

## Tesis de Posgrado

# Mecanismos básicos de glicosilación de proteínas en neoplasia mamaria humana

Santa Cruz, Ana Rosa

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:**

Santa Cruz, Ana Rosa. (1987). Mecanismos básicos de glicosilación de proteínas en neoplasia mamaria humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2049\\_SantaCruz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2049_SantaCruz.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Santa Cruz, Ana Rosa. "Mecanismos básicos de glicosilación de proteínas en neoplasia mamaria humana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2049\\_SantaCruz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2049_SantaCruz.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MECANISMOS BASICOS DE GLICOSILACION  
DE PROTEINAS EN NEOPLASIA MAMARIA HUMANA

por

ANA ROSA SANTA CRUZ

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Director de Tesis: Dr. ALBERTO BALDI

1986

INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

- 2049 -  
g. 2



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Baldi, quien me hizo descubrir la magia de investigar. Por permitirme desarrollar mi propio estilo de trabajo. Por comprender y respetar mis decisiones.

Al Dr. Luis Quesada, que me introdujo en el estudio de los lípido-azúcares. Por guiarme en los tramos finales de este trabajo, en momentos difíciles de mi carrera. Por su confianza y su aliento. Por todas las horas que me dedicó.

Al Dr. Carlos Enriori, con quien me inicié profesionalmente. Por permitirme descubrir mi propio camino. Por su rectitud profesional. Por su calidez humana.

Al Dr. Eduardo Charreau, consejero de estudios, por su valiosa guía.

A la Dra. Estela Medrano, quien con su apoyo y consejos posibilitó la realización de los trabajos con cultivos celulares.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental, por permitirme llevar a cabo mis tareas de investigación. A todo su personal.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", por brindarme la posibilidad de realizar allí la parte final de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Nora Rosemlit, Héctor Martínez, Sofía Ivanier, Martín Crespi y Silvia Sobrado, por ayudarme a disfrutar del trabajo con su alegría, su entusiasmo, sus consejos y su afecto.

A Rodolfo, por su apoyo incondicional a mi realización personal y profesional. Por su falta de reclamos. Por toda su capacidad de dar.

## INDICE

### I. INTRODUCCION

I.1. Glicoproteínas.....	1
I.1.1. Generalidades.....	1
I.1.2. Enlaces O-glicosídicos.....	3
I.1.3. Enlaces N-glicosídicos.....	6
I.1.3.1. Oligosacáridos simples.....	6
I.1.3.2. Oligosacáridos complejos.....	9
I.1.3.3. Oligosacáridos híbridos.....	9
I.1.4. Lípidos intermediarios en la glicosilación de proteínas.....	10
I.1.4.1. Dolicol: el lípido transportador.....	11
I.1.4.2. Iniciación de la cadena sacarídica.....	13
I.1.4.3. Elongación de la cadena sacarídica.....	13
I.1.4.4. Transferencia del lípido transportador a proteínas.....	17
I.1.4.4.a. Lípido-oligosacáridos dono- res.....	17
I.1.4.4.b. Proteínasceptoras.....	18
I.1.4.4.c. Localización subcelular.....	20
I.1.4.5. Procesamiento de los oligosacáridos <u>uni</u> dos a proteínas.....	22
I.1.4.5.a. Control del procesamiento...	29
I.1.4.6. Regulación de la síntesis de glicopro- teínas.....	31

I.1.4.7. Inhibidores de la glicosilación.....	34
I.2. Tejido mamario normal y tumoral. Líneas celulares derivadas de carcinomas mamaros.....	38
I.2.1. Glándula mamaria.....	38
I.2.2. Tumores mamaros.....	39
I.2.3. Heterogeneidad tumoral.....	40
I.2.4. Efecto de los estrógenos sobre tejidos mamaros.	41
I.2.5. Líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.....	43
I.3. Objetivos del presente trabajo de Tesis.....	44
II. MATERIALES Y METODOS	
II.1. Drogas y sustratos.....	49
II.2. Tejido utilizado.....	50
II.2.A. Tejido mamario.....	50
II.2.A.1. Incubaciones de cortes de tejido....	51
II.2.A.2. Preparación de fracciones ricas en microsomas.....	52
II.2.A.3. Incubaciones con microsomas.....	53
II.2.A.4. Procesamiento de los incubados.....	54
II.2.B. Líneas celulares.....	56
II.2.B.1. Técnicas de cultivo.....	57
II.2.B.2. Determinación del número de células.	59
II.2.B.3. Curvas de crecimiento.....	59
II.2.B.4. Incubación de las células con azúcares radiactivos y <sup>35</sup> S-metionina.....	60

II.2.B.5. Procesamiento de los incubados.....	62
II.2.B.6. Ensayos con tunicamicina.....	64
II.2.B.7. Ensayos de actividad de doliquil-ki nasa.....	64
II.2.B.7.a. Preparación de fraccio- nes ricas en microsomas	65
II.2.B.7.b. Incubaciones con micro- somas.....	65
II.3. Preparación de proteína "transportadora".....	66
II.4. Preparación de Dol-PP-oligosacárido.....	67
II.5. Preparación de 5-carboximetil- $\alpha$ -lactalbúmina.....	68
II.6. Preparación de suero fetal bovino libre de esteroides	68
II.7. Hidrólisis ácida suave.....	69
II.8. Hidrólisis con fenol.....	70
II.9. Métodos cromatográficos.....	70
II.9.1. Cromatografía sobre papel.....	70
II.9.2. Cromatografía sobre capa delgada.....	71
II.9.3. Cromatografía de intercambio iónico.....	72
II.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	74
II.11. Análisis espectrofotométrico de proteínas.....	74
II.12. Medición de radiactividad.....	75

### III. RESULTADOS

III.A. Estudios sobre tumores mamarios humanos.....	77
III.A.1. Biosíntesis de poliprenil azúcares en cor- tes de tejido mamario.....	77



III.A.2. Glicosilación de proteínas a través de poliprenil- azúcares en sistemas libres de células.....	84
III.A.2.1. Transferencia de $^{14}\text{C}$ -Man desde $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ - Man a poliprenil fosfato azúcares.....	84
III.A.2.1.1. Caracterización de los pro ductos radiomarcados.....	85
III.A.2.1.1.a. Fase inferior de la partición de Folch	85
Tratamiento ácido.....	85
Tratamiento fenólico..	86
Cromatografía de inter cambio iónico.....	87
Cromatografía sobre ca pa delgada.....	87
Cromatografía sobre pa pel.....	91
III.A.2.1.1.b. Extracto C/M/A 10:10:3.....	95
Tratamiento ácido.....	95
Cromatografía de inter cambio iónico.....	96
Cromatografía sobre pa pel.....	96
III.A.2.1.1.c. Fase superior de la partición de Folch	99
III.A.2.1.2. Características de la trans ferencia de Man a lípido- azúcares y glicoproteínas.	101
III.A.2.1.2.a. Agregado de lípidos exógenos.....	101
III.A.2.1.2.b. Concentra ción de proteína.....	106
III.A.2.1.2.c. Concentra ción de detergente....	110

III.A.2.1.2.d. Relación en tre la concentración de proteína y de deter gente.....	112
III.A.2.1.2.e. Cinética...	115
III.A.2.1.2.f. Efecto del pH	117
III.A.2.1.2.g. Temperatura	118
III.A.2.2. Transferencia de $^{14}\text{C}$ -Glc desde UDP- $^{14}\text{C}$ - Glc a poliprenil fosfato azúcares y GP.	119
III.A.2.2.1. Caracterización de los pro ductos radiomarcados.....	120
III.A.2.2.1.a. Fase inferior de la partición de Folch	120
Tratamiento ácido.....	120
Cromatografía de inter cambio iónico.....	121
Cromatografía sobre ca pa delgada.....	122
Cromatografía sobre pa pel.....	123
III.A.2.2.1.b. Extracto C/M/A 10:10:3.....	124
Tratamiento ácido.....	124
Cromatografía de inter cambio iónico.....	124
Cromatografía sobre pa pel.....	125
III.A.2.2.2. Características de la trans ferencia de Glc a lípido- azúcares y glicoproteínas.	127
III.A.2.2.2.a. Agregado de lípidos exógenos.....	127
III.A.2.2.2.b. Temperatura	130
III.A.2.2.2.c. Relación en tre la concentración de proteína y de deter gente.....	132

III.A.2.3. Transferencia de $^{14}\text{C}$ -GlcNAc desde UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc a fracciones lipídicas y glicoproteínas.....	135
III.A.2.4. Biosíntesis de glicoproteínas.....	136
III.A.2.4.1. Glicosilación de proteínas a partir de nucleótido-azúcares.....	136
III.A.2.4.2. Glicosilación de proteínas a partir de doliquil derivados. Transferencia del oligosacárido desde Dol-PP-oligosacárido a proteínas aceptoras endógenas.....	140
III.A.2.4.2.a. Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de incubaciones de cortes de oviducto de gallina con $^{14}\text{C}$ -Glc	141
III.A.2.4.2.b. Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de incubaciones de microsomas de oviducto con nucleótido azúcares radiactivos.....	148
III.A.2.4.2.c. Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de incubaciones de cortes de tiroides bovina con $^{14}\text{C}$ -Glc....	154
III.B. Estudios sobre líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.....	158
III.B.1. Estudios sobre la línea celular T47D.....	159
III.B.1.1. Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Glc a fracciones lipídicas y glicoproteínas en células T47D-cl1. Caracteriza	

	ción primaria de los lípido- azúcares formados. Efecto de E <sub>2</sub> y Naf.....	159
III.B.1.2.	Efecto de E <sub>2</sub> , Naf y Tam sobre la incorporación de <sup>14</sup> C-Glc a fracciones lipídicas y GP en células T47D-cll.....	165
III.B.1.3.	Ensayos de dosis-respuesta de E <sub>2</sub> y Naf sobre la incorpora- ción de <sup>14</sup> C-Glc en T47D-cll...	166
III.B.1.4.	Influencia del E <sub>2</sub> luego del tratamiento con Naf y Tam so- bre la incorporación de <sup>14</sup> C- Glc en células T47D-cll.....	168
III.B.1.5.	Incorporación de <sup>3</sup> H-Man, <sup>3</sup> H- GlcN y <sup>14</sup> C-Glc en células T47D-cll y c8 .....	171
III.B.1.6.	Incorporación de <sup>14</sup> C-Glc en cé- lulas T47D-cll cultivadas en medio definido I.....	175
III.B.1.7.	Efecto de E <sub>2</sub> , Naf y Tam sobre la incorporación de <sup>3</sup> H-Man en células T47D-cll y T47D-c8 cul- tivadas en medio definido I...	178
III.B.1.8.	Efecto de la P sobre la incor- poración de azúcares radiacti- vos en células T47D-cll.....	179
III.B.1.9.	Efecto de la tunicamicina so- bre células T47D-cll.....	184
	III.B.1.9.1. Efecto sobre el crecimiento celular.....	184

III.B.1.9.2. Efecto sobre la incorporación de $^{35}\text{S}$ -metionina a proteínas.....	185
III.B.1.9.3. Efecto sobre la incorporación de azúcares a glicoproteínas.....	186
III.B.1.10. Ensayos de actividad de doli- quil-kinasa en microsomas ais- lados de células T47D-cll....	189
III.B.1.11. Análisis de los productos ra- diomarcados provenientes de incubaciones de células T47D- cll con $^{14}\text{C}$ -Glc y $^{35}\text{S}$ -Met. E- fectos de $\text{E}_2$ y Tam.....	191
III.B.1.11.1. Incubaciones con $^{14}\text{C}$ -Glc...	193
III.B.1.11.1.a. Medio de cultivo (I).....	195
III.B.1.11.1.b. Fase supe- rior (II).....	196
III.B.1.11.1.c. Fase infe- rior (III).....	197
III.B.1.11.1.d. Extracto C/M/A 10:10:3 (VII)...	208
III.B.1.11.1.e. Lavados con TCA (IX y X).....	210
III.B.1.11.2. Incubaciones con $^{35}\text{S}$ -Met...	210
III.B.1.11.2.a. Medio de cultivo (I).....	212
III.B.1.11.2.b. Fase supe- rior (II).....	214
III.B.1.11.2.c. Fase infe- rior (III).....	215
III.B.1.11.2.d. Extracto C/M/A 10:10:3 (VII)..	218
III.B.1.12. Análisis de los productos ra-	

diomarcados provenientes de incubaciones de células T47D-X con $^{14}\text{C}$ -Glc y $^{35}\text{S}$ -Met, Efectos de $\text{E}_2$ y Tam.....	218
III.B.1.12.1. Incubaciones con $^{14}\text{C}$ -Glc....	219
III.B.1.12.1.a. Fase inferior (III).....	220
III.B.1.12.1.b. Extracto C/M/A 10:10:3 (VII)..	227
III.B.1.12.2. Incubaciones con $^{35}\text{S}$ -Met....	228
III.B.1.12.2.a. Medio de cultivo (I).....	231
III.B.1.12.2.b. Fase superior (II).....	233
III.B.1.12.2.c. Fase inferior (III).....	235
III.B.1.12.2.d. Lavados con FST 4 mM $\text{Cl}_2\text{Mg}$ (IV) FST (V) y metanol (VI)	240
III.B.2. Estudios sobre la línea celular MCF-7.....	241
III.B.2.1. Incorporación de $^3\text{H}$ -GlcNa a fracciones lipídicas y glicoproteínas. Efecto de $\text{E}_2$ y Tam.....	241
III.B.2.2. Análisis de los productos radiomarcados provenientes de incubaciones con $^{14}\text{C}$ -Glc. Efecto de $\text{E}_2$ y Tam....	242
III.B.2.2.1. Medio de cultivo (I)..	246
III.B.2.2.2. Fase superior (II)....	247
III.B.2.2.3. Fase inferior (III)...	248
III.B.2.2.4. Extracto C/M/A 10:10:3 (VII).....	253
III.B.2.2.5. Lavados con TCA (IX y X)	253

IV. DISCUSION .....	255
V. CONCLUSIONES.....	293
VI. REFERENCIAS .....	296
VII. ABREVIATURAS .....	320

## I. INTRODUCCION

### I.1. GLICOPROTEINAS

#### I.1.1. GENERALIDADES

Durante mucho tiempo se consideró que las proteínas y los hidratos de carbono eran distintas clases de productos naturales no relacionados. Se realizaron muchos esfuerzos tendientes a remover los azúcares que "impurificaban" preparaciones proteicas o las proteínas "contaminantes" que acompañaban a polisacáridos. Sólo en las dos últimas décadas se comprendió que las glicoproteínas (o sea proteínas con azúcares unidos covalentemente) estaban presentes como tales en todos los organismos vivientes, con la posible excepción de las bacterias. En realidad, la mayor parte de las proteínas son glicoproteínas.

Existen claras evidencias de que la porción sacarídica de las glicoproteínas cumple importantes roles biológicos: estabilización de la conformación proteica, especificación de los grupos sanguíneos, control de la vida media de las glicoproteínas en el sistema circulatorio y control del reconocimiento de las glicoproteínas por las células. En tal sentido los carbohidratos de las glicoproteínas de la membrana celular jugarían un papel crucial en la diferenciación, crecimiento y reconocimiento intercelular y estarían involucrados en muchos procesos patológicos, incluidos los neoplásicos.



Las glicoproteínas se encuentran en las células en forma libre y unidas a membrana, así como en los fluidos extracelulares y en la matriz intercelular. Incluyen enzimas, inmunoglobulinas, transportadores, hormonas, toxinas, lectinas y proteínas estructurales. De las sesenta proteínas identificadas en el suero humano sólo la albúmina y la prealbúmina no contienen azúcares.

En las glicoproteínas aparecen once monosacáridos de los doscientos presentes en la naturaleza. La mayor parte son hexosas o derivados simples como las N-acetilhexosaminas y los ácidos urónicos. También son constituyentes de las glicoproteínas una deoxihexosa (L-fucosa) y dos pentosas (L-arabinosa y L-xilosa). En su mayor parte los monosacáridos pertenecen a la serie D.

Los carbohidratos están unidos a la cadena polipeptídica por uniones covalentes que sólo involucran cinco aminoácidos: asparagina, serina, treonina, 4-hidroxilisina y 4-hidroxiprolina, estos dos últimos poco frecuentes en la naturaleza.

El número y el tamaño de las cadenas oligosacarídicas en las diferentes glicoproteínas es muy variable pudiendo encontrarse desde 1 % de carbohidratos (colágeno) a 85 % (glicoproteínas determinantes de los grupos sanguíneos)(1).

La cadena polipeptídica de las glicoproteínas se sintetiza en igual forma que en las proteínas no glicosiladas, estando su estructura determinada por el código genético. En consecuencia, todas las moléculas de una proteína dada son idénti-

cas. En contraste, los oligo y polisacáridos, libres o unidos a proteínas, no son productos génicos primarios. Son sintetizados por enzimas conocidas como glicosiltransferasas en ausencia de todo templado. Este tipo de síntesis es menos exacta y tiene como resultado la microheterogeneidad en la porción sacarídica de las glicoproteínas. Glicoproteínas con idéntica cadena polipeptídica pueden diferir en su porción hidrocarbonada. Por ejemplo, la porción de carbohidratos de preparaciones de ovoalbúmina altamente purificada consiste en la mezcla de nueve estructuras diferentes unidas en la misma posición de la cadena polipeptídica. Similarmente, la glicoproteína ácida alfa 1 tiene al menos 19 estructuras de carbohidratos unidas a cinco sitios de la cadena peptídica. La microheterogeneidad representa un problema especial en la purificación y caracterización de las glicoproteínas. Por añadidura, se ha demostrado que además de su formación enzimática los azúcares pueden adicionarse en forma química, no enzimática, a las proteínas in vivo (1).

#### I.1.2. ENLACES O-GLICOSIDICOS

En muchas glicoproteínas, particularmente las mucinas, las cadenas oligosacarídicas están unidas al péptido a través de un enlace O-glicosídico entre N-acetilgalactosamina y serina o treonina. En la Tabla 1 se muestra la estructura de un grupo de glicopéptidos en los cuales la GalNAc es el azúcar de unión.

Estructura	Glicoproteína
<p>A</p> $\text{NANA} \xrightarrow{\alpha 2,6} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)}$	<p>Mucinas submaxilares</p>
<p>B</p> $\text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)}$	<p>IgA1 humana, subunidad <math>\beta</math> de HCG, keratan sulfato de cartílago, membranas de linfocitos, RBC y de glóbulos de grasa de leche,</p>
<p>C</p> $\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)} \\ \uparrow \alpha 2,3 \\ \text{NANA} \end{array}$	<p>Células de melanoma B<sub>16</sub>, kininógeno bovino.</p>
<p>D</p> $\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{1,3} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)} \\ \uparrow \alpha 2,3 \\ \text{NANA} \end{array}$	<p>Fetuina, kininógeno bovino, cerebro de rata, sialoglico proteína de membranas RBC.</p>
<p>E</p> $\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3(4)} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1,2(4,6)} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3(4)} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)} \\ \uparrow \alpha 2,3 \\ \text{NANA} \end{array}$	<p>Epiglicanina.</p>
<p>F</p> $\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{1,3} \text{GlcNAc} \xrightarrow{1,3} \text{Gal} \xrightarrow{1,3} \text{GalNAc} \text{---} \text{Ser(Thr)} \\ \uparrow 1,6 \\ \text{GlcNAc} \\ \uparrow 1,4 \\ \text{Gal} \end{array}$	<p>Mucina gástrica humana, núcleo de las sustancias de los grupos sanguíneos de perro y hombre.</p>

**TABLA 1:** Glicopéptidos unidos a través de GalNAc al grupo hidroxilo de serina o treonina Tomada de (18).

En estos glicopéptidos la GalNAc puede tener diferentes sustituyentes: A)  $\alpha$ 2,6 NANA en las mucinas submaxilares (2); B)  $\beta$ 1,3 Gal como en la IgA1 humana (3), la subunidad  $\beta$ 3 de la gonadotropina coriónica humana (4) y en membranas de linfocitos de cerdo (5). A su vez la Gal puede tener distintos sustituyentes: C)  $\alpha$ 2,3 NANA como en las células del melanoma murino B<sub>16</sub> (6) y el kininógeno bovino (7) y D, E y F) otras secuencias sacarídicas más complejas como las involucradas en los grupos sanguíneos (8).

También existen enlaces O-glicosídicos entre serina y treonina con Man, especialmente en hongos y levaduras. Esta Man suele estar sustituida por una a cuatro Man adicionales (9), o por Glc y Gal (10,11). Se han reportado uniones O-glicosídicas entre Ser/Thr y Gal en la cutícula de lombrices (12) y Thr/Fuc en un glicopéptido urinario humano (13). En los proteoglicanos la xilosa es el azúcar involucrado en el enlace Ser/Thr.

Otro tipo de enlace O-glicosídico involucra Gal y el grupo OH de hidroxilisina. Este tipo de unión fue inicialmente detectado en tropocolágeno (14) y Spiro y col (15) demostraron el enlace Glc- $\beta$ 1,2 Gal-Hyl en la membrana basal glomerular.

Glicopéptidos aislados de pared celular de plantas contienen arabinosa covalentemente unida al grupo OH de hidroxiprolina (16,17).

### I.1.3. ENLACES N-GLICOSIDICOS

En otro grupo de glicoproteínas la cadena oligosacarídica está unida a través de GlcNAc al nitrógeno amídico de una asparagina. Estas cadenas oligosacarídicas son de dos tipos generales: las simples que sólo contienen Man y GlcNAc y las complejas que además de estos azúcares poseen ácido siálico, Gal y Fuc. Una sola glicoproteína puede contener ambos tipos de cadena oligosacarídica, como la tiroglobulina (19) y la IgM humana (20), o poseer del tipo complejo y O-glicosilados como la fetuína (21), la IgA humana (3) y la sialoglicoproteína de la membrana de eritrocitos humanos (22).

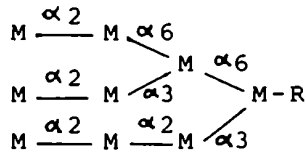
Ambos tipos de oligosacáridos poseen un núcleo central idéntico constituido por dos GlcNAc y tres Man. Sin embargo se han descrito algunos casos atípicos.

Estos oligosacáridos exhiben microheterogeneidad, ya que varias estructuras muy relacionadas se encuentran en una única preparación de un glicopéptido purificado.

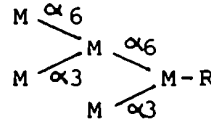
En la Figura 1 se presenta una clasificación de los N-glicosil oligosacáridos.

#### I.1.3.1. OLIGOSACARIDOS SIMPLES

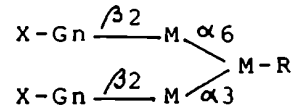
Son más apropiadamente llamados de "alto contenido en manosa" o "high mannose", ya que ni su estructura ni el análisis de la misma son simples. Contienen de dos a seis residuos de Man, con unión  $\alpha$  adicionados al núcleo central.



