 291-293.
- 94) Rugar, C.A., Rip, J.W., Chaudhary, N. & Carroll, K.K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3090-3094.
- 95) Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. & Adesnik, M. (1982) *J. Cell. Biol.* 92, 1-22.
- 96) Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- 97) Schachter, H. (1978) en: "The glycoconjugates" (Horowitz, M.I. & Pigman, W., eds.) vol. II, pp. 87-181, Academic Press, Nueva York.
- 98) Schachter, H., McGuire, E.J. & Roseman, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5321-5328.
- 99) Schachter, H. & Roseman, S. (1980) en: "The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans" (Lennarz, W.J., ed.) pp. 85-160, Plenum Press, Nueva York.
- 100) Schur, B.A. & Hall, N.G. (1982) *J. Cell. Biol.* 95, 574-579.
- 101) Sharon, N. & Lis, H. (1981) *Chem. Eng. News* 59, 21-44.
- 102) Siegel, L.M. & Monty, K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 346-362.
- 103) Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1982) *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 12, 289-326.
- 104) Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7779-7786.
- 105) Tabas, I. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11655-11663.

- 106) Tabas, I. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 6633-6639.
- 107) Tarentino, A.L. & Maley, F. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 811-817.
- 108) Tartakoff, A.M. (1982) *Trends Biochem. Sci.* 7, 125.
- 109) Tavares, I.A. & Hemming, F.W. (1982) *Eur. J. Biochem.* 122, 591-599.
- 110) Tezón, J.G. (1982) Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- 111) Thomas, J.A., Schlender, K.K., Larner, J. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 486-499.
- 112) Thomas, J.O. (1978) en: "Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry", B106, pp. 1-22, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 113) Toowicharanont, P. & Chulavatnatol, M. (1983) *J. Reprod. Fert.* 67, 133-141.
- 114) Turner, T.T., Plesums, J.L. & Cabot, C.L. (1979) *Biol. Reprod.* 21, 883-890.
- 115) Tymoczko, J.L., Liang, T. & Liao, S. (1978) en: "Receptors and hormone action" (O'Malley, B.W. & Birnbaumer, L., eds) pp. 121-156, Academic Press, Nueva York.
- 116) Ugalde, R.A., Staneloni, R.J. & Leloir, L.F. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1174-1181.
- 117) Venter, J.C. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4842-4848.
- 118) Voglmayr, J.K. (1975) en "Handbook of Physiology", sección 7, vol. 5 (Hamilton, D.W. & Greep, R.O., eds.) pp. 437-451, American Physiological Society, Washington, DC.
- 119) Wenstrom, J.C. & Hamilton, D.W. (1980) *Biol. Reprod.* 23, 1054-1059.
- 120) Williams, D.B. & Lennarz, W.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5105-5114.
- 121) Winer, B.J. (1971) en: "Statistical principles in experimental design"

pp. 191-197, McGraw-Hill, Nueva York.

122) Wong, P.Y.D. & Tsang, A.Y.F. (1982) Biol. Reprod. 27, 1239-1246.

123) Wright, A., Dankert, M. & Robbins, P.W. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54, 235-241.

124) Yanagimachi, R., Noda, Y.D., Fujimoto, M. & Nicolson, G.L. (1972) Amer. J. Anat. 135, 497-520.

125) Yosizawa, Z. (1972) en: "Glycoproteins. Their composition, structure and function" (Gottschalk, A., ed.) pp. 1000-1018, Elsevier, Amsterdam.