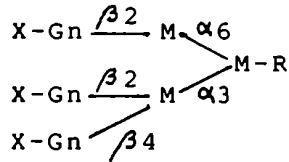
"HIGH MANNOSE"  
(M<sub>9</sub>)



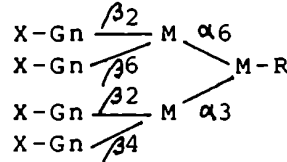
"HIGH MANNOSE"  
(M<sub>5</sub>)



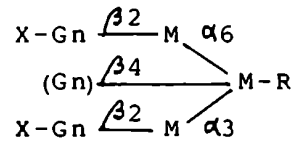
COMPLEJO BIANTENARIO  
(GnGn si X=H)



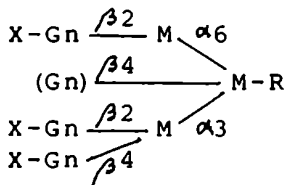
COMPLEJO TRIANTENARIO  
(GnGnGn si X=H)



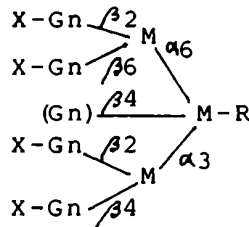
COMPLEJO TETRAANTENARIO  
(GnGnGnGn si X=H)



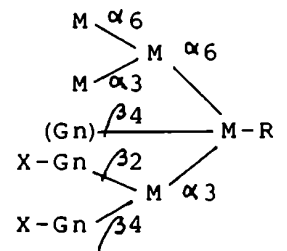
COMPLEJO BIANTENARIO  
BISECTADO  
(GnGn(Gn) si X=H)



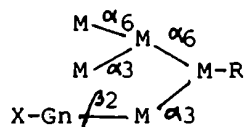
COMPLEJO BIANTENARIO  
BISECTADO  
(GnGnGn(Gn) si X=H)



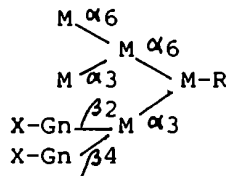
COMPLEJO TETRAANTENARIO  
BISECTADO  
(GnGnGnGn(Gn) si X=H)



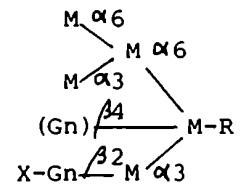
HIBRIDO TRIANTENARIO  
BISECTADO  
(Gn(I,III,IV)M<sub>5</sub> si X=H)



HIBRIDO BIANTENARIO  
NO BISECTADO  
(Gn(I)M<sub>5</sub> si X=H)



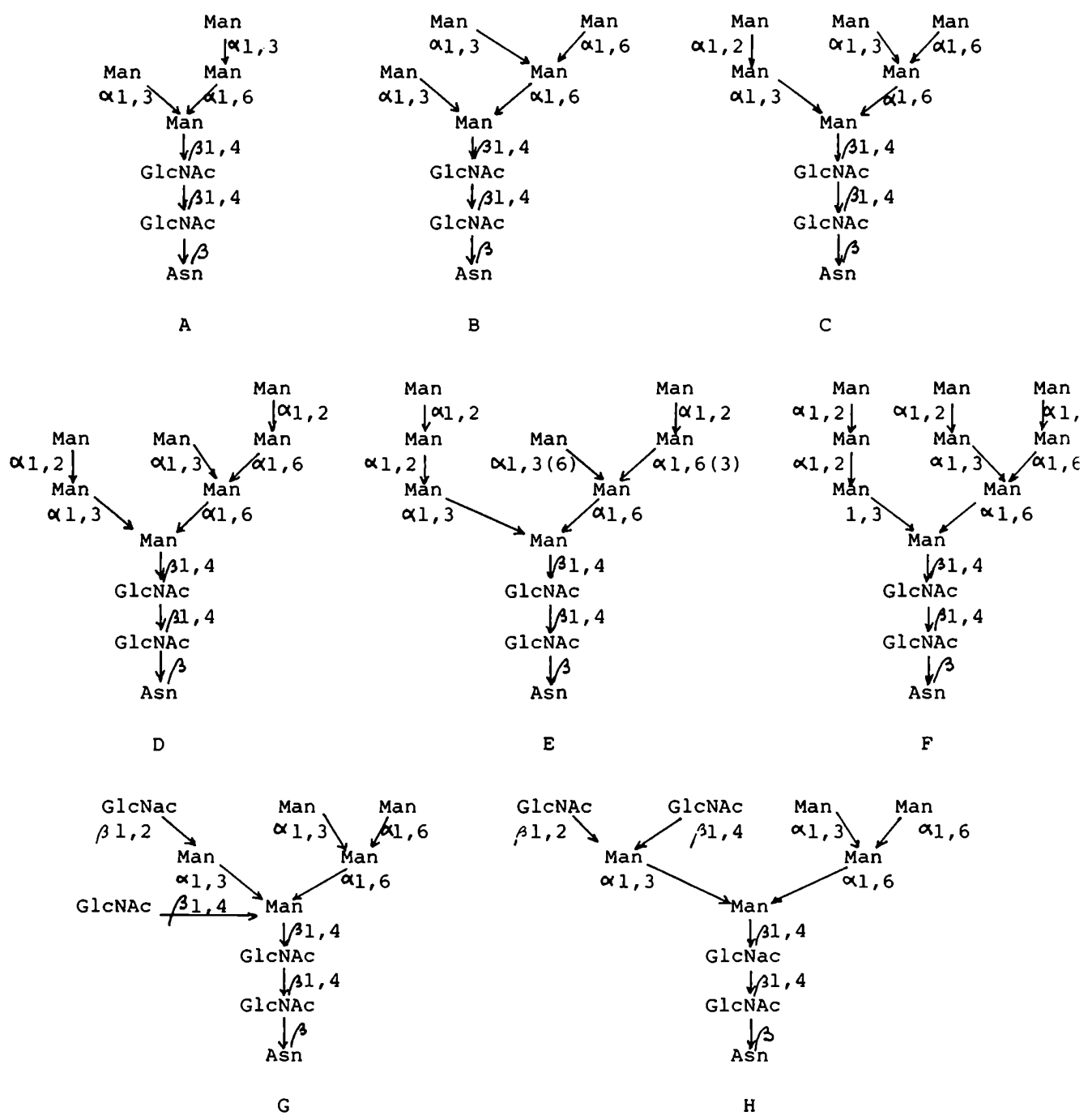
HIBRIDO TRIANTENARIO  
NO BISECTADO  
(Gn(I,IV)M<sub>5</sub> si X=H)



HIBRIDO BIANTENARIO  
BISECTADO  
(Gn(I,III)M<sub>5</sub> si X=H)

**FIGURA 1:** Clasificación de los N-glicosil oligosacáridos.

Los oligosacáridos "high mannose" se nombran de acuerdo al número de Man (M). Los complejos se denominan considerando el azúcar terminal (Gn=GlcNAc). (Gn) representa una GlcNAc bisectada. X puede ser H o Gal $\beta$ 1-4(o 3) o sialil $\alpha$ 2-6(o 3)Gal $\beta$ 1-4(o 3). Tomado de (23)



**FIGURA 2:** Estructura de los glicopéptidos "high mannose"

A,B,C,D,G y H corresponden a ovoalbúmina; B,C,E y F a células de ovario de hamster y F es el glicopéptido A de la tiroglobulina bovina. Tomado de (18).

La tiroglobulina (24) posee en total nueve Man unidas exactamente de igual forma que en el oligosacárido conteniendo 3 Glc, 9 Man y 2 GlcNAc llamado  $G_3$ -oligosacárido, que se ha encontrado unido al Dol-PP. En la Figura 2 se observa la estructura de estos oligosacáridos.

#### I.1.3.2. OLIGOSACARIDOS COMPLEJOS

Al núcleo central se unen otros azúcares distintos de Man. La secuencia de las cadenas externas es a menudo: NANA-Gal-GlcNAc-. La unión de la Gal a GlcNAc es habitualmente  $\beta$  1,4, con excepción de la protrombina (25) que también posee restos de Gal con unión  $\beta$  1,3. En ambos tipos de unión la Gal puede, a su vez, estar sustituida por NANA. El disacárido galactosil  $\beta$  1,4 GlcNAc se denomina N-acetil-lactosamina, por lo que los oligosacáridos complejos a veces se denominan de tipo lactosamina. Las cadenas de lactosamina pueden variar de 2 a 4 y de acuerdo a ello se clasifican los oligosacáridos complejos. Algunos de estos oligosacáridos pueden tener residuos de Fuc unidos en forma  $\alpha$  1,6 a la GlcNAc más interna del núcleo, o en  $\alpha$  1,3 a una GlcNAc de una cadena.

Los oligosacáridos bisectados complejos son similares excepto que un resto adicional de GlcNAc se une en  $\beta$  1,4 a la Man unida en  $\beta$  del núcleo (ver Figura 1).

#### I.1.3.2. OLIGOSACARIDOS HIBRIDOS

Contienen uno o dos residuos de Man uni



dos al brazo del núcleo con Man  $\alpha$  1,6 y una o dos ramas de tipo complejo en el brazo Man  $\alpha$  1,3 del núcleo. Los oligosacáridos híbridos usualmente se aislan como estructuras bisectadas como en la ovoalbúmina (26), pero algunos no bisectados se aislaron de la rhodopsina bovina (27).

#### I.1.4. LIPIDOS INTERMEDIARIOS EN LA GLICOSILACION DE PROTEINAS

Experimentos realizados con numerosas glicoproteínas N-glicosiladas virales, de membrana y secretadas revelaron que los glicopéptidos simples o complejos tienen un origen biosintético común: un oligosacárido precursor de tipo "high mannose". Estas especies no se arman sobre la proteína sino que son sintetizadas unidas a un lípido transportador: el dolicol. Las cadenas oligosacáridicas completas se transfieren en bloque al aceptor proteico. En una variedad de sistemas el lípido-oligosacárido precursor tiene como secuencia sacarídica:  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ .

Las evidencias de que los oligosacáridos unidos a Asn derivan exclusivamente de lípidos-oligosacáridos fueron aportadas por estudios realizados con inhibidores y con líneas celulares mutantes. Las drogas que inhiben la formación de lípidos oligosacáridos bloquean la glicosilación de restos de Asn (28) y oligosacáridos simples y complejos están ausentes en las proteínas de células inhibidas (29,30). En forma similar, las proteínas sintetizadas en mutantes que tienen bloqueada la

formación de lípido-oligosacáridos están unidas a oligosacáridos distintos de los normales (31,32).

#### I.1.4.1. DOLICOL: EL LIPIDO TRANSPORTADOR

La familia de poliisoprenoles conocida como dolicoles se descubrieron hace más de veinte años (33) a partir de tejidos de una variedad de eucariotes, en la fracción insaponificable. Su estructura se muestra en la Figura 3.

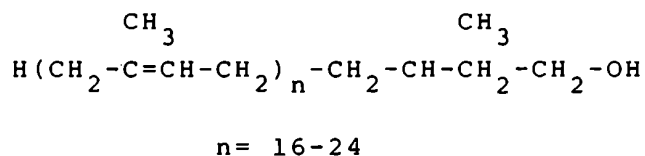


FIGURA 3: Estructura del dolicol.

El número de residuos isoprénicos en Dol aislado de diversos animales varía de 17 a 21. Para levaduras, hongos y plantas dicho número va de 14 a 24. El Dol es  $\alpha$  saturado.

La concentración de Dol en hígado de rata es de aproximadamente 60  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (34).

La mayor parte de este material está como Dol libre o esterificado con ácidos grasos (35) y no participa directamente en el armado de oligosacáridos. Por añadidura gran parte del Dol celular está distribuido fuera del retículo endoplasmático (35,36), mientras que las enzimas de la síntesis de oligosacáridos tienen predominantemente esa localización (37).

En consecuencia la cantidad de Dol-P activo envuelto en la glicosilación proteica es desconocida. El problema se complica porque dicho Dol-P puede estar como tal, como Dol-PP-oligosacárido, Dol-PP-GlcNAc, Dol-P-Man y Dol-P-Glc (38-40).

El Dol-P parece ser predominantemente sintetizado en la membrana mitocondrial externa en hígado de conejo (41) y se ha demostrado su síntesis a partir de mevalonato (41) e isopentenilpirofosfato (41,42) en sistemas libres de células.

El Dol-P también puede ser sintetizado a partir de Dol libre en una reacción dependiente de CTP en hígado (43,44) y cerebro (45) o de ATP en insectos (46). Por último, se han detectado en preparaciones libres de células enzimas que desfosforilan Dol-P (47,48) o convierten Dol-PP en Dol-P (48). Esta última actividad puede estar involucrada en el reciclaje del Dol-PP que presumiblemente se libera luego de la transferencia del oligosacárido completo desde el lípido al aceptor proteico.

Con respecto a la disposición del Dol-P en las membranas biológicas, es interesante considerar su extremadamente larga cadena carbonada. La forma extendida del Dol ( $100 \text{ \AA}$ ) es mayor que el espesor de la zona hidrofóbica de la mayoría de las membranas ( $40-60 \text{ \AA}$ ) (49). En consecuencia no puede existir en las células en su forma extendida y para definir su rol de transportador debe considerarse su orientación estructural.

#### I.1.4.2. INICIACION DE LA CADENA SACARIDICA

La iniciación del oligosacárido precursor involucra la formación de Dol-PP-GlcNAc, por reacción entre Dol-P y UDP-GlcNAc (50). En el proceso se transfiere un grupo glicosilo y se forma UMP. Esta reacción requiere cationes divalentes y es activada por detergentes neutros. Por adición de un segundo resto de GlcNAc cedido por el nucleótido azúcar (51) se origina Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>. Se ha demostrado la síntesis de un lípido-trisacárido Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>-β Man (52).

La enzima responsable de la transferencia tiene un requerimiento absoluto de Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub> y utiliza GDP-Man y no Dol-P-Man como dador del azúcar.

#### I.1.4.3. ELONGACION DE LA CADENA SACARIDICA

A partir del trisacárido mencionado se adicionan sucesivamente ocho restos α manosilos. Las cuatro primeras Man derivan del nucleótido azúcar GDP-Man (53, 54) y la transferencia se produce aun en presencia de EDTA que bloquea la síntesis de Dol-P-Man.

La adición de las siguientes cuatro Man requiere la presencia de Dol-P-Man (53). Este lípido intermediario se forma por reacción entre Dol-P y GDP-Man (50). Cuando se produce una inhibición de su formación mediante el antibiótico anfomicina (55,56) se bloquea la síntesis del oligosacárido completo, acumulándose Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> (57,58).

El lípido-oligosacárido se completa por medio de la adición de tres restos glucosilos cedidos por Dol-P-Glc. La formación de Dol-P-Glc a través de la reacción de Dol-P con UDP-Glc se detectó por primera vez utilizando microsomas de hígado (59). Esta reacción requiere  $Mg^{2+}$  y un detergente neutro.

Se ha demostrado que lípidos oligosacáridos menores que  $GlcNAc_2Man_8$  son pobres sustratos de las glucosiltransferasas in vivo. La rama que portará los grupos glucosilos está ya completa en el lípido- $GlcNAc_2Man_5$ . Sin embargo en células mutantes que acumulan Dol-PP- $GlcNAc_2Man_5$  (60) o - $GlcNAc_2Man_7$  (32) las especies glucosiladas son casi inexistentes. En contraste, en las células normales la especie completamente glucosilada  $GlcNAc_2Man_9Glc_3$  es el principal lípido-oligosacárido marcado mediante azúcares radiactivos (61,62). No se sabe si los residuos de Glc se adicionan antes o después de la transferencia al lípido-azúcar del último residuo de Man.

Está bien establecido que la glicosilación de proteínas ocurre en la luz del RER (63-68). Sin embargo, el sitio de armado del lípido-oligosacárido no está completamente dilucidado. El problema se centra en el hecho de que los nucleótido-azúcares dadores no pueden entrar a la luz del RER (69,70).

Se han realizado numerosos estudios tendientes a esclarecer la orientación en la membrana de los lípido-azúcares intermedios y de las enzimas involucradas en su síntesis. Los trabajos de Snider y col (71,72) sugieren que las especies

GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3-5</sub> están del lado citoplasmático del RE mientras que las GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>6-9</sub> están del lado luminal. Esto indicaría que la especie GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> se armaría sobre el lado citoplasmático de la membrana del RE y que luego sería trasladada al lado luminal donde se produce la posterior elongación y la transferencia a proteínas. Como los derivados del Dol no se trasladan espontáneamente a través de la bicapa lipídica (73), es probable que dicha traslocación sea mediada por proteínas.

Este esquema concuerda con el hecho de que GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> se sintetiza directamente a partir de los nucleótido azúcares.

Sin embargo este modelo requiere que Dol-P-Man y Dol-P-Glc estén en la fase luminal del RE a pesar de que se sintetizan a partir de nucleótido azúcares citoplasmáticos. Haselbeck y col (74) proponen que los lípido-monosacáridos se sintetizan a partir de los nucleótido azúcares en la cara citoplasmática y que luego son trasladados a la fase luminal, demostrando que el movimiento transmembranoso del Dol-P-Man está catalizado por la Dol-P-Man sintetasa.

Muchas de las enzimas involucradas en el armado de lípido-oligosacáridos tienen sitios sensibles a proteasas en el lado citoplasmático de las membranas microsomales (70,75-78), aunque el mecanismo de traslocación de GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub> predice que las últimas enzimas de este ciclo, como las glucosiltransferasas no debieran serlo. Esta discrepancia puede explicarse



I.1.4.4. TRANSFERENCIA DEL OLIGOSACARIDO DEL  
LIPIDO TRANSPORTADOR A PROTEINAS

I.1.4.4.a. Lípido-oligosacáridos  
donores

Numerosos estudios (81-88)

han demostrado que los restos Glc del lípido-oligosacárido fa  
cilitan la transferencia in vitro del oligosacárido a la pro-  
teína pero que la presencia de dichas Glc no es un requisito  
absoluto para la transferencia. Se ha encontrado que proto-  
zoos (89-94) sintetizan un lípido-oligosacárido no glucosila-  
do que se transfiere directamente a proteínas. No se sabe si  
las oligosacariltransferasas de organismos superiores son ca-  
paces de transferir esta clase de lípido-oligosacáridos.

Hoflack y col. (95) han propuesto que la glucosilación  
protege al lípido-oligosacárido de la degradación, demonst-  
rando que el lípido-oligosacárido no glucosilado es selectivamente  
degradado por fosfodiesterasas.

Mientras la transferencia del oligosacárido con tres Glc  
es mucho más rápida que la del que posee una o dos Glc (83),  
el número de residuos de Man tiene poco efecto sobre la glico-  
silación proteica. La remoción de restos Man del precursor  
 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  por acción de la  $\alpha$ manosidasa no parece afec-  
tar su transferencia a proteínas (82,87).

Recientemente se ha estudiado la especificidad de las  
transferasas que catalizan la transferencia del sacárido del



lípido-oligosacárido a la proteína. Se ha demostrado que las membranas de oviducto son capaces de transferir la cadena sacáridica proveniente de Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub> o Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man exógenos (96,97). A las mismas conclusiones se ha arribado estudiando membranas de levadura (98,99). Sin embargo, no se ha logrado demostrar la transferencia a partir de Dol-PP-GlcNAc.

Si sólo una transferasa estuviera envuelta en el proceso, ésta debiera reconocer sólo los dos primeros monosacáridos (la unidad quitobiosa) del lípido-oligosacárido.

La observación de que lípido-oligosacáridos menores pueden ser transferidos a proteínas plantea el interrogante de una vía alternativa que involucre la adición de Man luego de la transferencia de un di o trisacárido a la proteína (49).

Por último, se ha observado transferencia de azúcares a proteínas desde nucleótido azúcares. Khalkhali y col. (100, 101) reportaron la transferencia de GlcNAc a ribonucleasa A a partir de UDP-GlcNAc.

#### I.1.4.4.b. Proteínas aceptoras

Está bien establecido que el pre-requisito para que un resto de Asn esté glicosilado es que el mismo forme parte de la secuencia del tripéptido -Asn-X-Ser- o -Asn-X-Thr-, donde X representa cualquier aminoácido excepto, probablemente, prolina y ácido aspártico (102, 103). Sólo existe un informe de glicosilación en la secuencia

-Asn-Ala-Cys- (104).

Sin embargo, sólo un tercio de los sitios -Asn-X-Thr/Ser- de las proteínas eucarióticas están glicosilados (30), y de éstos algunos están glicosilados ineficientemente. Es evidente que otros factores determinantes están involucrados. Por e jemplo, la ARNasa pancreática bovina se encuentra tanto en la forma glicosilada (ARNasa B) como no glicosilada (ARNasa A), a pesar de que ambas tienen idéntica secuencia aminoacídica.

Con el objeto de investigar cuáles sitios -Asn-X-Ser/Thr pueden glicosilarse se utilizó el procedimiento de Chou y Fasman (105) para estimar la estructura secundaria del segmen to peptídico alrededor de la unión N-glicosídica (106). Se de terminó que la mayoría de los residuos glicosilados se hallaban en secuencias que favorecían la formación de lazos o vueltas. Esto enfatiza la importancia de la accesibilidad ya que en general este tipo de conformaciones ocurre en la superficie de las proteínas globulares en regiones expuestas entre estructuras planas o helicoidales.

Los estudios de Bause y Legler (107) sobre el papel de los hidroxilos en la reacción de glicosilación dieron valiosos datos sobre el mecanismo de reacción y los requerimientos para una conformación favorable. Concluyeron en que hay un re querimiento absoluto en el mecanismo de glicosilación de formación de puentes de hidrógeno entre la amida de la Asn (donor de H) y el oxígeno del grupo OH del hidroxilo (el aceptor

de H), incrementándose la nucleofilicidad del par electrónico de la amida, resultando en una mayor reactividad frente al do nor glicosídico. Bause (108) encontró que los giros o vueltas representan arreglos espaciales que favorecen los contactos puentes de hidrógeno.

Los estudios de glicosilación in vitro utilizando péptidos sintéticos demostraron que la secuencia Asn-X-Ser/Thr es suficiente para la transferencia del oligosacárido pero no es eficiente, a menos que el grupo  $\alpha$ -amino de la Asn y  $\alpha$ -carboxilo del aminoácido hidroxilado estén bloqueados (86,88,109, 110). Incrementando el tamaño del aceptor a un hexa u octapéptido aumenta la transferencia, probablemente por que esto per mite la formación de una estructura de orden superior que fa cilita la reacción (111,112). Sin embargo, cadenas polipeptídicas grandes no sirvieron como aceptoras del oligosacárido y fue necesario el fragmentamiento de las mismas para lograr el objetivo, o sea que la destrucción de la estructura terciaria permitió la reacción enzimática.

Estos hallazgos demuestran que para la formación in vitro de enlaces N-glicosídicos es un factor crítico la adecuada ex posición de la secuencia tripeptídica aceptora a las transferasas unidas a membrana involucradas en el ciclo del Dol.

#### I.1.4.4.c. Localización subcelular

Se considera que las gli-

coproteínas de membrana y secretadas se sintetizan en los polisomas unidos a membrana y que luego penetran a la luz del RER (113-115) donde en muchos (116-118) pero no en todos los casos (119-121) una secuencia guía ("leader") de 10 a 30 aminoácidos es rápidamente removida por una peptidasa cisternal (122,123).

Las glicoproteínas secretorias atraviesan la bicapa mientras que las de membrana permanecen asociadas. Algunas están "ancladas" en la membrana por un dominio hidrofóbico cercano al carboxilo terminal (124-130).

La estructura de la cadena polipeptídica naciente se desarrolla rápidamente: se forman puentes disulfuro intra e intercatenarios antes de que la cadena se libere del ribosoma (131).

Con respecto a la N-glicosilación de las proteínas, varios estudios (132-135) demuestran que este proceso está estrechamente conectado en el tiempo con la translación, ya que polipéptidos que recién se han completado y que todavía permanecen unidos al ARN de transferencia ya están glicosilados. Sin embargo también existen evidencias de que en algunos casos los oligosacáridos pueden ser transferidos luego de la terminación de la cadena polipeptídica (64,131,136,137).

Consistentemente con la estrecha relación temporal entre síntesis y glicosilación proteica, el fraccionamiento subcelular del oviducto de gallina indica que la actividad transfe-

rente del oligosacárido está asociada al RER (37).

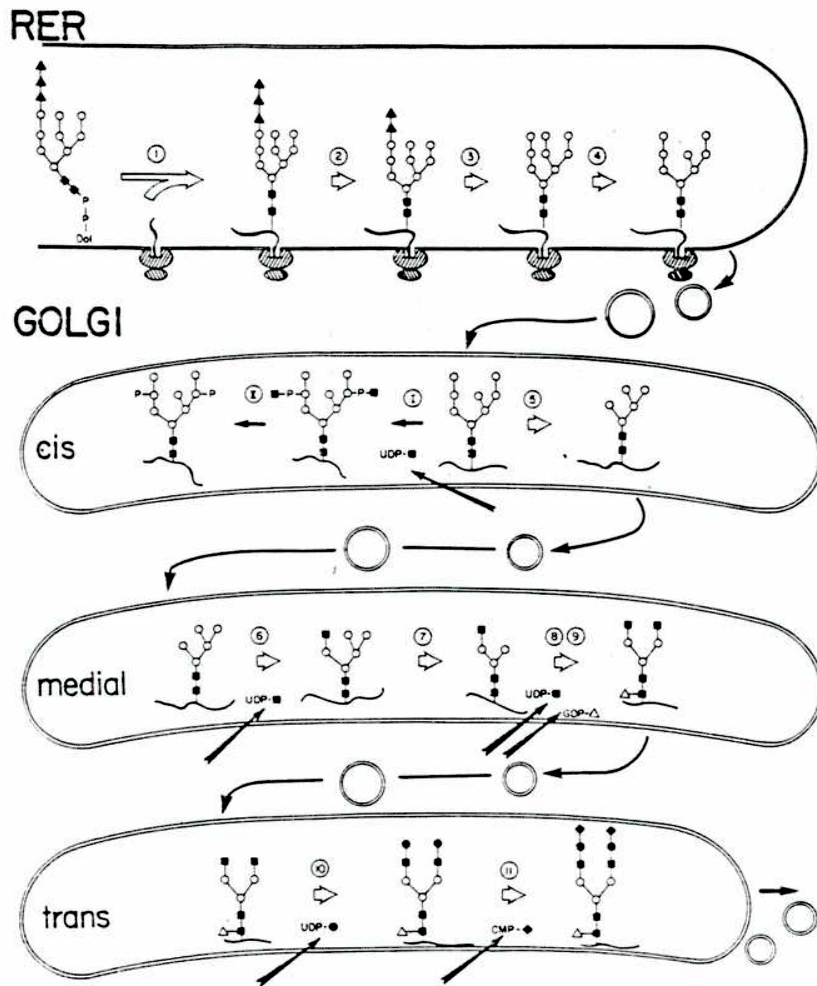
A pesar de que algunos estudios encuentran considerable actividad de transferencia en el REL (138,139) y aun en membrana celular de reticulocitos (140), los estudios cinéticos en donde se sigue el movimiento intracelular de glicoproteínas marcadas a partir de azúcares o aminoácidos sugieren que la transferencia inicial del oligosacárido ocurre predominantemente en el RER (141-144).

Estos hallazgos pueden esquematizarse en la Figura 6.

Puede hipotetizarse que los nucleótido derivados de GlcNAc y Man, sintetizados en el citoplasma, reaccionan con el Dol-P en el RER para formar los lípido-monosacáridos. Reacciones posteriores conducen a la formación del Dol-PP-oligosacárido que ocurriría en el marco hidrofóbico de la membrana. La glicosilación se produciría cuando un tripéptido -Asn-X-Ser/Thr- se traslada y se orienta en forma tal que pueda interactuar con el Dol-PP-oligosacárido y con la oligosacariltransferasa asociada a membrana. El mismo mecanismo se utilizaría para glicoproteínas secretables o de membrana.

#### I.1.4.5. PROCESAMIENTO DE LOS OLIGOSACARIDOS UNIDOS A PROTEINAS

Inmediatamente después de la transferencia a los aceptores proteicos la población inicialmente homogénea del oligosacárido precursor sufre una serie de trans-



**FIGURA 6:** Esquema del procesamiento de las glicoproteínas recientemente sintetizadas.

Las reacciones son catalizadas por las siguientes enzimas: (1) oligosacariltransferasa, (2)  $\alpha$ -glucosidasa I, (3)  $\alpha$ -glucosidasa II, (4) ER  $\alpha$ 1,2-manosidasa, (I) N-acetilglucosaminilfosfotransferasa, (II) N-acetilglucosamina-1-fosfodiéster  $\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa, (5) Golgi  $\alpha$ -manosidasa I, (6) N-acetilglucosaminiltransferasa I, (7) Golgi  $\alpha$ -manosidasa II, (8) N-acetilglucosaminiltransferasa II, (9) fucosiltransferasa, (10) galactosiltransferasa, (11) sialiltransferasa. Los símbolos representan: ■, GlcNAc; ○, Man; ▲, Glc; △, Fuc; ●, Gal; ◆, NANA. Tomado de (171).

formaciones que conducen a la formación de oligosacáridos complejos o de alto contenido en Man.

El primer paso en el procesamiento de los oligosacáridos N-unidos es la remoción de los restos de Glc del oligosacárido precursor inmediatamente después de su transferencia a proteínas. Aunque se ha informado una vía en la cual uno o dos residuos de Man son removidos de oligosacáridos unidos a proteínas que todavía retienen uno o más restos de Glc (145, 146), la mayoría de las moléculas son completamente deglucosiladas antes de que se hidrolizen las Man. Estudios realizados en fibroblastos de pollo (145) indican que el tiempo medio de la reacción de remoción de la Glc terminal es menor a dos minutos. El resultante proteína-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>2</sub> se convierte más lentamente en -GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>1</sub> (tiempo medio= 5 minutos) y el último resto de Glc es removido aún a menor velocidad. Cantidades significativas de -GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> aparecen ya a los cinco minutos mientras que -GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>1</sub> persiste en cierto grado a las dos horas. No se conoce la causa de esta inhomogeneidad, aunque puede reflejar diferentes velocidades de procesamiento para cada glicoproteína individual.

Se demostró la actividad de glucosidasa en diversas preparaciones libres de células (147-157).

Las mediciones de actividad de glucosidasas sobre oligosacáridos conteniendo 1, 2 y 3 Glc mostraron que están involucradas al menos dos enzimas diferentes (149,153-155,157).

La glucosidasa I remueve sólo el resto terminal de Glc  $\alpha$  1,2 y ha sido solubilizada con detergentes, de hígado de rata (149, 153) y oviducto de gallina y purificada 1600 veces a partir del último tejido (154). La glucosidasa II-III, purificada de hígado y riñón de rata (158, 159), remueve dos restos de Glc  $\alpha$  1,3 a partir de  $-\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_2$ . Esta glucosidasa hidroliza  $-\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_{1-2}$  mucho mejor que  $-\text{GlcNAc}_2\text{Man}_7\text{Glc}_{1-2}$  o  $-\text{GlcNAc}_2\text{Man}_4\text{Glc}_{1-2}$ , lo que sugiere que esta glucosidasa posee además de su sitio catalítico un sitio de unión para uno o más restos Man  $\alpha$  1,2. Estos sitios proveerían la base para una unión de alta afinidad al sustrato fisiológico (158).

El hallazgo de que una mutante celular sintetiza un lípido-oligosacárido truncado con la estructura  $-\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5\text{Glc}_3$  y es capaz de procesar este oligosacárido a especies complejas típicas demuestra que la glucosidasa II-III puede actuar en este tipo de estructuras in vivo (31).

De acuerdo a diversos criterios (149, 153) ambas glucosidasas presentan diferentes características. La remoción de las  $\alpha$  Man periféricas del sustrato reduce la actividad enzimática (151, 155, 157) siendo la glucosidasa II-III la más sensible (155). Estas enzimas son activas sobre oligosacáridos unidos a lípidos o a proteínas (151, 154, 155) y se ha propuesto que además de su papel en el procesamiento de las glicoproteínas, la actividad de glucosidasas puede regular el nivel del lípido-oligosacárido completamente glucosilado disponible pa-



ra la glicosilación proteica (151).

Ambas glucosidasas de hígado de rata son proteínas integrales de membrana que parecen estar localizadas en la superficie cisternal del RE liso y rugoso (149). Esto soporta la hipótesis de que participan en el procesamiento de las glicoproteínas recién sintetizadas presentes en la luz del RER.

En oviducto de gallina la actividad específica de glucosidasa I es mayor en la fracción microsomal rugosa (154).

Se ha estudiado la acción de diferentes disacáridos sobre las glucosidasas (153). La kojibiosa (glucosil  $\alpha$ 1,2 Glc) 1 mM inhibe en más del 90% la hidrólisis de la Glc más externa que está unida con enlace  $\alpha$ 1,2. La nigerosa (glucosil  $\alpha$ 1,3 Glc) y la maltosa (glucosil  $\alpha$ 1,4 Glc) inhiben la acción de la glucosidasa II-III que hidroliza las dos Glc internas con unión  $\alpha$ 1,3. La acción de la kojibiosa también se ensayó en el oligosacárido con tres Glc unido a proteína, produciéndose una inhibición de la actividad de glucosidasa (153). Esto es una indicación de que la misma enzima actúa sobre el oligosacárido libre o unido a proteína.

Luego de la remoción de las Glc los oligosacáridos unidos a proteínas contienen sólo Man y GlcNAc. En una variedad de células este intermediario tiene la composición  $\text{-GlcNAc}_2\text{-Man}_9$  (145,146,160-163). Solamente unos pocos oligosacáridos unidos a proteínas maduras retienen esa estructura, como el glicopéptido A de la tiroglobulina bovina (24). En general és

te es procesado originando oligosacáridos simples más pequeños (164-168) o complejos, los más frecuentemente hallados en las glicoproteínas maduras. En cualquiera de los casos, el siguiente paso en la secuencia de procesamiento es la hidrólisis de residuos de  $\alpha$ -Man.

Existe una  $\alpha$ -manosidasa en el RER que remueve restos  $\alpha$ 1,2 Man de  $\text{-GlcNAc}_2\text{Man}_9$  y en menor grado de  $\text{-GlcNAc}_2\text{Man}_{6-8}$  (169). Esta enzima ha sido solubilizada a partir de RER de hígado de rata y difiere de las dos  $\alpha$ -manosidasas aisladas de aparato de Golgi en su especificidad por el sustrato y porque no se une a ConA-sefarosa. Sin embargo sus propiedades son virtualmente idénticas a la  $\alpha$ -manosidasa "citosólica" (170), lo que sugiere que esta última deriva del clivaje proteolítico de la  $\alpha$ -manosidasa del RER (171). Esta  $\alpha$ -manosidasa del RER remueve preferentemente la  $\alpha$ 1,2 Man de la rama del medio del oligosacárido (172). Por el contrario, la  $\alpha$ -manosidasa I del Golgi, aunque es capaz de remover los cuatro restos de  $\alpha$ 1,2 Man in vitro (173,174), trabaja mucho mejor sobre  $\text{-GlcNAc}_2\text{Man}_8$ . Cuando actúa sobre  $\text{-GlcNAc}_2\text{Man}_9$  genera isómeros  $\text{-GlcNAc}_2\text{Man}_{6-8}$  que retiene el resto de  $\alpha$ 1,2 Man de la rama del medio (173).

Al salir del RER las glicoproteínas se transfieren al aparato de Golgi a través del transporte vesicular (175-177), de igual forma que, ya en el Golgi, para pasar de las cisternas cis a las mediales y por último a las trans.

La mayoría de los oligosacáridos de alto contenido en Man de las glicoproteínas maduras se forman por la remoción de un número variable de restos de  $\alpha$  1,2 Man a partir de -GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub> durante el procesamiento. Si se remueven las cuatro Man se forma -GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>5</sub>, con restos  $\alpha$  1,3 y  $\alpha$  1,6 Man.

Este oligosacárido es el menor oligosacárido simple encontrado en cantidades apreciables en las glicoproteínas maduras (165,178-180) y es al mismo tiempo un intermediario en la síntesis de oligosacáridos complejos, los más frecuentemente encontrados unidos a Asn.

Las primeras etapas en la conversión de un oligosacárido simple en uno complejo se producen en el Golgi medial. Se inicia con la actividad de la N-acetilglucosaminiltransferasa I que añade un solo resto de GlcNAc (181,182) y continúa con la remoción de las Man terminales  $\alpha$  1,3 y  $\alpha$  1,6 por acción de la  $\alpha$ -mannosidasa II (174,183-185) de alta especificidad por su sustrato. Luego la N-acetilglucosaminiltransferasa II adiciona otro resto de GlcNAc (181,186,187). A este nivel puede actuar la fucosiltransferasa, transfiriendo un resto de Fuc al resto de GlcNAc más interno (188).

Los pasos finales de la síntesis de oligosacáridos complejos se producen en las cisternas del trans Golgi y consisten en la adición de restos de Gal y NANA en las cadenas externas, catalizada respectivamente por la galactosiltransferasa (142,189) y la sialiltransferasa (189,190). En este estado

puede producirse la adición de otros azúcares (ver Figura 6).

Las glicoproteínas recién sintetizadas abandonan el aparato de Golgi y son transportadas hasta su destino final.

La localización específica de las enzimas procesadoras en las cisternas del Golgi cis, medial o trans proveen un mecanismo de control de su acción secuencial sobre las glicoproteínas en síntesis, tanto en el espacio como en el tiempo.

Los oligosacáridos unidos a Asn pueden también sufrir modificaciones postranslacionales que incluyen fosforilación de los restos Man, que permite el reconocimiento de los mismos por las hidrolasas lisosomales (191), sulfatación de restos Man (192) y de N-acetilhexosaminas (193,194) y O-acetilación de restos de NANA (171).

En la Figura 6 se esquematiza el procesamiento de glicoproteínas recientemente sintetizadas.

#### I.1.4.5.a. Control del procesamiento

El análisis de la estructura de oligosacáridos de las mismas proteínas provenientes de diferentes tejidos y especies revela que frecuentemente existen notables diferencias (25, 195-203).

Un punto determinante en la síntesis de un determinado oligosacárido unido a Asn es el nivel de expresión de las diferentes glicosiltransferasas. La diferencia entre la actividad relativa de estas enzimas en los diferentes tejidos y especies

podría ser la responsable de las variaciones en la estructura.

Aunque muchas células tienen la capacidad de procesar el oligosacárido precursor hacia el tipo simple o complejo, en general no se produce esta gran heterogeneidad en una dada Asn a ser glicosilada (171). Cada sitio de glicosilación tiene oligosacáridos característicos. Cuando se encuentra heterogeneidad suele consistir en familias de oligosacáridos relacionados que pueden diferir de los oligosacáridos encontrados en otro punto de la misma glicoproteína (204).

Uno de los determinantes del procesamiento es la localización de la proteína en la célula. Por ejemplo, las glicoproteínas propias del RE, que no están expuestas a las enzimas procesadoras del Golgi, se esperaría que fueran del tipo simple (205).

Por otro lado, hay diversos estudios que confirman que la estructura de la proteína influye sobre el procesamiento de los oligosacáridos que a ella se adicionan (206).

Es posible que la interacción de señales de la proteína con ciertas glicosiltransferasas que median los pasos finales del armado del oligosacárido determine cuál de las muchas posibles estructuras del oligosacárido maduro tendrá la dada proteína (171).

Se ha demostrado que la localización de los sitios de glicosilación en la cadena polipeptídica está relacionada con

el procesamiento (207). Los sitios de glicosilación ubicados en los primeros cien aminoácidos están enriquecidos en oligosacáridos complejos, mientras que predominan los simples en los ubicados a la altura del aminoácido doscientos en adelante.

#### I.1.4.6. REGULACION DE LA SINTESIS DE GLICO- PROTEINAS

El estudio de los factores que regulan la síntesis de N-oligosacáridos se ha iniciado hace pocos años y la información actual al respecto es sumamente fragmentaria.

Hay un número de potenciales sitios de regulación (49) a nivel de:

- 1) los nucleótido azúcares donores de los glicosilos iniciales;
- 2) el Dol-P aceptor de los glicosilos;
- 3) las transferasas que catalizan las reacciones que conducen a la síntesis del Dol-PP-oligosacárido;
- 4) la transferasa del oligosacárido;
- 5) la proteína aceptora.

Es poco probable que la regulación específica de las glicoproteínas con enlace N-glicosídico se produzca por el nivel de UDP-GlcNAc, ya que este tipo de azúcar se encuentra en otros tipos de glicoproteínas y proteoglicanos.

Por el contrario, es posible que el nivel de GDP-Man afecte el grado de síntesis de glicoproteínas, ya que en eucariotes superiores la Man sólo se encuentra en Asn-oligosacáridos y en keratansulfato tipo I. En todo caso, muy poco es lo que se sabe sobre alteraciones a nivel de nucleotido azúcares.

Tampoco es demasiada la información sobre la regulación de las glicosiltransferasas envueltas en el armado del lípido oligosacárido. Es interesante, sin embargo, la existencia de una mutante celular que es defectiva para la síntesis de Dol-PP-oligosacárido (208).

Dos sitios potenciales de regulación específica de la glicosilación proteica podrían involucrar a la síntesis de Dol-P y a la regeneración de Dol-P a partir de Dol-PP. De acuerdo a la información obtenida hasta el momento, el aparente sitio de regulación específica de la síntesis de Dol-P sería el que envuelve la condensación de unidades isopentenilos con farnesil-PP o las dos reacciones responsables de las modificaciones de la estructura final de la cadena completa: reducción del doble enlace en la primera unidad de isopreno o la conversión de pirofosfato en fosfato (49).

Con respecto a la reacción de desfosforilación, debe considerarse que uno de los productos finales de la reacción entre el Dol-PP-oligosacárido y el aceptor proteico es Dol-PP.

Este compuesto es probablemente convertido en forma enzimática en Dol-P, lo que permite su reciclado, actuando como acep-

tor de unidades glicosilo.

A pesar de que el mecanismo de regulación de la síntesis de Dol-P no está bien conocido, hay estudios que informan sobre cambios en el nivel de Dol-P durante el desarrollo. Uno de ellos (209) sostiene que el nivel de Dol-P, determinado a través del grado de síntesis de Dol-P-Man, es menor en membranas de cerebro adulto de mamíferos que en recién nacidos.

Los trabajos recientes de Scher y col. (210) demuestran que la actividad de Dol-kinasa es casi dos veces mayor en membranas de materia gris de mamíferos prenatales en comparación con animales de 90 días. En contraste, la actividad de Dol-P-fosfatasa aumenta con la edad.

Un estudio sobre el nivel de síntesis de Dol-P-Man en membranas de oviducto de pollo antes y después de diferenciaciones inducidas por estrógenos, indica que el factor primario de la síntesis aumentada es un incremento en el nivel de Dol-P, más que en la actividad de la manosiltransferasa (211).

También se ha establecido que la desaparición de la síntesis de Dol-P-Man concomitante con la conversión de reticulocitos en eritrocitos es debida a la pérdida del aceptor Dol-P (212,213).

Finalmente, debe mencionarse que otro posible mecanismo de regulación es la interconversión de Dol en Dol-P. Aunque no se conoce la fosfatasa que actúa sobre el Dol-P se ha detectado una kinasa que convierte Dol en Dol-P (43,45).



#### I.1.4.7. INHIBIDORES DE LA GLICOSILACION

El uso de inhibidores de la glicosilación ha resultado de gran utilidad en el estudio del rol biológico de la cadena oligosacáridica de las glicoproteínas, tanto como en el análisis del proceso de glicosilación.

Los inhibidores más comunmente utilizados fueron aminoazúcares, deoxiazúcares, fluordeoxiazúcares y, más recientemente, antibióticos como la bacitracina y la tunicamicina que parecen ser más específicos.

Se ha demostrado inhibición de la glicosilación por acción de la 2-deoxi-D-Glc en diversos modelos (214-220). Sin embargo, se ha sugerido (221) que los efectos globales de los deoxiazúcares sobre la síntesis de glicoproteínas podrían deberse a una combinación de una inhibición general de la síntesis proteica, a la inducción o represión por catabolitos y a la inhibición de la glicosilación propiamente dicha. Los fluordeoxiazúcares parecen ser inhibidores más útiles de la glicosilación aunque no se conoce exactamente su mecanismo de acción (222-224). Las glicoproteínas sintetizadas en presencia de altas concentraciones de deoxiazúcares contienen unidades de carbohidratos incompletas o anormales (49). Sin embargo no hay explicaciones claras de la forma de acción de estos agentes.

La bacitracina ha sido utilizada como inhibidora de la glicosilación a través de lípidos intermediarios fundamental-

mente en procariotes (225), donde actuaría bloqueando la defosforilación del undecaprenol-P (226,227). En eucariotes, los efectos de la bacitracina sobre el ciclo del Dol varían de un sistema a otro (96,228-230), lo que hace que su uso sea todavía de relativo valor.

La tunicamicina es un potente inhibidor de la glicosilación proteica producido por Streptomyces lysosuperficus y fue descubierta por Tamura en 1970 (231). Se ha determinado que inhibe la glicosilación proteica bloqueando el primer paso en la síntesis de los oligosacáridos unidos a Asn: la transferencia de GlcNAc-1-P desde UDP-GlcNAc al Dol-P (232,233). Se ha demostrado que la tunicamicina no ejerce su efecto por bloqueo de la captación de azúcares o interfiriendo en la síntesis de UDP-GlcNAc o GlcN-6-P (233-235) ni actuando sobre la incorporación de GlcNAc terminal en el procesamiento de oligosacáridos complejos (236-238).

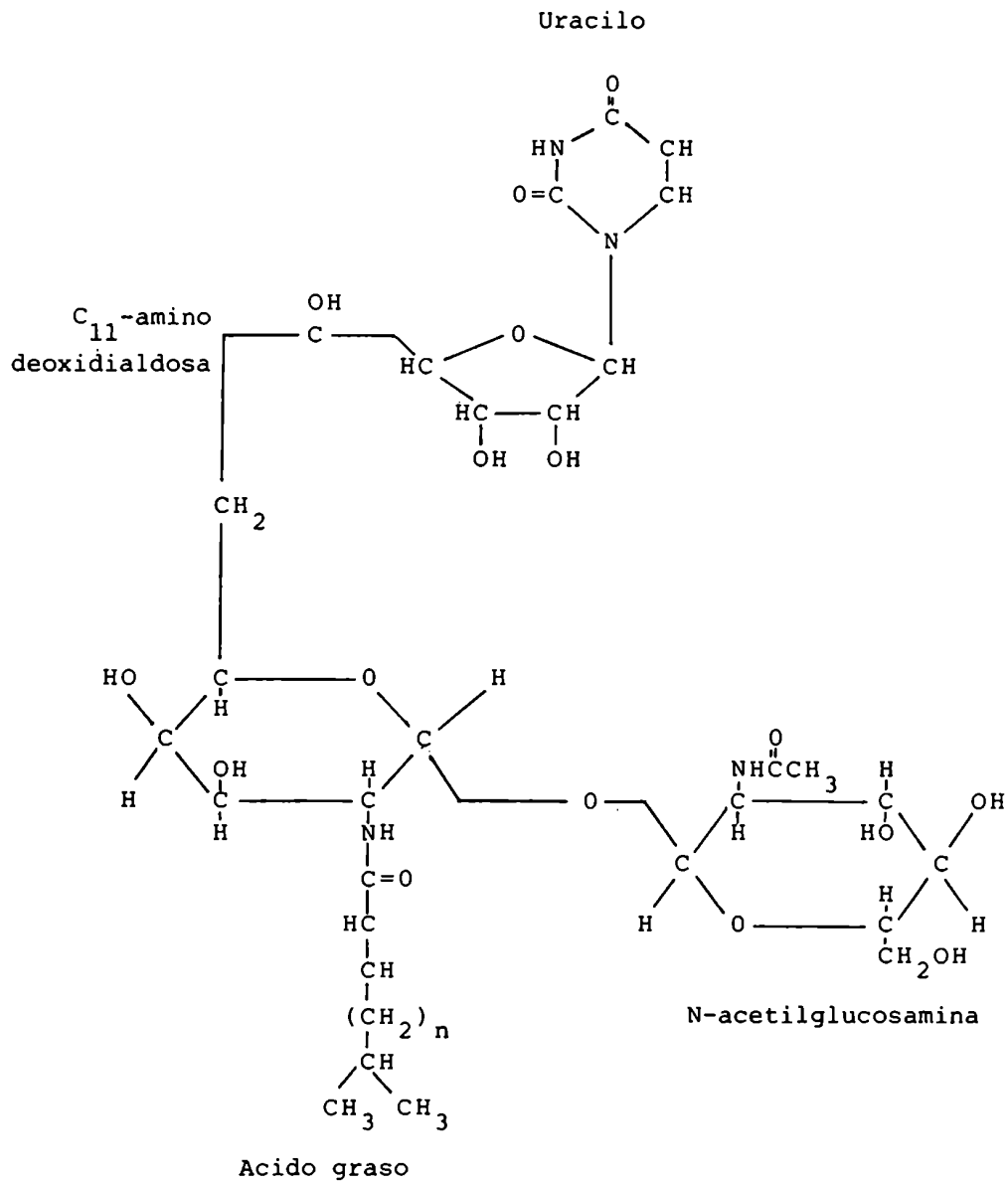
Es de particular interés el efecto de la tunicamicina sobre las células transformadas. Se ha establecido que en estas células se encuentra mayor sensibilidad al antibiótico que en células normales (239-244). Los cambios en la morfología, adhesión y crecimiento celulares, en la incorporación de azúcares y aminoácidos radiactivos y en la formación de Dol-P-GlcNAc son de cinco a diez veces más pronunciados en células transformadas tratadas con tunicamicina que en las normales (239-241,243). El antibiótico demostró ser selectivamente ci-

totóxico en células transformadas por irradiación UV, viral o químicamente (244). No se conoce con exactitud el mecanismo de citotoxicidad selectiva de la tunicamicina contra células transformadas. Se desconoce si dicha citotoxicidad resulta de la inhibición de la glicosilación o de la síntesis proteica.

Actualmente se sabe que la tunicamicina es una mezcla de varios homólogos que difieren en las cadenas de ácidos grasos (245-247). Por cromatografía líquida de alta presión (248,249) se han separado 16 homólogos y se ha examinado la actividad biológica de los nueve homólogos más importantes (248, 250, 251). Se encontró que difieren en la cantidad de antibiótico requerido para bloquear la glicosilación proteica, para inhibir la síntesis proteica y, en consecuencia, en los niveles necesarios para inhibir la glicosilación sin afectar la síntesis de proteínas. Los efectos selectivos de los homólogos de la tunicamicina contra las células transformadas podrían deberse a diferencias en la composición de las membranas celulares, en las glicosiltransferasas afectadas por la droga o en la penetración del antibiótico en el RER (252).

En la Figura 7 se muestra la estructura de la tunicamicina

Otro inhibidor de la glicosilación es la swainsonina, que inhibe la acción de la  $\alpha$ -manosidasa II, impidiendo el procesamiento de una de las ramas del núcleo "high mannose", produciendo, en consecuencia, una retención de oligosacáridos



**FIGURA 7:** Estructura de la tunicamicina.

Tomada de (49) de acuerdo a los trabajos de Takatsuki(253).

de tipo simple en las proteínas (254). Alternativamente el procesamiento de las otras ramas puede continuar, produciéndose N-oligosacáridos híbridos (185).

Por último, consideraremos la monensina, cuyos efectos sobre el transporte intracelular están bien documentados (255), ionóforo que además inhibe la adición de azúcares terminales a los N-oligosacáridos (256). Se ha informado que en su presencia se secreta fibronectina anormalmente glicosilada (257).

## I.2. TEJIDO MAMARIO NORMAL Y TUMORAL. LINEAS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMAS MAMARIOS

### I.2.1. GLANDULA MAMARIA

La mama humana es una glándula tubuloalveolar compuesta que consiste en 15-25 lóbulos irregulares que irradian desde la papila mamaria o pezón. Los lóbulos están separados por una capa de tejido conjuntivo denso y están enclavados en abundante tejido adiposo.

Cada lóbulo se subdivide en una serie de lobulillos de los cuales emergen conductos lactíferos tapizados por un epitelio escamoso estratificado. Los ductos terminan en racimos de alvéolos que secretan lípidos y proteínas específicos de la leche, fundamentalmente caseína durante la lactancia.

El sistema de conductos está rodeado por tejido conjuntivo

vo intralobular laxo, lo que permite una mayor distensibilidad durante el embarazo y la lactancia (258).

Se distinguen tres tipos fundamentales de células epiteliales: las que recubren los alvéolos, las que recubren los ductos y las células mioepiteliales que forman una capa alrededor de ductos y alvéolos (259). El crecimiento y desarrollo de estas estructuras epiteliales se produce por procesos de multiplicación o diferenciación celular (260).

### I.2.2. TUMORES MAMARIOS

En la glándula mamaria pueden desarrollarse tumores benignos y malignos.

El cáncer de mama representa en la actualidad la forma más frecuente de neoplasias malignas padecidas por la mujer en el mundo occidental, constituyendo una patología arduamente investigada sobre la cual se han alcanzado significativos progresos.

La identificación del cáncer de mama se realiza de acuerdo a la región anatómica de la misma que sirvió de origen al tumor. El 75% de los adenocarcinomas comienzan dentro de los conductillos y son conocidos como carcinomas intraductales, los cuales pueden ser invasores o no. Se han observado también adenocarcinomas inflamatorios (originados en el sistema linfático de la mama), lobulillares, y otros que afectan el pezón (enfermedad de Paget). Los carcinomas tubular, medular

y papilar son invasores y poseen una fracción de crecimiento y un potencial metastático distintos. El carcinoma in situ es no invasor.

Un tumor mamario se hace palpable cuando alcanza un tamaño de aproximadamente un centímetro, lo que equivale a la existencia de un billón de células o a 30 duplicaciones. La célula cancerosa de crecimiento más rápido se duplica cada 23 días mientras que la de crecimiento más lento cada 209 días.

El tiempo promedio de duplicación de un cáncer de mama ha sido estimado aproximadamente en cuatro meses. Cuando un tumor puede ser palpado su origen se remonta, en consecuencia, a por lo menos dos años (261).

El cáncer de mama se destaca por la diferencia en el tipo de células que conforman cada tumor.

### I.2.3. HETEROGENEIDAD TUMORAL

En un simposio realizado en 1982 "Tumor cell heterogeneity: Origins and implications" numerosos investigadores describen como un solo tumor canceroso puede estar compuesto por una mezcla de células que tienen diferentes propiedades (262).

Las subpoblaciones celulares pueden variar en su habilidad para diseminarse en otros sitios del cuerpo, en su susceptibilidad a la terapia con drogas, en la facilidad con que provocan o evitan respuestas inmunes y en su producción de

marcadores químicos a veces utilizados para la detección de cánceres particulares. Una subpoblación menor de células resistentes puede escapar a los efectos de la quimioterapia y continuar proliferando.

No se comprende con exactitud como los tumores comienzan a ser heterogéneos. Aunque algunos tumores pueden ser heterogéneos desde su inicio porque derivan de varias células distintas que sufren transformaciones malignas, se conoce que otros derivados de una sola célula (clones) también están compuestos por células con diferentes propiedades.

Se sabe que las células tumorales son más susceptibles de sufrir cambios genéticos que las normales. La heterogeneidad se produciría como consecuencia de las mutaciones.

Los cromosomas de las células tumorales tienen aspecto a normal. Además, el número de cromosomas de células de un mismo tumor varía muchísimo. Cambios visibles en los cromosomas pueden relacionarse con alteraciones en la malignidad del tumor. Hay casos de tumores que generan uno genéticamente diferente perdiendo las células los receptores hormonales durante el proceso (262).

#### I.2.4. EFEECTO DE LOS ESTROGENOS SOBRE TEJIDOS MAMARIOS

Hace mucho tiempo que se reconoce a los estrógenos como factores tróficos para el crecimiento mamario normal y neoplásico. La reducción de los niveles de estrógenos



circulantes por ovariectomía promueve la regresión tumoral en la tercera parte de las pacientes tratadas (263,264). Paradójicamente, la administración de dosis farmacológicas de estrógenos también causa regresiones tumorales (263,264). La regresión en respuesta a alguna de estas terapias se correlaciona con la presencia de receptores para estrógenos en las biopsias tumorales.

Las evidencias de que los esteroides por sí mismos sean carcinógenos es muy limitada. El punto de vista de la mayoría de los investigadores es que los esteroides ejercen sólo un rol permisivo. Podrían operar permitiendo o facilitando la acción primaria de otros agentes, como virus u otras hormonas, o promoviendo la proliferación celular dando grandes oportunidades a los carcinógenos de iniciar los cambios neoplásicos o quizás su rol sea mantener el crecimiento tumoral una vez iniciado (265).

Las razones de estudiar el metabolismo esteroideo en el cáncer de mama son entender mejor el papel de los esteroides en la carcinogénesis y particularmente en relación al control del crecimiento tumoral. Segundo, observar anomalías específicas en el metabolismo hormonal que puedan servir de "señales" de cáncer y, tercero, detectar y en lo posible reparar o modificar un ambiente hormonal desfavorable.

I.2.5. LINEAS CELULARES DERIVADAS DE CANCER MAMARIO  
HUMANO

El estudio de la dependencia hormonal del cáncer mamario humano se ha facilitado mediante el desarrollo de varios sistemas in vitro en los cuales el efecto de una hormona individual sobre tejidos neoplásicos puede medirse aislándose de los efectos endocrinos secundarios mediados por la hipófisis, el hipotálamo y otros tejidos endocrinológicamente activos.

El cultivo de tejidos de cáncer mamario humano permite el estudio de la respuesta hormonal del tumor independientemente de la interacción de otros factores endocrinos, en condiciones más similares a las existentes in vivo que utilizando sistemas con células dispersas (266). Estos cultivos consisten de variadas proporciones de células epiteliales, fibroblastos, adipocitos, normales y tumorales, en las cuales las orientaciones aproximadas entre las células del estado in vivo son retenidas. Esto es una importante consideración para evaluar la respuesta hormonal de un determinado tumor por lo siguiente (267):

1) Como in vivo, no todas las células tumorales están uniformemente expuestas a los nutrientes y hormonas presentes en el medio;

2) La actividad de las células normales circundantes a las células tumorales puede determinar en buen grado la cantiti

dad de hormona que recibe el tumor. Porejemplo, ésta puede ser reducida porque la hormona sea tomada por las células normales o convertida por éstas en metabolitos inactivos. Alternativamente, células como los adipocitos pueden promover el crecimiento tumoral metabolizando andrógenos a estrógenos y liberando estos últimos sobre la superficie de la célula tumoral.

3) Una dada hormona puede no actuar directamente sobre las células neoplásicas pero sí sobre el estroma, alterando el crecimiento tumoral.

4) La hormona puede alterar la elaboración de sustancias producidas por el tumor pero que actúan sobre las células que rodean a éste, modificando el crecimiento tumoral.

Sin embargo, la viabilidad limitada y la heterogeneidad de los tipos celulares presentes oscurece el estudio bioquímico de la acción hormonal sobre células neoplásicas mamarias en cultivo de tejidos.

Las células epiteliales de cáncer humano mamario en cultivos de largo plazo (líneas celulares) proveen un sistema sumamente ventajoso para el estudio del mecanismo de acción hormonal.

Las líneas celulares permanentes de cáncer mamario pueden crecer en monocapa o en suspensión y son, por definición, poblaciones celulares que comprenden un solo tipo celular, que se caracterizan por un alto grado de viabilidad y un po-

tencial de crecimiento ilimitado. Esto permite el estudio de los efectos hormonales sobre una población celular homogénea que está uniformemente expuesta a la hormona y en donde las condiciones nutricionales están impuestas en forma experimental a través de la composición del medio de cultivo. El ilimitado crecimiento de estas células permite desarrollar múltiples experimentos con poblaciones celulares prácticamente idénticas.

Sin embargo, las células de explantes tumorales humanos sufren un proceso sumamente selectivo antes de establecerse como un cultivo permanente. En consecuencia, es válido cuestionar el grado con que las respuestas de esta línea celular en cultivo representa la dependencia hormonal de los tumores humanos in vivo (267). Por otro lado, debe reconocerse que muchos experimentos de imposible realización in vivo debido a la complejidad del sistema endocrino o a las limitaciones de los estudios clínicos, pueden efectuarse fácilmente en investigaciones in vitro. Los resultados obtenidos en experimentos in vitro pueden sugerir hipótesis que luego deberán ser evaluadas experimentalmente in vivo.

Las líneas celulares de cáncer mamario en general derivan de efusiones pleurales obtenidas de pacientes con cáncer mamario metastático. Las líneas celulares más mencionadas en la literatura son la MCF-7, establecida por Soule y col. (268); la T47D por Keydar y col. (269); la ZR-75-1 por Engel

y col. (270) y la MDA-MB-231 establecida por Cailleau y col. (271). Como línea celular representativa del tejido mamario normal se considera a las células HBL-100 derivadas de leche humana, establecidas por Polanowski y col. (272).

La identidad morfológica entre la línea celular y el tejido tumoral que le dio origen es la medida más elemental para determinar la naturaleza mamaria humana y neoplásica de estas líneas. Las líneas exhiben la morfología de un epitelio secretorio típico de los tumores originales, incluyendo la presencia de desmosomas y tonofibrillas, y de un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático muy desarrollados.

Consistente con el hecho de su naturaleza mamaria y de su morfología diferenciada, se ha demostrado la presencia de receptores para estrógenos, progesterona, andrógenos, glucocorticoides e insulina en casi todas las líneas estudiadas (273-282). Receptores para hormonas tiroideas se identificaron en células MCF-7 (283).

Se ha intentado demostrar la síntesis en estas líneas celulares de proteínas mamarias específicas. En células MCF-7 y MDA-MB-231 se ha reportado la producción de pequeñas cantidades de  $\alpha$ -lactalbúmina (284,285). Producción pero no secreción de C-14 ácidos grasos, comunes en la leche humana, se demostró en células MCF-7 (286,287) y T47D (288). En las líneas MCF-7 y ZR-75-1 no se pudo probar la síntesis de caseína (270, 289) mientras que en las T47D (288) se encontraron gránulos

de caseína luego del tratamiento con progesterona.

### I.3. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Diversos autores han demostrado la estrecha relación existente entre las alteraciones estructurales o en la sobre expresión de ciertas proteínas y la transformación celular.

Las modificaciones en los procesos post-traduccionales parecen desempeñar un importante papel en el desarrollo neoplásico en un vasto número de sistemas, siendo la adición de cadenas sacarídicas a proteínas parte de estos mecanismos.

Dado que la mayoría sino todos los antígenos asociados a la patología mamaria se hallan glicosilados, hemos conside rado de importancia tratar de caracterizar las posibles vías metabólicas por medio de las cuales tales proteínas podrían glicosilarse en forma defectiva, ya que las diferencias entre los antígenos mencionados parece residir en la compleja por ción sacarídica más que en la relativamente constante estruc tura proteica.

En tal sentido, fue el objetivo inicial de la presente Tesis describir la participación de lípidos intermediarios en la glicosilación de proteínas en tejido mamario humano, efectuándose un análisis comparativo de dicho mecanismo en tejido normal y en tumores benignos y malignos. El estudio se centró en las etapas relacionadas con la transferencia de monosacáridos desde nucleótido-azúcares a poliprenil derivados

y en la transferencia del oligosacárido preformado a aceptores proteicos endógenos.

Por otro lado, se decidió analizar los posibles mecanismos regulatorios ejercidos por hormonas y antihormonas sobre la ruta metabólica mencionada, utilizando para ello, líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1. DROGAS Y SUSTRATOS

#### Drogas radiactivas:

##### Azúcares:

Provenientes de New England Nuclear

$^{14}\text{C}$ -Glc            A.E.: 285-360 mCi/mmol

$^{14}\text{C}$ -GlcN            A.E.: 355 mCi/mmol

$^3\text{H}$ -GlcN            A.E.: 30 Ci/mmol

$^3\text{H}$ -Man            A.E.: 14,5 Ci/mmol

$^{14}\text{C}$ -Man            A.E.: 45-55 mCi/mmol

##### Aminoácidos:

Proveniente de New England Nuclear

$^{35}\text{S}$ -Met            A.E.: 1.109 Ci/mmol

##### Nucleótido-azúcares:

Preparados en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" de acuerdo al método de Wright y Robbins (290)

GDP- $^{14}\text{C}$ -Man        A.E.: 216,5 mCi/mmol

GDP- $^3\text{H}$ -Man        A.E.: 10.800 mCi/mmol

UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc        A.E.: 196 mCi/mmol

UDP- $^3\text{H}$ -Glc        A.E.: 3,46 mCi/mmol

UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNAc    A.E.: 45-60 Ci/mol de New England

nuclear.

Otras: Se utilizó  $^3\text{H}$ -Dol cedido por el Dr. E. Belo-



copitow y Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido proporcionado por el Dr. L. A. Quesada, ambos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

Cultivo:

Todos los medios de cultivo y el SFB provienen de Gibco Lab. La insulina y el EGF son de Collaborative Research. La transferrina es de Sigma.

Hormonas y antihormonas:

El E<sub>2</sub> y la P son de Sigma. La Naf de Upjohn Co y el citrato de Tam fue gentilmente cedido por Gador.

Otros:

Dol-P de hígado porcino de Sigma.

Kojibiosa de Koch Light.

Tunicamicina proveniente de Sigma y de Lilly.

Todo otro reactivo utilizado fue de grado analítico.

## II.2. TEJIDO UTILIZADO

### II.2.A. TEJIDO MAMARIO

El tejido mamario humano proviene de especímenes de mastectomías o biopsias y ha sido provisto por la División de Cirugía del Hospital Municipal de Oncología.

Los tumores fueron sujetos a análisis anátomo-patológicos y clasificados como benignos o malignos. El tejido considerado como normal corresponde a tejido peritumoral procedente de la misma paciente portadora del tumor maligno utilizado en el

ensayo en cuestión.

#### II.2.A.1. INCUBACIONES DE CORTES DE TEJIDO

Se utilizó un método basado en los trabajos de Spiro y col. (291).

Preparación del medio de cultivo: Se prepara una solución de  $\text{NaHCO}_3$  40 mM,  $\text{ClNa}$  85 mM,  $\text{ClK}$  10 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  4 mM,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1 mM, piruvato de Na 5 mM, albúmina humana 0,7 mg/ml. Se pasa a través de un filtro de Millipore y luego se agrega en forma estéril, 1% de "MEM Vitamins solution" x 100, 2% de "MEM Aminoacids" x 50 (sin glutamina), 1/10.000 de penicilina y 1/20.000 de estreptomicina.

Se corta el tumor en láminas delgadas de aproximadamente 200 mg que se introducen en un erlenmeyer con 0,25 ml del medio de cultivo. Se añaden otros 0,25 ml de medio que además contiene aproximadamente 10  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -GlcN. Se incuba en baño de agua con agitación a 37° C, bajo carbógeno.

Para detener la reacción se retira el medio de cultivo y se lava dos veces el tejido con 0,5 ml del medio descrito adicionado de GcN fría 4 mM.

Los lavados se reúnen con el medio de cultivo retirado y se agrega cloroformo y metanol hasta llevar a una proporción C/M/A 3:2:1 y se hace una partición de Folch (ver II.2.A.4.).

Al tejido se agregan 4 ml de C/M 3:2 y se homogeneiza en un homogeneizador Potter-Eveljheim. Se centrifuga. Se repite

con 1 ml de C/M 3:2. Se reúnen los extractos. Se añade 1 ml de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  4 mM, llevando la mezcla a una proporción C/M/A 3:2:1. Se continúa procesando de acuerdo a lo descrito en II.2.A.4.

#### II.2.A.2. PREPARACION DE FRACCIONES RICAS EN MICROSOMAS

Los tumores se cortan con tijeras y se homogeneizan en un Polytron Pt-10 (Brinkman Instruments Inc.). Se preparan microsomas según dos métodos diferentes:

a) Para la homogeneización se utiliza un buffer Tris pH 7,5 100 mM, EDTA-Na 0,5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, 2-S-etanol 1 mM, sacarosa 330 mM, en una proporción tumor/buffer 1:4 P/V. El homogenato se filtra a través de gasa cuádruple y se centrifuga durante 20 min a 13.000 g. Se descarta el pellet y se centrifuga el sobrenadante 105.000 g durante 2 horas. El precipitado, rico en microsomas, se resuspende en el buffer de homogeneización. El material se fracciona en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  que se conservan a  $-70^\circ\text{C}$ .

b) Se preparan microsomas "lavados" siguiendo la técnica descrita por Lucas y col. (211). Se realiza el homogenato en un buffer Tris-HCl pH 7,4 10 mM, sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, NaCl 0,9% en igual proporción que en a). Se centrifuga 15 min a 600 g. Se remueve el sobrenadante y el pellet se homogeneiza reiteradas veces. Se reúnen los sobrenadantes y se centrifugan 15 min a 6.500 g y el nuevo sobrenadante 15 min a 48.000 g. El precipitado ahora obtenido se resuspende en el buffer de

homogeinización ("microsomias sin incubar") o se incubaba 15 min a 37 °C en presencia del medio descrito adicionado de  $MnCl_2$  10 mM ("microsomias incubados"). Se fracciona de igual manera que en a).

#### II.2.A.3. INCUBACIONES CON MICROSOMAS

En cada experimento se utilizan diferentes condiciones de incubación. Como regla general, las enzimas presentes en preparaciones microsomales cuando son suplementadas con lípidos exógenos necesitan la adición de detergentes. Las enzimas que transfieren monosacáridos del nucleótido derivado al poliprenil, requieren cationes divalentes y son inhibidas por EDTA.

Como ejemplo de una mezcla de incubación podemos considerar:

Tris-HCl pH 7,4 100 mM

$MgCl_2$  14 mM

EDTA-Na 2 mM

2-S-etanol 40 mM

GDP-<sup>14</sup>C-Man / UDP-<sup>14</sup>C-Glc 1-2 x 10<sup>5</sup> cpm

El volumen final de la mezcla de incubación es de 50 µl.

Las incubaciones se llevan a cabo en baño de agua (generalmente a 30 °C) con agitación y se inician con el añadido de la preparación microsomal. Al comienzo de la incubación se agita enérgicamente en Vortex para homogeneizar la mezcla. Las

incubaciones se prolongan por 20-30 min y se interrumpen por desnaturalización de la proteína con 1 ml de C/M 3:2.

#### II.2.A.4. PROCESAMIENTO DE LOS INCUBADOS

Una vez interrumpida la reacción con la mezcla cloroformo-metanólica se procesan los incubados de acuerdo al método general de Folch y col. (292) de reparto de solventes. El material insoluble se separó del liposoluble por centrifugación. En algunos casos para favorecer dicha separación se agrega a cada tubo 50  $\mu$ l de un preparado de proteína "transportadora" (ver II.3.). Luego de la separación el material insoluble se reextrae con 1 ml de C/M 3:2.

Se vuelve a separar el material insoluble y se juntan los sobrenadantes cloroformo-metanólicos de ambas extracciones (aproximadamente 2 ml). Se añaden 0,35 ml de  $MgCl_2$  4 mM, llevando la mezcla de solventes a una relación C/M/A 3:2:1., con el objeto de particionar en dos fases, la superior acuosa y la inferior orgánica.

Para la aislación y lavados se sigue el procedimiento que se detalla:

a) Después de centrifugar para separar las fases se aísla la superior por succión, dejando un menisco para evitar turbulencias y pérdida de fase inferior.

b) Se añade lentamente fase superior teórica (C/M/A 3:48:47) hasta 40 % del volumen final, con el objeto de diluir las

sustancias acuosolubles remanentes en el menisco.

c) Sin centrifugar se elimina nuevamente la fase superior.

d) Se añade fase superior teórica, manteniendo la proporción de 40 % del volumen final. Se agita vigorosamente y se centrifuga para separar las fases. Se elimina la fase superior.

e) Se repite b) y c).

Se obtiene así una "fase inferior" limpia en la que habitualmente se encuentran glicolípidos y fosfolípidos de hasta mediana polaridad. En esta fracción se extraen los poliprenilfosfato-monosacáridos y poliprenil-pirofosfato-oligosacáridos de hasta 6 u 8 azúcares (293).

La proteína parcialmente deslipidificada se lava 3 veces con 1 ml de fase superior teórica y luego con 1 ml de metanol anhidro para secar. Se evapora el metanol hasta casi sequedad y se extrae la proteína con 1 ml del solvente de Leloir (294) C/M/A 10:10:3, dejándolo 30 min a 37 °C. Se repite la extracción con otro ml de C/M/A 10:10:3 y se reúnen los extractos. Este solvente solubiliza materiales muy polares y cargados como los poliprenil-pirofosfato-oligosacáridos (295).

El material insoluble en el solvente de Leloir, luego de evaporar las trazas de éste bajo nitrógeno, se resuspende en 1 ml de TCA 10 %. Se calienta 5 min a 100 °C en baño de agua, con el objeto de hidrolizar los posibles poliprenil derivados contaminantes (296). Los eventuales restos de nucleótido azú-

car o azúcar-P lábil también se hidrolizan. El material soluble en TCA caliente se descarta y se lava el insoluble con 1 ml de TCA 10 % frío. Se realiza un lavado con 1 ml de éter e tílico y otro con 1 ml de metanol. Se añaden 200 µl de Protosol (NEN) y se calienta 5 min a 100 °C, hasta lograr la clarificación de la suspensión. Se añade mezcla centellante 4 % Omni-fluor en tolueno y se neutraliza con 6 µl de ácido acético glacial, para evitar la activación por el álcali.

Las fracciones que han sido consideradas en los estudios que posteriormente se detallan son la fase inferior de la partición de Folch (poliprenil-P-monosacáridos y poliprenil-PP-oligosacáridos de hasta 6-8 azúcares), el extracto soluble en C/M/A 10:10:3 (poliprenil-PP-oligosacáridos mayores) y el material insoluble en TCA caliente (glicoproteínas)

#### II.2.B. LINEAS CELULARES

El cultivo celular consiste en el mantenimiento in vitro de células extraídas de tejidos por más de 24 horas. Una línea celular se inicia en el momento del primer subcultivo (pasaje de células de un recipiente de cultivo a o tro) de un cultivo primario (células o tejido tomados directamente del organismo y puestos a vivir en un medio artificial).

Puede decirse que una línea celular se ha "establecido" cuando demuestra posibilidades de ser subcultivada indefinidamente (297,298).

Las líneas celulares con que se trabaja crecen en monocapa formando sobre una superficie una única lámina continua de células de forma poligonal, fuertemente adheridas y en íntimo contacto unas con otras.

Los trabajos involucrados en esta Tesis se han realizado sobre líneas celulares provenientes de efusiones pleurales de pacientes con cáncer de mama. La línea MCF-7 fue establecida por Soule y col. en 1973 (268) y la T47D por Keydar y col. en 1979 (269). De esta última línea se han utilizado los clones 8 y 11 provenientes del laboratorio de la Dra. Keydar y células denominadas T47D-X, procedentes del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Louisville.

#### II.2.B.1. TECNICAS DE CULTIVO

Las células en stock se conservan congeladas. Para ello se han utilizado células en período de proliferación activa.

Para prevenir la ruptura de membranas por la formación de cristales de hielo intracelulares, se emplea como crioprotector DMSO, que extrae el agua por tener afinidad con ésta.

Para congelar las células se las coloca en criotubos con el medio correspondiente y 10 % de DMSO. Los criotubos se mantienen una hora a  $-4^{\circ}\text{C}$ , luego 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y por último en tubos de nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , donde se mantienen vivas durante años. Este congelamiento lento facilita la acción del DMSO.



El descongelamiento se realiza en forma rápida para impedir recristalizaciones del agua intracelular.

Se siembra el contenido del criotubo y, una vez que las células están adheridas, se cambia el medio, ya que el DMSO puede resultar tóxico.

Una vez sembradas, las células se mantienen en cultivo en frascos de plástico con medios apropiados. Para las células T47D se utiliza RPMI-1640, insulina  $10^{-7}$  M, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y estreptomicina, 1 % de aminoácidos no esenciales y 10 % de SFB (Medio A). Las células MCF-7 se cultivan en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), insulina  $10^{-7}$  M, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y estreptomicina y 5 % de SFB (Medio B).

Las células se mantienen a 37 °C, en una atmósfera totalmente estéril con 5 % de dióxido de carbono. Cuando llegan a un 70-100 % de confluencia sobre la superficie del frasco se subcultiva las células. El procedimiento de pasaje celular o repique se realiza con una solución de tripsina-EDTA con la cual se humedece la monocapa, dejándola actuar durante 10 min a 37 °C. Este procedimiento afecta la membrana celular, permitiendo que las células se despeguen. Se homogeneiza las células y se las pasa a nuevos frascos con medio de cultivo fresco.

Para la realización de los experimentos descritos en esta Tesis se subcultiva una cantidad determinada de células

en cajas de plástico de tipo "multiwell" de 15 mm de diámetro o en cajas de Petri de 35 mm de diámetro.

Todos los procedimientos a que se somete las células se efectúan bajo rigurosas condiciones de esterilidad. Para ello se utilizan soluciones filtradas a través de membranas de Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ , se trabaja en equipos de flujo laminar vertical (campana de seguridad biológica clase 2) y se emplea material de plástico descartable o de vidrio esterilizado por calor seco en estufa a 160 °C o por calor húmedo en autoclave.

#### II.2.B.2. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS

Las células se lavan con PBS despegándose de la superficie a la cual están adheridas por el procedimiento de tripsinización descrito en II.2.B.1. Se homogeneiza y se centrifuga a 2.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se elimina y el pellet celular se resuspende en un volumen conocido de medio. Se homogeneiza. Se deposita una alícuota en una cámara de Neubauer a fin de determinar el número de células presentes.

#### II.2.B.3. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para analizar el crecimiento de las células se las subcultiva en cajas de Petri plásticas de 35 mm de diámetro. Se siembra un número de células tal que durante el tiempo a realizar el experimento se abarque el rango

de multiplicación activa celular. Se siembran en 2 ml del medio apropiado, A las 24 horas se reemplaza el medio por el medio a ensayar y se determina el número de células (II.2.B. 2.) para el llamado día 0. Así se continúa durante aproximadamente una semana determinando el número celular diariamente y cambiando el medio cada 48 horas.

II.2.B.4. INCUBACION DE LAS CÉLULAS CON AZUCARES RADIATIVOS Y  $^{35}\text{S}$ -METIONINA

Para realizar los ensayos se subcultiva las células en cajas de plástico tipo "multiwell" de 15 mm o en cajas de Petri plástica de 35 mm de diámetro.

Días antes de iniciar los experimentos se modifica el medio de cultivo reemplazando el SFB por SFB libre de esteroides (ver II.6.). Alternativamente, y de acuerdo a lo propuesto por Barnes y Sato (299) se subcultiva las células en distintos medios definidos:

Para células T47D:

Medio definido I: RPMI 1640, glutamina 2 mM, piruvato de Na 1 mM, insulina  $2 \times 10^{-6}$  M, EGF 50 ng/ml, transferrina 10 µg/ml, sulfato ferroso 2,5 µM.

Medio definido II: DMEM:Ham's F-12 1:1, glutamina 2 mM, insulina  $10^{-7}$  M, albúmina sérica bovina 1 mg/ml.

Para células MCF-7:

Medio definido III: MEM alfa:Ham's F-12 1:1,

insulina 10  $\mu\text{g/ml}$ , EGF 50 ng/ml, transferrina 10  $\mu\text{g/ml}$ , sulfato ferroso 2,5  $\mu\text{M}$ , albúmina sérica bovina 1 mg/ml.

Medio definido IV: DMEM, glutamina 2 mM, in sulina  $10^{-7}$  M, albúmina sérica bovina 1 mg/ml.

Todos los experimentos se realizan con cultivos subconfluentes.

Antes de comenzar los ensayos el medio se reemplaza por MEM sin Glc o sin Met y sin SFB, suplementado con 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (300). Bajo estas condiciones no se observan cambios en las células al menos durante 7 horas. En los últimos experimentos se añadió al medio piruvato de Na 1 mM (291). El volumen de incubación es de 250  $\mu\text{l}$  para "multiwells" y de 0,8 y 3 ml para cajas de Petri de 35 y 60 mm de diámetro respectivamente.

En general, luego de una hora de cultivo con el medio de privado se añade a las células 5  $\mu\text{l}$  de una solución alcohólica de hormona o antihormona (diluída a la mitad con medio de cultivo para atenuar el efecto del etanol). Una hora después se agrega el azúcar o el aminoácido radiactivos, continuándose las incubaciones de 3 a 5 horas más. Los cultivos controles se llevan a cabo en iguales condiciones reemplazando el agregado de hormonas o antihormonas por 5  $\mu\text{l}$  de etanol diluido a la mitad.

Las reacciones se detienen por enfriamiento de las células y rápida aspiración del medio de cultivo.

Se siguen dos métodos alternativos:

a) Se añade a las células 1 ml de TCA 10 % frío que se aspira y descarta.

b) Se lava las células con 0,5 ml de PBS, reuniéndose los lavados y el medio de cultivo previamente separado en un tubo con 2,6 ml de metanol (I). Se añade a las células 0,5 ml de metanol.

#### II.2.B.5. PROCESAMIENTO DE LOS INCUBADOS

Se procede en forma diferente de acuerdo al método utilizado en II.2.B.4.

a) Se lava las células con buffer Tris-HCl pH 7,5 200 mM frío. Se añaden 0,2 ml de  $MgCl_2$  4 mM. Se cosecha las células con ayuda de un "policeman" de goma, trasvasándose el material a un microhomogeneizador vidrio-vidrio. Los wells y el homogeneizador se lavan dos veces con 0,3 ml de metanol y luego se agrega al último 0,9 ml de cloroformo. Los extractos se juntan en un tubo al cual se añaden 0,1 ml de proteína "transportadora" (alternativamente si el pellet celular resulta escaso) preparada de acuerdo a lo descrito en II.3. Se obtiene un sistema cuya composición global es C/M/A 3:2:1. Se centrifuga 15 min a 500 g y se separan las fases superior e inferior de la interfase.

Se agrega al material presente en la interfase cloroformo, metanol y  $MgCl_2$  4 mM hasta llevar la muestra a una propor

ción C/M/A 3:2:1. Se repite el procedimiento.

Las fases superiores que contienen la mayor parte de los azúcares se descartan.

Las fases inferiores combinadas se lavan dos veces con 40 % de su volumen de fase superior teórica (C/M/A 3:48:47), centrifugándose después de cada lavado.

La interfase se lava con 1 ml de fase superior teórica y luego con 1 ml de metanol. Se extrae con 1 ml de C/M/A 10:10:3.

Se añade otro ml del mismo solvente y se incuba 30 min a 37°C para favorecer la extracción. Se continúa procesando de acuerdo a lo descrito en II.2.A.4. La radiactividad insoluble en TCA caliente se considera como glicoproteínas (301).

b) Se cosecha las células con ayuda de un "policeman" de goma, trasvasándose el material a un tubo con pipeta Pasteur. Se repite el procedimiento añadiendo dos veces 0,25 ml de metanol. Se agregan al tubo 1,5 ml de cloroformo. Se agita y se centrifuga. Se añade al sobrenadante 0,5 ml de  $MgCl_2$  4 mM, alcanzándose una relación C/M/A de 3:2:1, de acuerdo al procedimiento descrito por Folch (292).

El sistema se particiona en una fase superior (II) y en una fase inferior (III). El pellet se lava 3 veces con 0,5 ml de fase superior teórica con añadido de  $MgCl_2$  4 mM (IV) y luego una vez con el mismo solvente sin añadido salino (V). Se añade 1 ml de metanol (VI) y luego se extrae 2 veces con 1 ml de C/M/A 10:10:3, calentando la primera vez 30 min a 37°C

(VII). El precipitado se lava nuevamente con 1 ml de metanol (VIII) y luego se precipita con 1 ml de TCA 10 % frío. Se conserva la fracción soluble (IX) y el precipitado se resuspende en 1 ml de TCA 10 %, calentándose 7 min a 100 °C. Se obtiene una fracción soluble (X) y una insoluble (XI).

Para mayores aclaraciones ver II.2.A.4.

#### II.2.B.6. ENSAYOS CON TUNICAMICINA

Se plaquean células T47D-cl1 en "macrowells" en 1 ml de RPMI 1640. A las 48 h se cambia el medio y se añade tunicamicina. Luego de 40 h se retira el medio y se lava las células con 250 µl de MEM sin Met. Se añaden 250 µl de MEM sin Met, adicionado de glutamina 2 mM, insulina  $10^{-7}$  M, albúmina sérica bovina 1 mg/ml y antibióticos. Se agrega nuevamente tunicamicina y 0,75 µCi de  $^{35}$ S-Met, incubándose durante 3 h. Se aspira y descarta el medio. Se lava 2 veces con solución fisiológica. Se resuspende las células en 200 µl de una solución de lisis (urea 8,7 M, Nonidet P-40 2 %) y se las transfiere a un tubo con 200 µg de albúmina sérica bovina y 100 µl de agua. Se añaden 500 µl de TCA 20 % frío. Se filtra a través de filtros de Millipore y se determina la radiactividad presente en los filtros utilizando mezcla de Bray.

#### II.2.B.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE DOLIQUIL

##### KINASA

II.2.B.7.a. Preparación de fracciones ricas en microsomas

Se cultivan células T47D-cl1 de acuerdo a lo descrito en II.2.B.1., partiéndose de aproximadamente 30 millones de células. Se tripsiniza. Se añade EDTA 0,25 M para suspender la reacción y se centrifuga para eliminar el medio de cultivo. Se lava el precipitado dos veces con buffer Tris-HCl pH 7,5 50 mM, ClK 25 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM, ClNa 120 mM. Se homogeneiza en Omnimixer en 1 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,4, EDTA 0,5 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 1 mM, 2-S-etanol 1 mM, sacarosa 330 mM y PMFS 0,1 mM. Se controla la ruptura celular al microscopio. Se centrifuga 20 min a 13.000 g y luego el sobrenadante 2 h a 105.000 g. El precipitado, rico en microsomas, se resuspende en 50 µl del buffer de homogeneización y se conserva a -70 °C.

II.2.B.7.b. Incubaciones con microsomas

Las enzimas presentes en preparaciones microsomales necesitan la adición de detergentes cuando son suplementadas con lípidos exógenos.

La mezcla de reacción es la siguiente: Tris-HCl pH 7,5 100 mM, FNa 10 mM, Triton X-100 0,2 %, 10 mM de cationes divalentes, 1 µg de Dol-P de hígado porcino, 25.000 cpm de <sup>3</sup>H-Dol



y CTP 10 mM.

El trazador radiactivo y los lípidos exógenos se llevan a sequedad bajo flujo de nitrógeno en el tubo de reacción, añadiéndose luego los restantes componentes. El volumen final de la mezcla de reacción es de 50  $\mu$ l.

Las incubaciones se llevan a cabo en baño de agua a 37°C con agitación, durante una hora y se inician con el añadido de 10  $\mu$ l de la preparación microsomal. Se interrumpen por desnaturalización de la proteína por agregado de .1 ml de C/M 3:2. Se obtiene una única fase.

La proteína precipitada se remueve por centrifugación 10 min a 3.000 rpm. Se añade agua al sobrenadante hasta llegar a una proporción C/M/A 3:2:1 de acuerdo al método de Folch (292).

### II.3. PREPARACION DE PROTEINA "TRANSPORTADORA"

Para favorecer la separación del material insoluble en solventes orgánicos del liposoluble, se añade a los tubos una proteína "transportadora" que consiste en microsomas de hígado de rata.

Se homogeneiza 50 g de hígado de rata en un homogeneizador Potter-Eveljheim en 100 ml del buffer descrito en II.2.B. 7.a. Se centrifuga 15 min a 2.800 g, descartándose el precipitado. El sobrenadante se centrifuga nuevamente a 180.000 g durante 2 h. El pellet se resuspende en el buffer de homogeneización.

#### II.4. PREPARACION DE DOL-PP-OLIGOSACARIDO

Se utiliza un método basado en los trabajos de Spiro y col. (291).

Se parte de 2 g de la porción del magnum del oviducto de gallina en el pico de postura. Se corta en pequeños trozos con tijera que se introducen en un erlenmeyer con 0,25 mCi de  $^{14}\text{C}$ -Glc previamente evaporados bajo nitrógeno, y 5 ml de medio. Este está compuesto por:  $\text{NaHCO}_3$  40 mM, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, NaCl 85 mM, 1 % "MEM Vitamins solution" x 100; 2 % "MEM Aminoacids" x 50 (sin glutamina), 1 % "MEM non esencial aminoacids" x 100, glutamina 2 mM, piruvato de Na 5 mM y  $\text{CaCl}_2$  10 mM (el  $\text{CaCl}_2$  se agrega al final para evitar su insolubilización).

Se incuba en baño con agitación a 37 °C bajo corriente de carbógeno durante 3 h.

Se retira el sobrenadante. Se lava el tejido 3 veces con 25 ml de sacarosa 0,25 M. Se suspenden los trozos de oviducto en EDTA 0,2 M pH 7,7 (volumen final 6 ml), homogeneizando con Omnimixer. Se añaden 12 ml de metanol y 18 ml de cloroformo.

Se eliminan las fases inferior y superior y se extrae la interfase dos veces con 30 ml de C/M/A 3:2:1. Se lava la interfase con 15 ml de fase superior teórica y luego con 15 ml de agua. Finalmente se extrae tres veces con 10 ml de C/M/A 10:10:3 y una vez con 15 ml del mismo solvente durante toda la noche. Se centrifuga. Se seca el sobrenadante bajo corriente de nitrógeno.

Con este método se obtiene Dol-PP-oligosacárido marcado en todos los azúcares

#### II.5. PREPARACION DE 5-CARBOXIMETIL- $\alpha$ -LACTALBUMINA

Se preparó 5-carboximetil- $\alpha$ -lactalbúmina según el método descrito por Brew y col. (302) para ser ensayada como aceptor proteico endógeno.

Se disuelven 300 mg de  $\alpha$ -lactalbúmina en 15 ml de una solución de cloruro de guanidina 6 M, 2-S-etanol 0,18 M y Tris-HCl pH 8,6 0,1 M. Se burbujea bajo nitrógeno durante 5 min. Se incuba durante 12 h a temperatura ambiente.

Se agregan 2,7 mmoles de ácido iodoacético disueltos en 2 ml de cloruro de guanidina 6 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,6. Se mezcla y se deja 15 min a temperatura ambiente. Se dializa y se liofiliza. Se disuelve en Tris-HCl 0,1 M pH 7,7. Se mide la concentración de proteínas que resulta ser de 6 mg/ml.

#### II.6. PREPARACION DE SUERO FETAL BOVINO LIBRE DE ESTEROIDES

Con el objeto de remover los esteroides se trata al suero con carbón (303). Cada lote de suero contiene cantidades variables de esteroides. Para controlar la efectividad del tratamiento se agrega al suero  $E_2$  radiactivo como monitor.

La marca se añade el día anterior al tratamiento para que tenga lugar la unión a proteínas. La remoción de esteroides

se efectúa añadiendo al suero 2 % P/V de carbón (Norit A, Fischer) y calentándolo 1 h a 55 °C. El carbón se remueve por centrifugación. Se repite el procedimiento 5 veces lográndose más del 95 % de eliminación de la marca. El suero es luego esterilizado por filtración a través de filtros de Millipore (0,22  $\mu$ ).

Este tratamiento remueve también otros compuestos de bajo peso molecular como ácidos grasos y factores de crecimiento.

#### II.7. HIDROLISIS ACIDA SUAVE

Para reconocer poliprenil fosfato azúcares se sometió el material en estudio a una hidrólisis a pH 2, tratamiento que rompe la unión entre el fosfato proximal al azúcar y éste (304). Esta es una sensibilidad al ácido típica y no se conocen otros glicolípidos con esa labilidad. Si hay un enlace pirofosfato también se rompe la unión entre el fosfato y el primer azúcar.

Se lleva a seco la muestra de glicolípido bajo flujo de nitrógeno. Se añaden 200  $\mu$ l de HCl 0,01 N y 5  $\mu$ l de azul de Timol como indicador y 5  $\mu$ l de butanol saturado con agua como emulsionante. Se agita en un vibrador Vortex. Se tapa el tubo con una bolita de vidrio y se calienta a 100 °C, en baño de agua, durante 30 min. Luego de enfriar se añade 1 ml de C/M 3:2 y se realiza la partición de Folch descrita en II.2.A.4.

La fase superior contiene los productos hidrosolubles de la hidrólisis y la fase inferior el glicolípido resistente al tratamiento y otros productos liposolubles.

#### II.8. HIDROLISIS CON FENOL

Se usó el procedimiento de García y col. (305).

Se seca la muestra bajo flujo de nitrógeno y se la resuspende, agitando enérgicamente, en 200 µl de fenol destilado al 50%. Se calienta 60 min a 70 °C, agitando ocasionalmente. Al término de la incubación se centrifuga para separar la fase fenólica de la acuosa, lavando la primera con agua que se mezcla con la fase acuosa. Los restos de fenol se eliminan con éter etílico.

#### II.9. METODOS CROMATOGRAFICOS

##### II.9.1. CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL

Se realiza en forma ascendente o descendente en papel Schleicher & Schüll 2043a o en Whatman N° 1.

Los solventes utilizados son:

A) 1-butanol/piridina/agua 6:4:3 (306)

B) 1-butanol/piridina/agua 4:3:4 (307)

C) n-propanol/agua/nitrometano 5:4:2

D) 1-butanol/piridina/agua 10:3:3 (308)

Los azúcares se revelan con el reactivo de plata alcali-

no (309) y sus modificaciones (310).

#### II.9.2. CROMATOGRAFIA SOBRE CAPA DELGADA

Se utilizan placas de Sílica gel G (Merck-5721 o Whatman K5) sobre base de vidrio o preparadas en el laboratorio (33 g de Sílica gel + 67 g de agua). Se activa las placas durante 1 h a 100 °C.

Se emplean los siguientes solventes:

E) cloroformo (311)

F) cloroformo/2-propanol/95 % etanol/ácido acético glacial 2:2:3:1 (312)

G) cloroformo/2-propanol/95 % etanol/ácido acético 1 N 2:2:3:1 (313)

H) n-propanol/agua 7:3

El frente recorre aproximadamente 14 cm en 2 h a 20-25 °C.

El revelado de los azúcares sembrados en las placas se realiza por el método del orcinol. Por acción del ácido sulfúrico en caliente las hexosas se deshidratan produciendo  $\alpha$ -hidroximetilfurfural (inestable), que se condensa con el 3,5-dihidrotolueno (orcinol) dando color.

Se efectúa el siguiente procedimiento (313): se prepara una solución de 200 mg de orcinol en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado/agua 3:1. Se rocía suavemente la placa y se calienta a 90-100 °C cuidando de no sobre-revelar. Los glicolípidos dan un color diferencial pardo violáceo o violeta, viran-

do a malva.

Alternativamente, se prepara el reactivo agregando a 200 mg de orcinol 1 ml de agua. Se añade 1 ml de etanol absoluto lográndose la redisolución. Se añaden 35 ml de HCl(c) y nuevamente 9 ml de etanol para redissolver. Se agregan 800 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Se rocía la placa que se calienta a 90-100 °C, controlándose el revelado.

Revelado con iodo: Se somete la placa a vapores de iodo en un desecador. Todo enlace insaturado fija al iodo, por lo que el revelado es inespecífico. Los lípidos saturados también disuelven al iodo, pero la coloración es menos intensa.

### II.9.3. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

Se prepara DEAE-celulosa según el método de Rouser y col. (314).

Se agrega DEAE-celulosa (Whatman) a 500 ml de HCl 0,1 N.

Se filtra por Büchner. Se agregan 500 ml de HCl 0,1 N y se lava con agua destilada hasta neutralidad. Se añaden 250 ml de KOH 0,1 N, lavándose con agua hasta neutralidad. Se deja la resina toda la noche en ácido acético glacial. Se filtra por Büchner y se lava con metanol hasta pH neutro. Se guarda suspendida en metanol.

Se preparan columnas de 0,5 cm de diámetro por 4-4,5 cm de alto.

Se equilibra las columnas con 10 ml de C/M 1:1 y luego

con 15 ml de C/M 3:2.

Se siembran las muestras disueltas en C/M 3:2 o en el menor volumen posible de C/M/A 10:10:3. Se agrega 0,8-1 ml de C/M 3:2 y se recicla 3 veces el material eluído.

Se utilizan dos métodos alternativos:

a) Se recogen fracciones de 1 ml añadiéndose sucesivamente 15 ml de C/M 3:2, 6 ml de C/M 1:1, 12 ml de C/M/A 10:10:3, 12 ml de formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3, 12 ml de formiato de amonio 25 mM en el mismo solvente y finalmente 4 ml de formiato de amonio 250 mM en igual solvente.

b) Se agregan a la columna fracciones de 0,8 ml de los distintos solventes recogiendo cada una en un tubo diferente.

Se eluyen 10 fracciones de C/M 3:2, 4 fracciones de C/M 1:1, 6 fracciones de C/M/A 10:10:3, 8 fracciones de acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3, 8 fracciones de acetato de amonio 25 mM en C/M/A 10:10:3 y finalmente 4 fracciones de acetato de amonio 200 mM en el mismo solvente.

Con este tipo de columnas es posible separar Dol-P-mono-sacáridos de Dol-PP-azúcares que para ser eluídos requieren mayor concentración salina (294).

Cuando se utilizan columnas de DEAE-celulosa para separar Dol de Dol-P los solventes de elución son: 10 ml de C/M 3:2, 4 ml de C/M 1:1 y 5 ml de formiato de amonio 250 mM en C/M/A 10:10:3. Se recogen sólo 3 tubos.



## II.10. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se procedió según lo descripto por Laemmli (315).

Se preparó un gel separador de poliacrilamida 7,5 % en Tris-HCl pH 8,8 0,375 M, un gel "stacking" 5 % en Tris-HCl pH 6,7 0,125 M. Ambos geles se prepararon con 0,1 % de SDS, 0,1 % de TEMED y 0,03 % de persulfato de amonio.

Las muestras a ser analizadas se disuelven en 50  $\mu$ l del siguiente buffer: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, urea 6 M, SDS 1 %, 2-S-etanol 5 %. Se incuba 30 min a 37 °C. Se neutraliza. Se agrega azul de bromofenol como indicador y se siembra en los geles. Como buffer de corrida se utiliza Tris 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS 0,1 %.

Los geles se tiñen con Coomasie blue (316).

## II.11. ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DE PROTEINAS

Se realizaron dos procedimientos diferentes:

a) Incubaciones con microsomas: Para favorecer la disolución de las muestras de microsomas se emplea deoxicolato al 5 %, calentándose 15 min a 37 °C luego de su agregado. La medición de proteínas se realiza según el método de Lowry y col. (317) o de Bradford (318) utilizándose albúmina sérica bovina como patrón. Los resultados obtenidos con ambos métodos fueron coincidentes. Las mediciones se efectuaron a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DB-G.

b) Incubaciones con células: Las células adheridas a las cajas de Petri o a los wells se tratan con una solución de urea 8,7 M y Nonidet P-40 al 2%. El análisis espectrofotométrico de proteínas se realiza de acuerdo al método de Bradford (318) o de Peterson (319), usando albúmina sérica bovina como patrón. Las mediciones se efectúan a 595 nm en un Coleman Jr.

## II.12. MEDICION DE RADIATIVIDAD

La radiactividad se determina en un contador de centelleo líquido Beckman LS-8100 o LS-100C usando como fluido centellante 4% de Omnifluor en tolueno. Para muestras hidrosolubles se emplea una mezcla de 25% de Triton en Omnifluor y tolueno o mezcla de Bray (320).

Cuando se desea preservar el material a ser contado para ensayos posteriores se determina la radiactividad en un contador de flujo gaseoso, colocando la muestra en una cápsula de vidrio y evaporándola.

Cromatografía en papel: Se localiza las sustancias radiactivas por medio de un radiocromatógrafo Packard. En algunos casos se cortan los cromatogramas en fracciones de 0,5-1 cm y la radiactividad se determina en contador de centelleo líquido. También se realizan autorradiografías empleando placas Kodak X-Omat.

Cromatografía sobre capa delgada: Se realizan autorradiografías en placas Agfa o Kodak X-Omat, revelándolas luego de

7 a 30 días. Se revela según las recomendaciones de los respectivos fabricantes. En algunos casos se raspó el soporte (Sílica) en fracciones de 0,5-1 cm, determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

Electroforesis: Se corta los geles radiomarcados. Cada fracción se disuelve en 200  $\mu$ l de NCS Solubilizer, incubándose 30 min a 37 °C. Se neutraliza con ácido acético glacial y se determina la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

### III. RESULTADOS

#### III.A. ESTUDIOS SOBRE TUMORES MAMARIOS HUMANOS

##### III.A.1. BIOSINTESIS DE POLIPRENIL AZUCARES EN CORTES DE TEJIDO MAMARIO

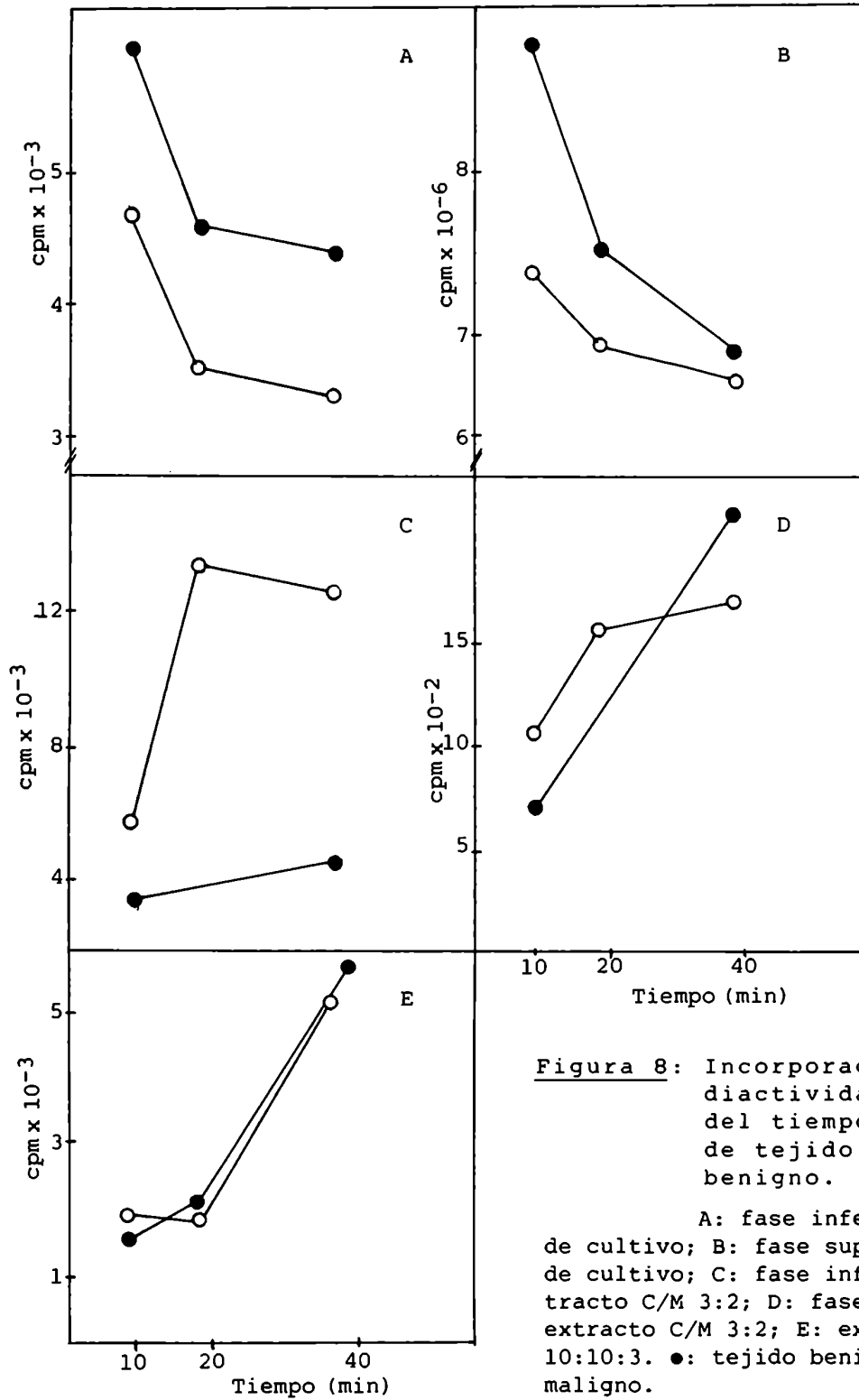
La marcación en cultivo de tejidos se utilizó como una aproximación al estudio de la biosíntesis in vivo de poliprenil azúcares.

Los primeros ensayos realizados en el presente trabajo de Tesis consistieron en la incubación de cortes de tumores mamarios con  $^{14}\text{C}$ -GlcN, de acuerdo a lo descrito en II.2.A.1.

Se realizaron seis incubaciones en paralelo, 3 con cortes de tumores malignos y 3 con benignos, fijándose para cada tipo de tumor tres tiempos de incubación: 10, 20 y 40 min. Al término de la misma se procesó los incubados según II.2.A.4.

Se determinó la radiactividad presente en alícuotas de las diferentes fracciones. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 8.

Se observa que la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GlcN al tejido se incrementa en función del tiempo. Esto está dado por una caída en la radiactividad presente en el medio de cultivo (Paneles A y B) y un aumento de la misma en la fase inferior (Panel C) y superior (Panel D) de la partición de Folch del extracto inicial C/M 3:2. La incorporación al extracto C/M/A 10:10:3 (Panel E) también se eleva con el transcurso del



**Figura 8:** Incorporación de radiactividad en función del tiempo en cortes de tejido maligno y benigno.

A: fase inferior del medio de cultivo; B: fase superior del medio de cultivo; C: fase inferior del extracto C/M 3:2; D: fase superior del extracto C/M 3:2; E: extracto C/M/A 10:10:3. ●: tejido benigno; ○: tejido maligno.

tiempo. Se obtuvo mayor transferencia de radiactividad en el tejido maligno que en el benigno.

Se realizó un segundo experimento en el que se incubaron cortes de un tumor maligno y de tejido peritumoral de la misma paciente considerado como normal. En cada caso se incubaron 400 mg de tejido durante 10 min a 34 °C. Se procedió en forma similar a la descrita. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Fracción	cpm	
	Normal	Tumoral
Fase inferior medio de cultivo	4.417	4.217
Fase superior medio de cultivo	6.316.077	6.466.126
Fase inferior extracto C/M 3:2	3.269	6.442
Fase superior extracto C/M 3:2	1.671.270	2.280.554
Lavado fase superior teórica	245.478	426.212
Lavados con metanol	17.186	20.507
Extracto C/M/A 10:10:3	53.444	58.667

TABLA 2: Incorporación de radiactividad a las diferentes fracciones en tejido normal y tumoral.

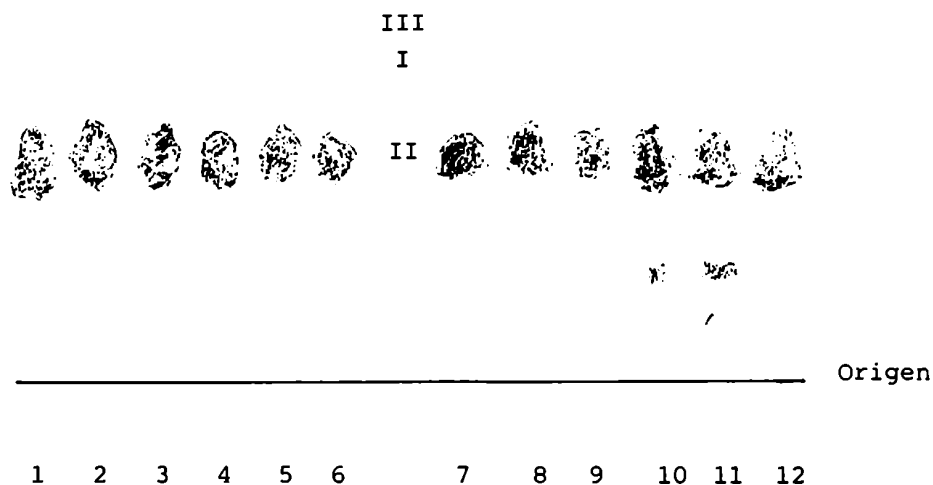
Se incuban cortes de tejido según II.2.A.1. Se determina la radiactividad en las fracciones detalladas en II.2.A.4.

Puede observarse que nuevamente el tejido maligno demostró ser más activo.

#### Análisis cromatográfico de las sustancias radiomarcadas

Se realizó una cromatografía sobre papel (ver II.9.1.) de las fases superiores de la partición del medio de cultivo y del extracto C/M 3:2. Se cromatografió en forma ascendente en solvente D efectuándose una autorradiografía cuyo esquema

se muestra en la Figura 9.



**FIGURA 9:** Cromatografía sobre papel de la fase superior del medio de cultivo y del extracto C/M 3:2

Se realizó una cromatografía ascendente en solvente D durante 44 h. Carriles: pares: tumor maligno; impares: benigno; 1 a 6: medio de cultivo; 7 a 12: extracto C/M 3:2; 1, 2, 7, 8: 10 min; 3, 4, 9, 10: 20 min; 5, 6, 11, 12: 40 min. Se muestra la posición de migración de patrones de Glc (I), GlcN (II) y GlcNAc (III).

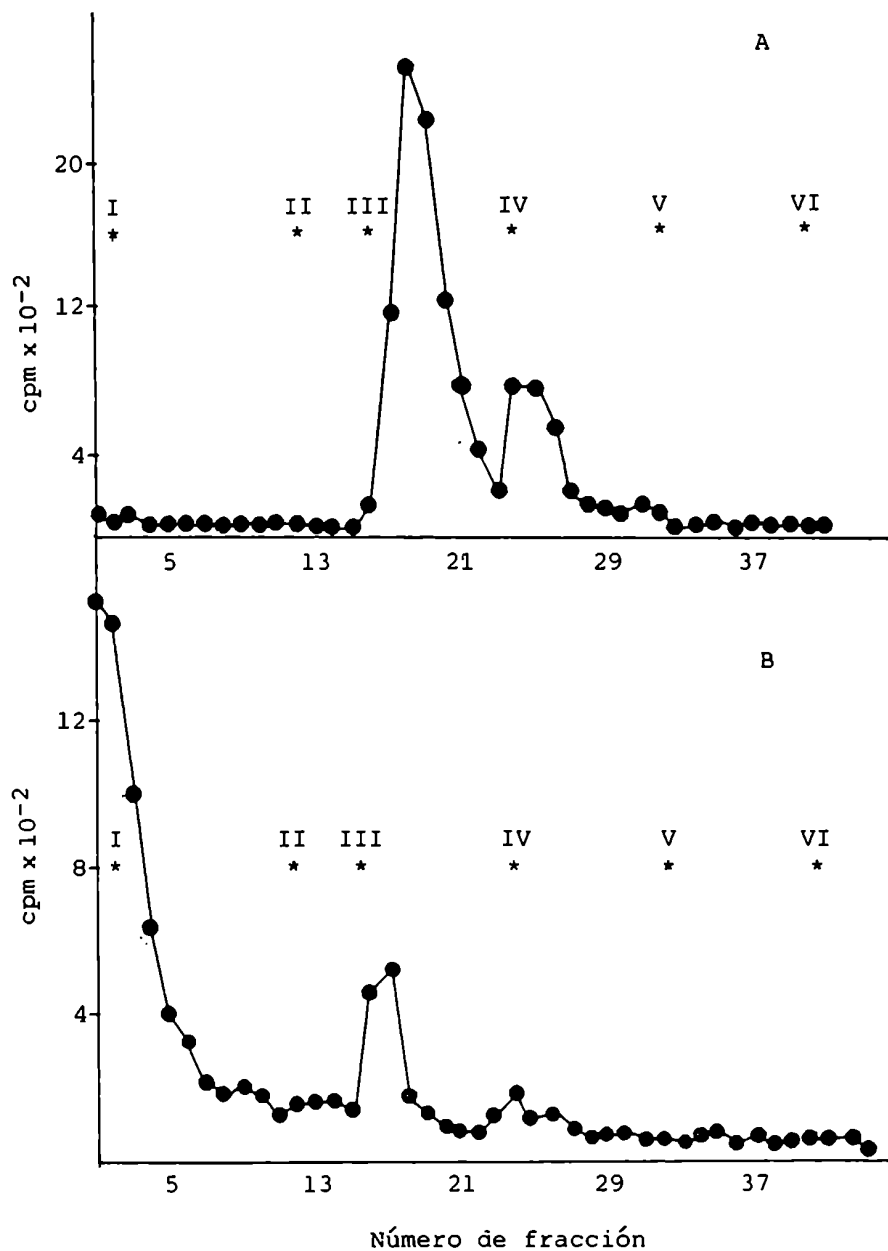
En la fase superior del medio de cultivo casi la totalidad de la radiactividad corresponde a GlcN, azúcar con que se incubó el tejido. En la fase superior del extracto cloroformo

metanólico se observa la conversión de parte de la GlcN a compuestos de mayor y menor movilidad cromatográfica. En tejido maligno se evidencia un compuesto de  $R_{Glc} = 1,35$  (similar a GlcNAc) que no aparece en el tejido benigno. El compuesto de  $R_{Glc} = 0,4$  está en mayor proporción en tejido maligno que en benigno, especialmente en los períodos de incubación más cor-tos.

Se llevó a cabo una cromatografía sobre DEAE-celulosa (II.9.3.) de la fase inferior proveniente de tejido maligno. Simultáneamente se realizó una cromatografía de un patrón de Dol-P-Man y Dol-PP-GlcNAc marcado con  $^{14}C$ -Glc, proporcionado por el Dr. L. Quesada. En la Figura 10 se aprecian los cromatogramas obtenidos. La mayor parte del material eluye en las primeras fracciones pero se observan dos picos de radiactividad que acompañan el perfil obtenido con el patrón. El material eluido con C/M/A 10:10:3 representa un 15 % del total y el eluido con formiato de amonio 4 mM en el mismo solvente, un 4 %. Podría tratarse de poliprenil mono y pirofosfatos respectivamente.

Se reunieron los extractos C/M/A 10:10:3 provenientes del segundo experimento y se realizaron cromatografías sobre papel utilizando diferentes solventes. En la Figura 11 se muestran los cromatogramas correspondientes. La conducta cromatográfica del compuesto en estudio es la esperada para un poliprenil-PP-oligosacárido.





**FIGURA 10:** Cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa de la fase inferior de tumores malignos.

Solventes de elución: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: 5 mM formiato de amonio (FA) en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.

Panel A: patrón de Dol-P-Man y Dol-PP-GlcNac<sub>2</sub> de hígado de rata marcado con <sup>14</sup>C-Glc. Panel B: fase inferior proveniente de incubaciones de tumor maligno con <sup>14</sup>C-Glc.

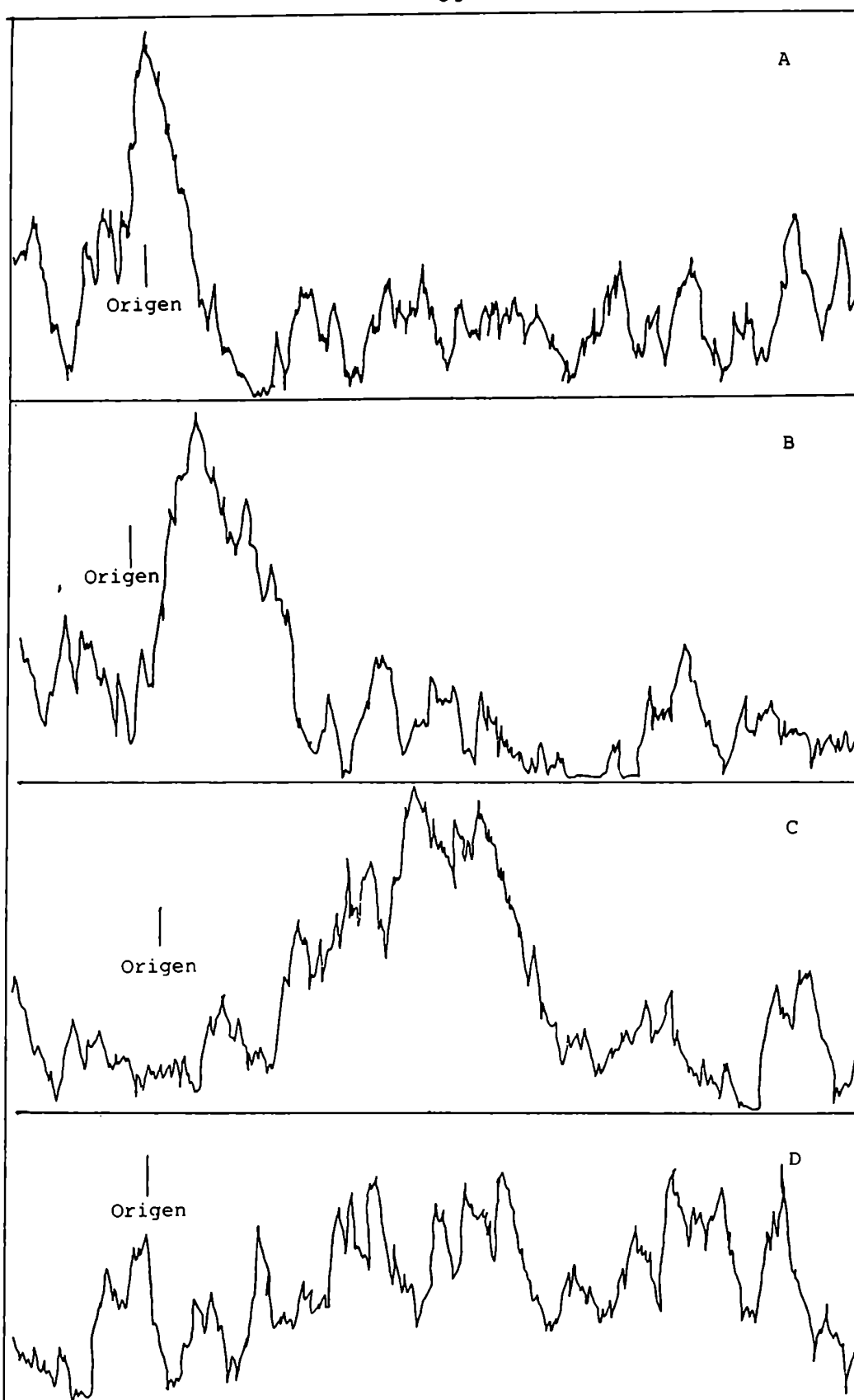


FIGURA 11: Cromatografía sobre papel del extracto C/M/A 10:10:3.

A: cloroformo; B: C/M 3:2; C: C/M/A 10:10:3; D: agua.

A pesar de que los resultados obtenidos son alentadores con respecto a la participación de lípidos intermediarios en la glicosilación de proteínas en cortes de tejido mamario, dadas las dificultades metodológicas se decidió continuar los estudios en sistemas libres de células.

III.A.2. GLICOSILACION DE PROTEINAS A TRAVES DE POLIPRENIL-AZUCARES EN SISTEMAS LIBRES DE CELULAS

Se utiliza como fuente enzimática fracciones microsomales provenientes de tejido mamario humano preparadas según II.2.A.2.a. Se determinó en cada caso la concentración de proteínas microsomales (ver II.11.a.). En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Microsomos	Material de origen		Concentración proteica (mg/ml)
Benignos 1	1 tumor	28,6 g	20,0
Benignos 2	1 tumor	15,3 g	13,3
Malignos 1	4 tumores	13,3 g	55,0
Malignos 2	5 tumores	12,5 g	35,0
Malignos 3	3 tumores	10,9 g	17,5

TABLA 3: Origen y concentración proteica de los microsomas utilizados.

III.A.2.1. TRANSFERENCIA DE <sup>14</sup>C-MAN DESDE GDP-<sup>14</sup>C-MAN A POLIPRENIL FOSFATO AZUCARES

Quando se incubaron fraccio-

nes microsomales procedentes de tumores mamarios humanos con GDP-<sup>14</sup>C-Man se evidenció incorporación de radiactividad a la fase inferior de la partición de Folch, al extracto C/M/A 10:10:3 y a la fracción insoluble en TCA caliente. Dicha incorporación aumenta francamente al suplementar el sistema con Dol-P exógeno en presencia de detergente.

III.A.2.1.1. CARACTERIZACION  
DE LOS PRODUCTOS  
RADIOMARCADOS

Se emprendió la caracterización de los productos radiomarcados obtenidos en las distintas fracciones provenientes del procesamiento de los incubados descrito en II.2.A.4.

III.A.2.1.1.a.  
Fase inferior de  
la partición de  
Folch

Tratamiento ácido:

Se sometió el material al tratamiento descrito en II.7. Se determinó la radiactividad presente en la fase inferior luego de la hidrólisis. En la Tabla 4 se aprecia que los materiales presentes en la fase inferior fueron sumamente sensibles a la hidrólisis a pH 2, propiedad característica de los poliprenil fosfato azúcares (321-324).

cpm en Fases inferiores			
Tiempo (min)	Antes de hidrólisis	Después de hidrólisis	% de hidrólisis
1	42.768	988	97,7
3	44.928	1.030	97,7
5	41.880	973	97,7
10	43.056	927	97,8
30	45.912	1.035	97,8

TABLA 4: Tratamiento ácido del material proveniente de la fase inferior.

El material hidrolizado corresponde a las fases inferiores del experimento descrito en la Figura 15.

Tratamiento fenólico:

Se sometió al tratamiento fenólico (ver II.8.) a las fases inferiores en estudio, a Dol-P-Man de hígado de rata (preparado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar") y a undecaprenol-P-Gal de Acetobacter xylinium (donado por la Dra. N. Iñón) y se determinó la radiactividad presente en las fases acuosa y fenólica. Este tratamiento rompe la unión entre el fosfato y el lípido en los derivados de alcoholes alílicos (305).

Como se muestra en la Tabla 5 el azúcar radiactivo se liberó del undecaprenol-P-<sup>14</sup>C-Gal tratado con fenol caliente, mientras que tanto el manolípido de mama como el Dol-P-<sup>14</sup>C-Man de hígado resistieron al tratamiento. Este resultado es indicativo de que el lípido de mama es un poliprenól  $\alpha$ -saturado (305,325,326).

Glicolípido	% de radiactividad	
	Capa acuosa	Capa fenólica
En estudio	6,0	94,0
Dol-P-Man	11,3	88,7
Und-P-Gal	43,0	56,9

TABLA 5: Distribución de la radiactividad luego del tratamiento fenólico.

El material analizado proviene del experimento descrito en la Figura 8. Se utilizan como patrones Dol-P-<sup>14</sup>C-Man de hígado de rata y undecaprenol-P-<sup>14</sup>C-Gal de Acetobacter xylinium.

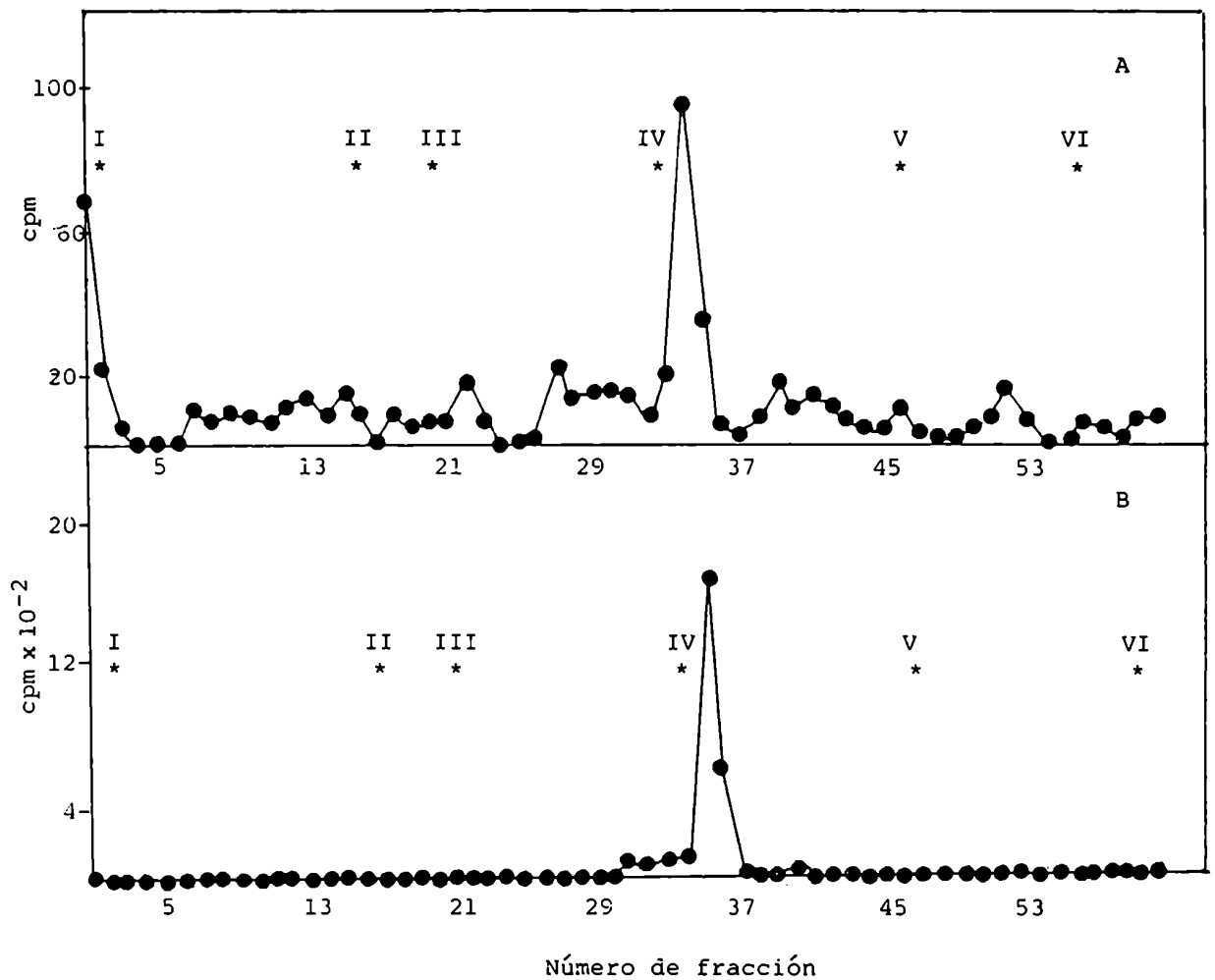
#### Cromatografía de intercambio iónico:

Las fases inferiores provenientes de incubaciones de tumores malignos y benignos con GDP-<sup>14</sup>C-Man se cromatografiaron en columnas de DEAE-celulosa (ver II.9.3.). Se corrieron dos columnas idénticas, una para tejido maligno y otra para benigno, en forma paralela.

En la Figura 11 puede apreciarse que el manofosfolípido fue retenido por la columna y que eluyó de la misma a una concentración salina de 5 mM cuando se aplicó un gradiente de formiato de amonio en C/M/A 10:10:3 a la columna. La conducta es la esperada para un poliprenil monofosfato azúcar (294).

#### Cromatografía sobre capa delgada:

Se reunieron las fracciones 34 y 35 del tejido benigno y 35 y 36 del tejido maligno de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 11 y se evaporaron bajo nitrógeno. Se realizó una partición de Folch (ver II.2.A.4.) para eliminar el



**FIGURA 11:** Cromatografía en DEAE-celulosa del manolípido presente en la fase inferior.

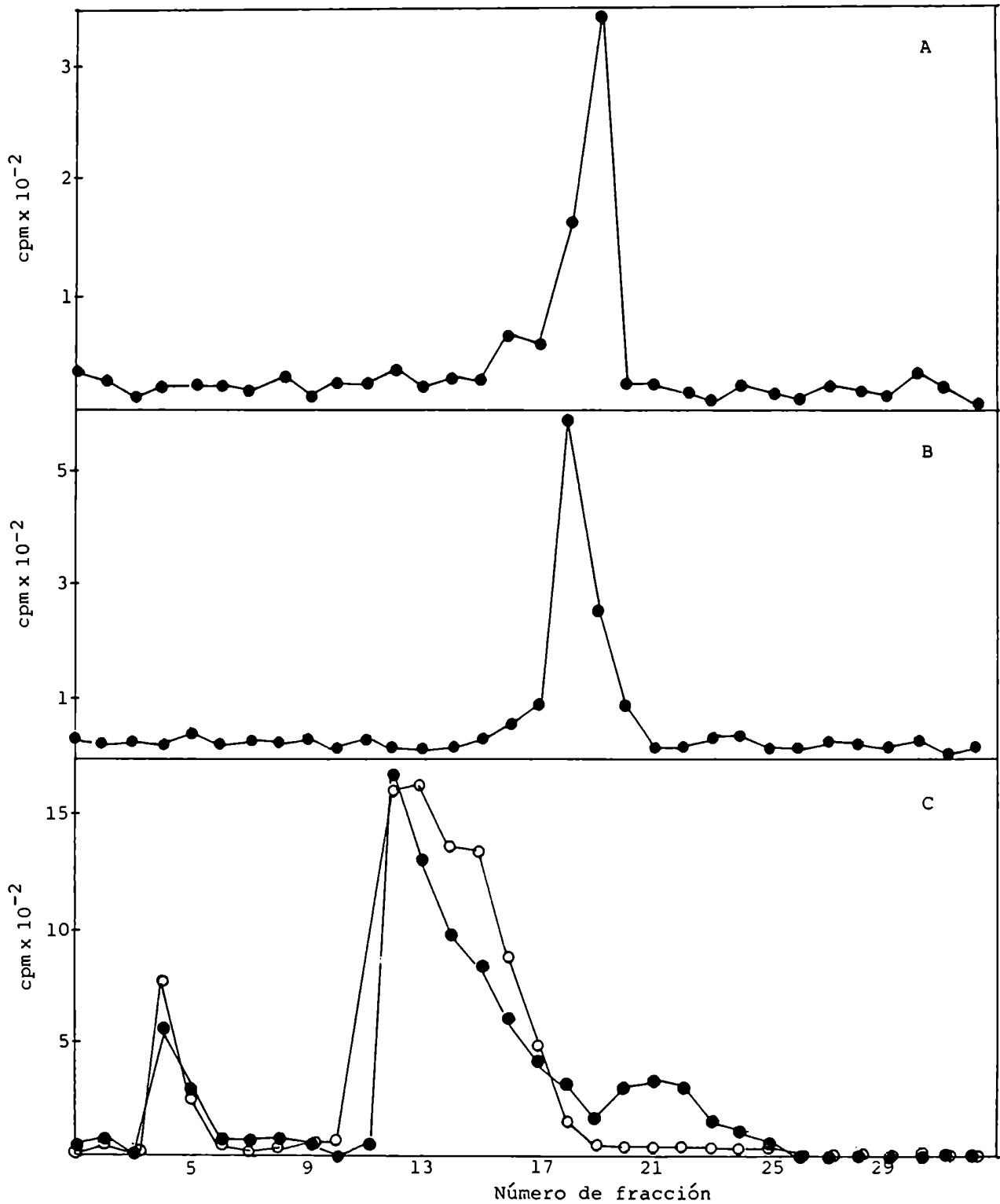
Se cromatografiaron las fases inferiores del experimento descrito en la Figura 8. Panel A: tejido benigno; B: maligno. Los pasos de elución fueron: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.

formiato de amonio presente en el solvente de elución. La fase superior de la partición se elimina y la fase inferior se evapora bajo nitrógeno. Se disuelve los extractos en aproximadamente 10  $\mu$ l de C/M 3:2 y se siembran en una placa de Sílica gel. En el mismo canal en que se sembró el material maligno se depositó un patrón de Dol-P-<sup>3</sup>H-Glc de hígado de rata proporcionado por el Dr. L. Quesada. Se realiza la cromatografía como se describe en II.9.2. con solvente G.

Terminada la corrida cromatográfica y ya seca la placa se raspó la misma recogándose fracciones de 0,5 cm cuya radiactividad se determinó en contador de centelleo líquido. La muestra que contenía dos isótopos se contó en un canal para <sup>3</sup>H y otro para <sup>14</sup>C.

En la Figura 12, paneles A y B se comprueba que el material benigno tuvo igual comportamiento cromatográfico que el patrón de Dol-P-Man de hígado. En el panel C puede verse que el material maligno presenta un cromatograma similar al del patrón de Dol-P-Glc de hígado de rata. El primer pico que aparece en ambos canales puede deberse a rupturas del material provocadas por el calentamiento de la placa al secarla con aire caliente en el momento de ser sembrada. El material sembrado era muy rico en lípidos y el depositarlo en la placa produjo una mancha de aspecto seroso. Tal vez ese sea el motivo por el cual tanto el material maligno como el patrón mostraron menor movilidad cromatográfica que el material benigno y el





**FIGURA 12:** Cromatografía sobre capa delgada de los manolípidos cargados.

Se cromatografió en solvente G el material retenido por la columna de DEAE-celulosa de la Figura 11.

Paneles: A: Dol-P-14C-Man de hígado; B: tejido benigno; C: tejido maligno (o) canal para <sup>14</sup>C y h-Dol-P-<sup>3</sup>H-Glc (●) canal para <sup>3</sup>H.

h-Dol-P-Man depositados en los otros canales, en los cuales no hubo inconvenientes en el momento de la siembra.

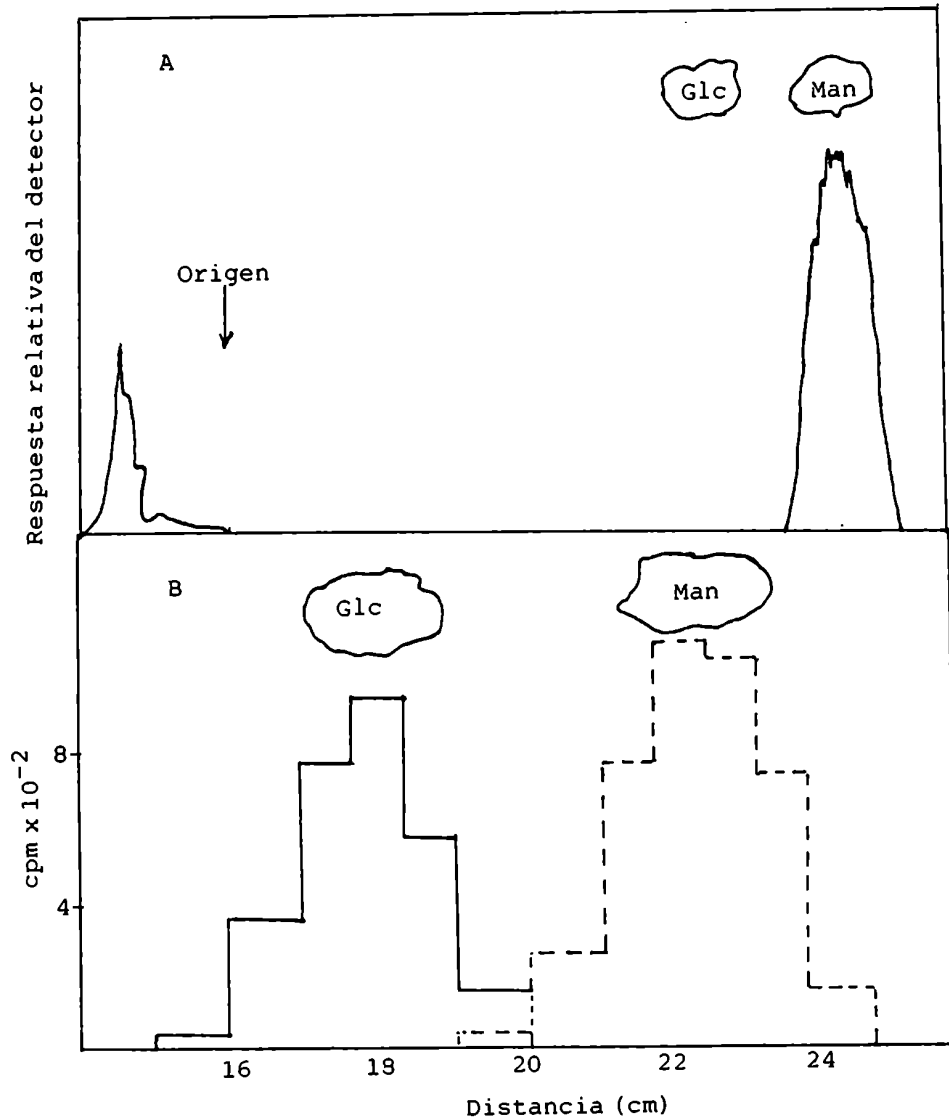
Con material maligno procedente de las fases inferiores del experimento descrito en la Figura 8 se realizó otra cromatografía sobre capa delgada. En la Figura 30 podemos comprobar que el material en estudio migró con igual  $R_{Man}$  (1,48) que el patrón de Dol-P-Man.

Cromatografía sobre papel:

a) Se realizó la hidrólisis a pH 2 (ver II.7.) del manolípido cargado eluido de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 11, al que se añadió un patrón de Dol-P- $^3\text{H}$ -Glc de hígado. Con la fase hidrosoluble de dicha hidrólisis se efectuó una cromatografía sobre papel (según II.9.1.) para identificar los azúcares liberados. En el mismo lugar que la muestra se sembraron Glc y Man como patrones internos. Estos se revelaron según lo descrito (II.9.1.)

La tira de papel se analizó primero con un radiocromatógrafo y luego se cortó la misma en trozos de 1 cm (en la región donde previamente se habían detectado los azúcares) y se determinó la radiactividad en sendos canales para  $^{14}\text{C}$  y  $^3\text{H}$  (ver II.12.).

En la Figura 13, A se observa un pico de radiactividad coincidente con la distancia recorrida por el patrón de Man. En las condiciones en que se realizó el radiocromatograma la radiactividad debida al  $^3\text{H}$  no es detectada por el aparato.



**FIGURA 13:** Cromatografía sobre papel de los azúcares liberados del manolípidos por hidrólisis ácida.

Las fases superiores de la hidrólisis del material eluido de la columna de la Figura 11 se cromatografiaron sobre papel en forma descendente en solvente D. Se muestra la posición de migración de patrones de Glc y Man.

Paneles: A: análisis por radiocromatógrafo; B: análisis por contador de centelleo líquido, canal para <sup>3</sup>H (---), canal para <sup>14</sup>C (—).

Se cromatografió durante 63 horas.

En la Figura 13, B, en cambio, puede verse un pico correspondiente a la  $^3\text{H}$ -Glc liberada del patrón y otro proveniente de la  $^{14}\text{C}$ -Man hidrolizada del lípido-azúcar de mama.

b) Se realizó una cromatografía sobre papel de los azúcares liberados por tratamiento ácido de las fases inferiores procedentes de la curva de tiempo descrita en la Figura 26, B. Se sembró Man como patrón interno.

En la Figura 14 se observa que además del pico principal correspondiente a Man, se detectan otros menores cuya distribución varía en función del tiempo.

Considerando los siguientes  $R_{\text{Man}}$ : 0,08; 0,12; 0,16; 0,22; 0,29; 0,40; 0,74 y 0,85 se calculó el área de los picos correspondientes en función del tiempo.

En la Figura 15 podemos ver que a medida que transcurre el tiempo hay un aumento de la radiactividad presente en los compuestos de menor movilidad (mayor número de unidades sacarídicas) y una disminución concomitante de los de mayor movilidad (menor número de unidades sacarídicas). Esto sugiere el consumo de las unidades de menor número de azúcares tendiente a elongar el oligosacárido. Podría estarse en presencia de una familia de lípido-oligosacáridos que se fueron sintetizando a partir del miembro de menor tamaño por medio de la adición sucesiva de Man. A similares conclusiones han arribado otros autores (313).

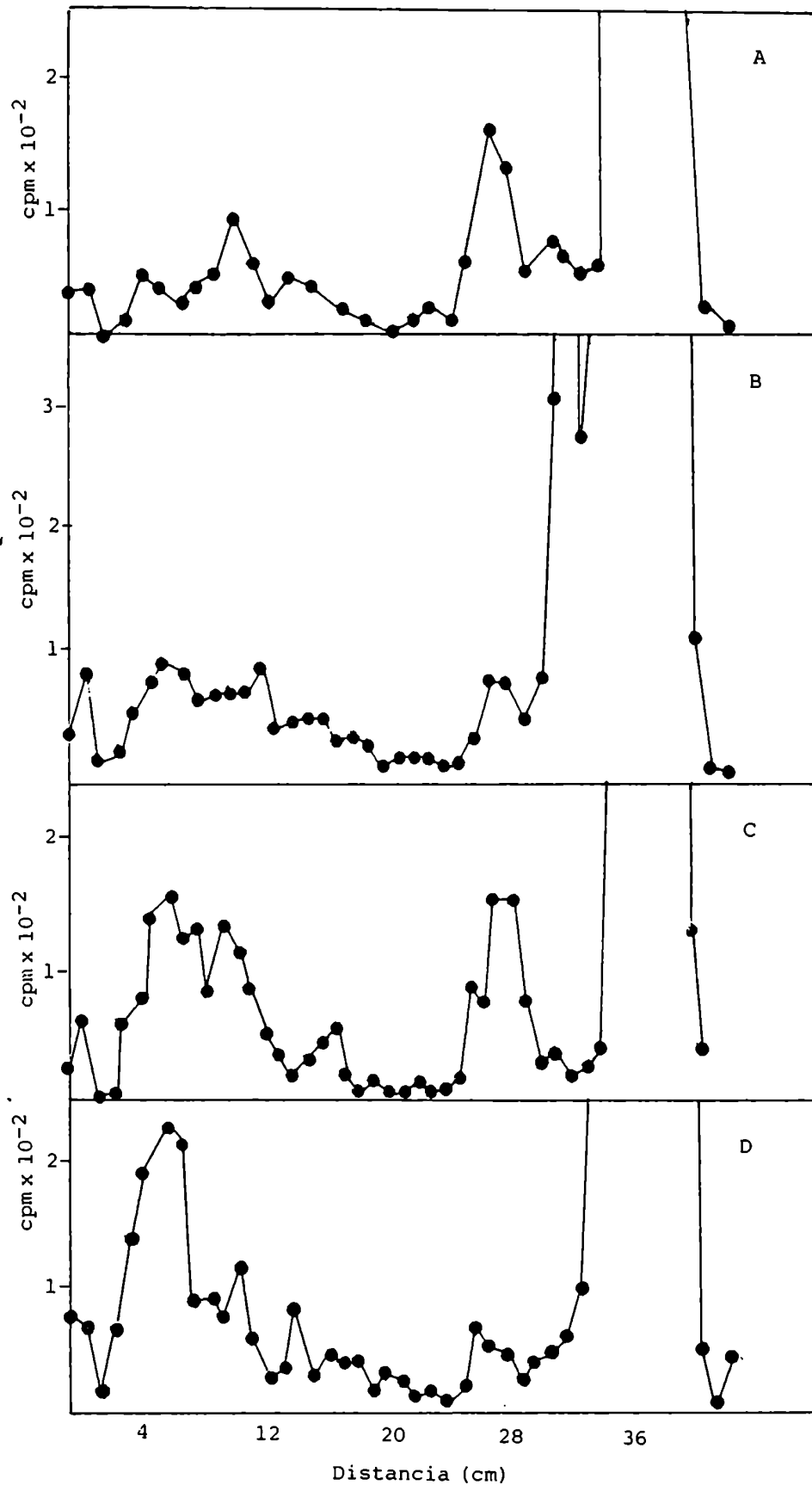


FIGURA 14: Cromatograma sobre papel del material liberado de la fase inferior en función del tiempo.

Se incubaron microsomas malignos según lo descrito en la Figura 26, B con GDP-<sup>14</sup>C-Man durante 1 (A), 5 (B), 20 (C) o 40 min (D). Se sometió el material a hidrólisis ácida y los productos hidrosolubles se cromatografiaron en solvente B en forma descendente. Los cromatogramas se cortaron en trozos de 1 cm cuya radiactividad se determinó en contador de centelleo líquido. En los 4 cromatogramas el pico de mayor radiactividad coincidió con los patrones de Man.

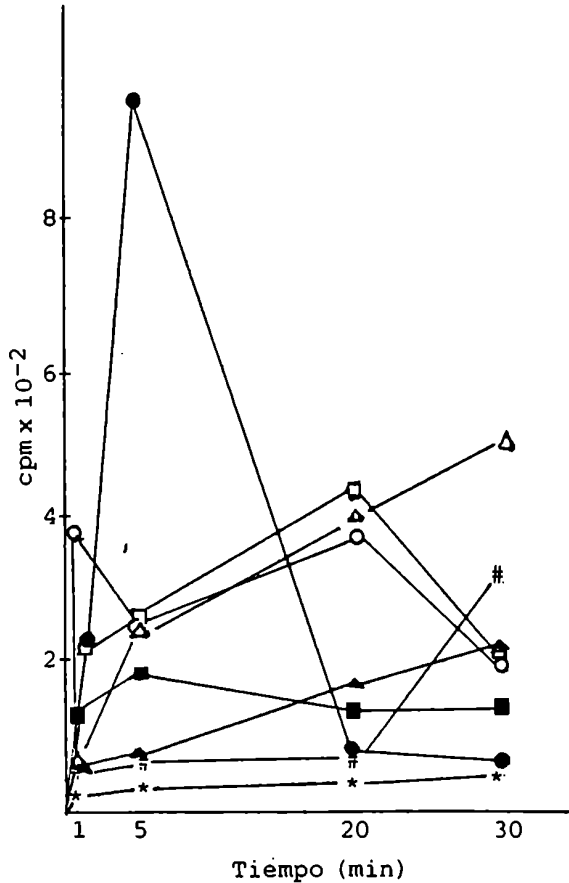


FIGURA 15: Síntesis de lípido-oligosacáridos en función del tiempo.

Se determinó la radiactividad de los picos evidenciados en la Figura 14 definidos por los siguientes

$R_{Man}$ : 0,85 (●); 0,74 (○); 0,40 (■); 0,29 (□); 0,22 (△); 0,16 (▲); 0,12 (#); 0,08 (\*) y se graficó la misma en función del tiempo.

III.A.2.1.1.b.

Extracto C/M/A

10:10:3

Tratamiento ácido:

Se sometió el material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 al tratamiento descrito en II.7.

Luego de la hidrólisis a pH 2 más del 90 % de la radiactividad se hizo hidrosoluble. Esta conducta es compatible con la de un poliprenil-PP-sacárido que frente al tratamiento áci

do suave cliva el enlace entre el fosfato proximal al azúcar y éste.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se evaporaron bajo flujo de nitrógeno los extractos C/M/A 10:10:3 reunidos del experimento descrito en la Figura 24.

Se redisuelven en 20  $\mu$ l de C/M/A 10:10:3 y se cromatografían en columnas de DEAE-celulosa como se ha explicado en II.9.3.

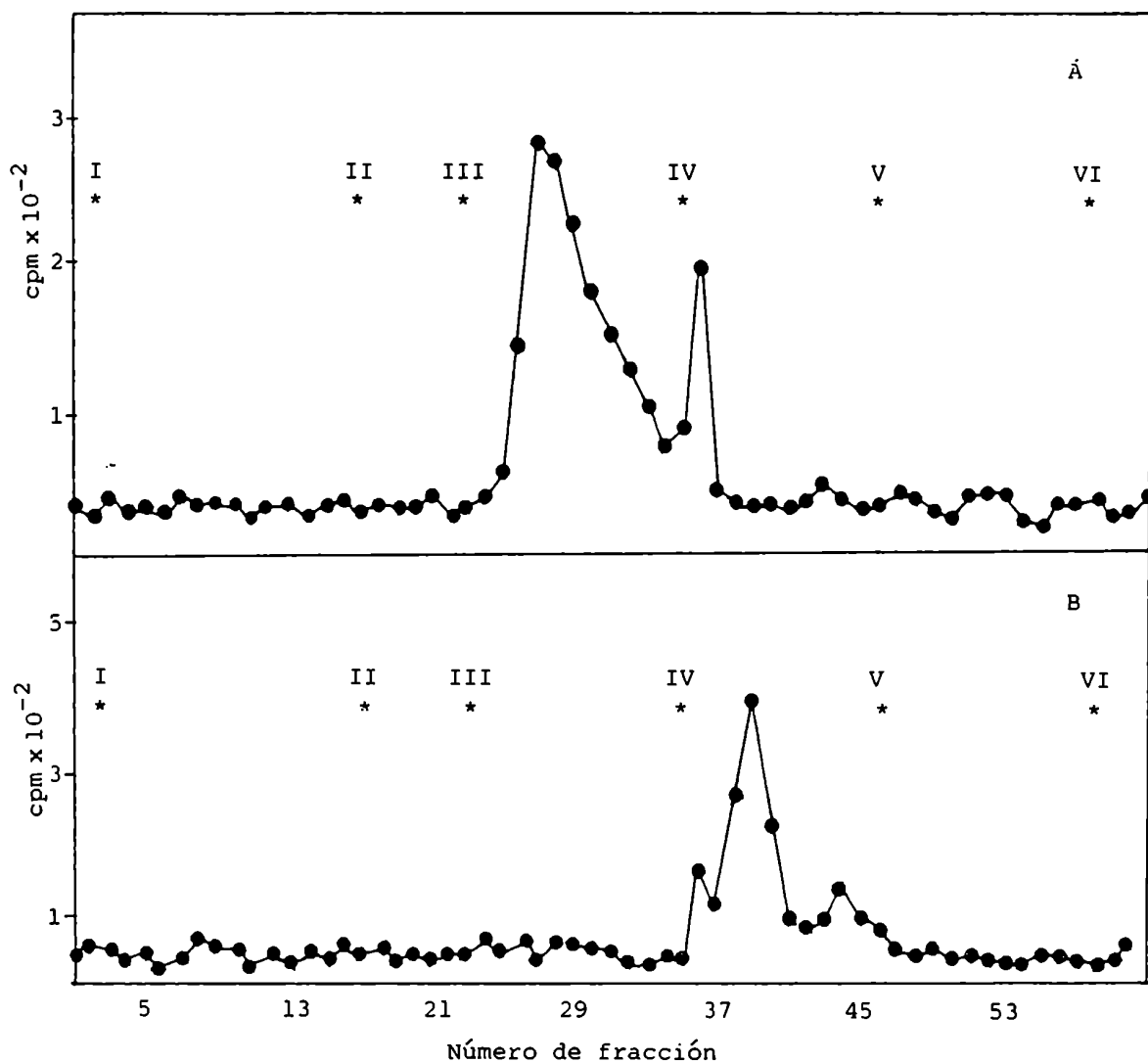
Simultáneamente se realiza una cromatografía en idénticas condiciones de un patrón de Dol-P-<sup>14</sup>C-Man de hígado de rata proporcionado por el Dr. L. Quesada.

Analizando la Figura 16 se comprueba que ambos materiales fueron retenidos por la columna, pero mientras que el Dol-P-<sup>14</sup>C-Man (Panel A) eluyó con el solvente C/M/A 10:10:3 (probablemente debido a la presencia de sales residuales (313)) el lípido de mama (Panel B) precisó una concentración de formiato de amonio 5 mM en el mismo solvente para ser despegado de la columna. Esta mayor polaridad del material en estudio podría indicar que estamos en presencia de un poliprenil pirofosfato derivado (294,296).

Cromatografía sobre papel:

Se realizó la hidrólisis a pH 2 del material eluido de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 16. Se secó el mismo bajo flujo de nitrógeno y se realizó una partición de Folch para eliminar las sales presentes (ver II.2.A.4).

Se cromatografiaron sobre papel los productos hidrosolubles

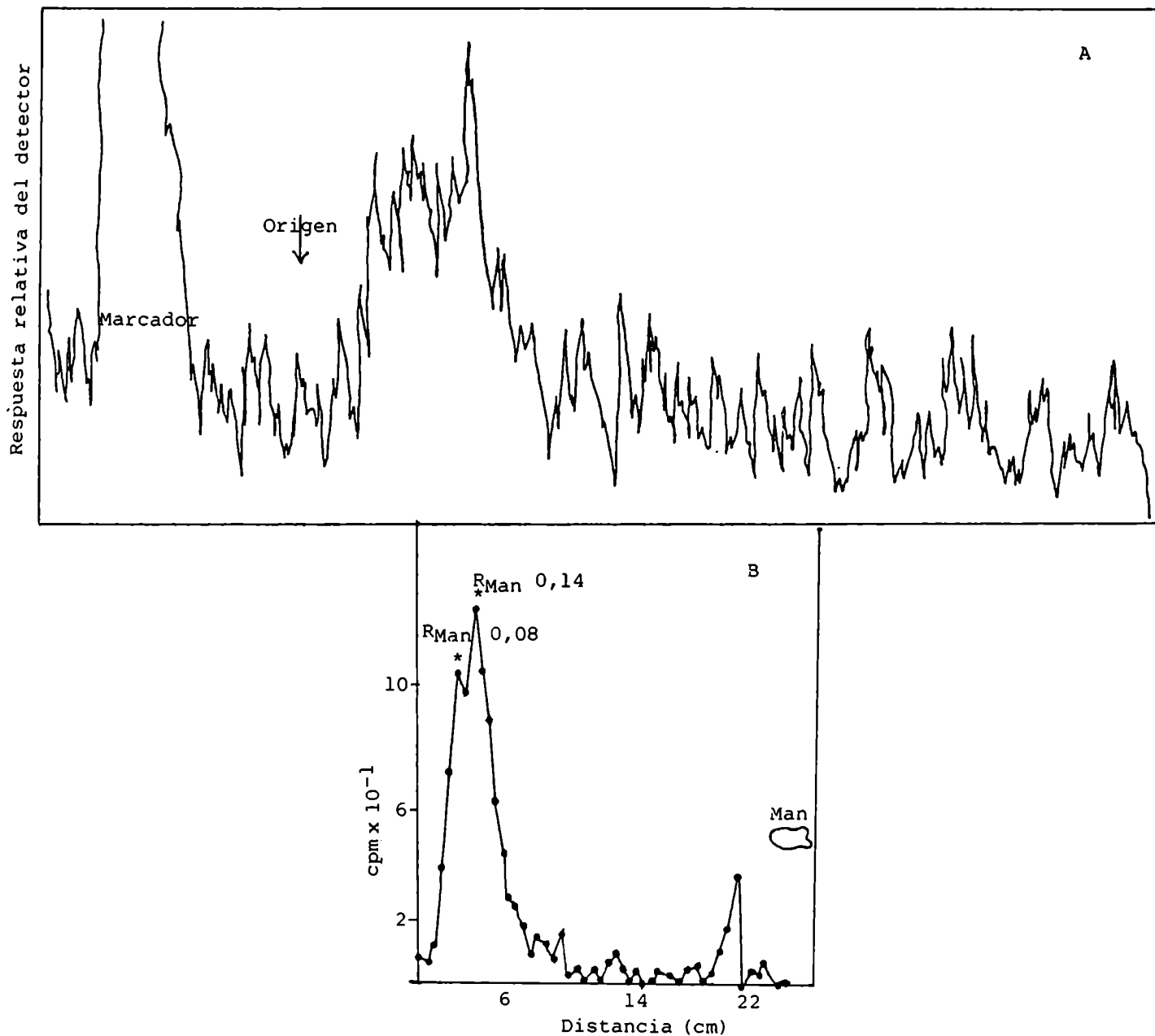


**FIGURA 16:** Cromatografía de intercambio iónico del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3.

Material procedente del extracto C/M/A del experimento descrito en la Figura 24 se sembró en columna de DEAE-celulosa (Panel B). En otra columna se depositó un patrón de Dol-P-<sup>14</sup>C-Man de hígado (Panel A).

Pasos de elución: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.





**FIGURA 17:** Cromatografía sobre papel de los azúcares liberados por hidrólisis del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3.

El material purificado por columna de DEAE-celulosa (Figura 16) se sometió a hidrólisis a pH 2, cromatografiándose en papel en forma descendente los productos hidrosolubles con solvente B. Se muestra la posición de migración del patrón de Man.

Paneles: A: análisis por radiocromatógrafo; B: análisis en contador de centelleo líquido.

sembrando Man como patrón interno.

En la Figura 17,A puede comprobarse que el material radiactivo sólo se ha desplazado una pequeña distancia del origen. Este comportamiento sería consistente con el de un oligosacárido.

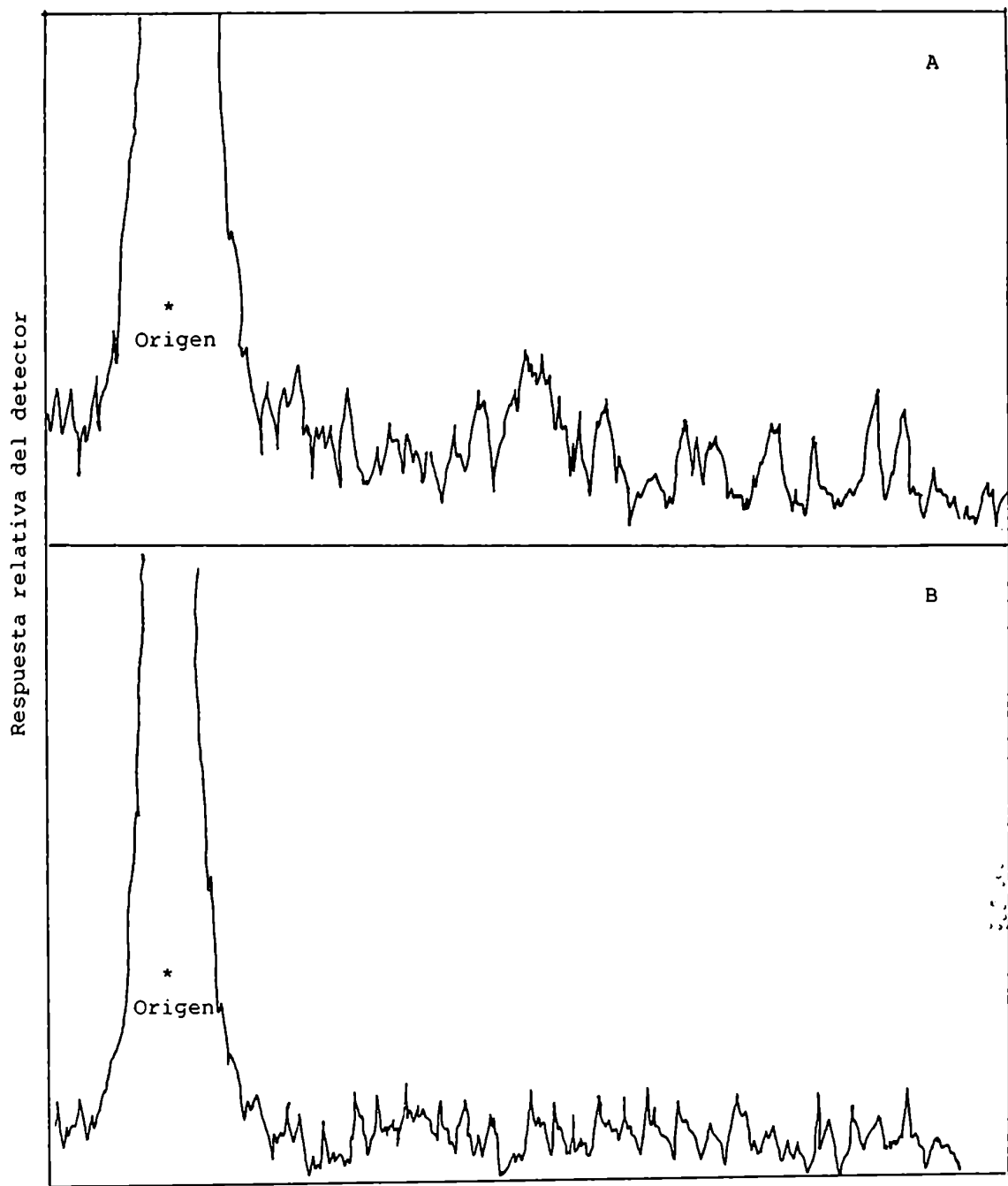
Cuando el cromatograma se cortó en fracciones de 0,5 cm cuya radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido (Panel B), se observó la presencia de dos picos de radiactividad cuyos  $R_{Man}$  son de 0,08 y 0,14 que corresponderían a oligosacáridos de 13-14 unidades de azúcares de acuerdo a los trabajos de Parodi y col. (327).

III.A.2.1.1.c.  
Fase superior de  
la partición de  
Folch

Se cromatografió sobre papel el material proveniente de la fase superior de la partición de Folch previamente evaporado y redissuelto en 10  $\mu$ l de agua. Se sembró GDP-Manosa como patrón interno.

En la Figura 18 puede verse que el material radiactivo permaneció en el origen. Al revelar el nucleótido azúcar patrón bajo luz UV se observó una mancha fluorescente en el origen. Esto indicaría que en la fase superior ha quedado el GDP-<sup>14</sup>C-Man utilizado en la incubación como único producto.

Cuando se efectuó idéntico procedimiento con el material



**FIGURA 18:** Cromatografía sobre papel de la fase superior de la partición de Folch.

Material proveniente de las fases superiores del experimento descrito en la Figura 23 se cromatografió sobre papel en forma descendente con solvente D durante 63 h. Se determinó la radiactividad con un radiocromatógrafo.

Paneles: A: material benigno; B: material maligno.

presente en los lavados con fase superior teórica de la proteína deslipidificada (ver II.2.A.4.), se obtuvieron iguales resultados a los ya descritos. En consecuencia, se concluye que en dichos lavados el GDP-<sup>14</sup>C-Man empleado en la incubación permanece como tal.

III.A.2.1.2. CARACTERISTICAS  
DE LA TRANSFERENCIA DE MAN A  
LIPIDO AZUCARES  
Y GLICOPROTEINAS

Se incubaron fracciones ricas en microsomas provenientes de tumores mamarios con GDP-<sup>14</sup>C-Man de acuerdo a lo descrito en II.2.A.3.

En cada experimento se variaron las condiciones de incubación y se estudió el efecto de las mismas sobre la transferencia de radiactividad a sustancias solubles en medios orgánicos y a glicoproteínas.

III.A.2.1.2.a  
Agregado de lípidos exógenos

En la Tabla 6 puede verse que cuando se incuban microsomas procedentes de tumores benignos con GDP-<sup>14</sup>C-Man, la incorporación de radiactividad a la fase inferior de la partición

de Folch se estimula por medio del agregado de Dol-P de hígado porcino. Dicha estimulación se potencia más de 10 veces cuando el medio se suplementa con Triton X-100, detergente ahora necesario para solubilizar la incrementada cantidad de lípidos. El agregado de detergente al sistema endógeno disminuye la reacción de transferencia.

Agregado	Radiactividad incorporada a fase inferior	
	cpm/100µg proteína	Estimulación
---	120	
Triton X-100	38	0,3
Dol-P	500	4,2
Dol-P + Triton X-100	6.350	52,9

TABLA 6: Efecto del añadido de Dol-P y detergente sobre la incorporación de radiactividad a fase inferior.

Se incubaron 40 µg de microsomas benignos 1 30 min a 30°C con  $1,1 \times 10^5$  cpm de GDP-<sup>14</sup>C-Man en presencia de buffer Tris-HCl pH 7,4 y de Triton X-100 0,2%. Se estudió el efecto del agregado de 1 µg de Dol-P de hígado porcino.

En otro experimento se analizó el efecto sobre la incorporación de radiactividad a fase inferior, extracto C/M/A 10:10:3 y fracción insoluble en TCA caliente del agregado de Dol-P y detergente en incubaciones con tumores malignos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7 y son coincidentes con los evidenciados en un tercer experimento que se rere

sume en la Tabla 8.

Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación
-----	2.508		135		312	
Dol-P + Triton X-100	81.806	32,6	201	1,5	84	0,3

**TABLA 7:** Estimulación de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man a lípidos-azúcares y glicoproteínas en incubaciones con microsomas malignos.

Se incubaron 525 µg de microsomas malignos 20 min a 30°C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}\text{C}$ -Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4. Se estudió el efecto del agregado de 2,5 µg de Dol-P de hígado porcino y 0,5 % de Triton X-100.

Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación
-----	2.919		232		220	
Triton X-100	2.987	1,02	247	1,06	204	0,93
Dol-P + Triton X-100	76.608	26,25	623	2,68	86	0,39
Dol-P + EDTA + Triton X-100	6.498	0,08*	2.470	3,96*	93	1,10*

**TABLA 8:** Efecto del agregado de Dol-P, detergente y EDTA sobre las reacciones de transferencia de Man en incubaciones con microsomas malignos.

Se incubaron 525 µg de microsomas malignos 20 min a 30°C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}\text{C}$ -Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  14 mM y EDTA-Na 2 mM. Se estudió el efecto del agregado de 4 µg de Dol-P de hígado porcino y 0,5 % de Triton X-100 o de EDTA 18 mM en ausencia de  $\text{MgCl}_2$ . \*: estimulación calculada con respecto a los valores obtenidos en presencia de Dol-P + Triton X-100.

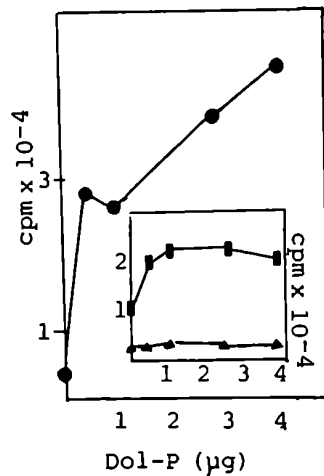
Los resultados obtenidos para la incorporación a fase inferior son claros: el detergente por sí solo no produce modificaciones en dicha incorporación pero cuando se adicionan simultáneamente Dol-P y Triton X-100 se logra una estimulación de 26 veces con respecto al sistema endógeno. Esto indicaría que uno de los factores limitantes de la reacción es la concentración de Dol-P endógeno. Cuando se añade al sistema EDTA que actúa secuestrando el  $Mg^{2+}$ , impidiendo la formación de Dol-P-Man (50,295,326), se produce una notable reducción de la incorporación del monosacárido comparando con el sistema completo.

Con respecto al extracto C/M/A 10:10:3, el agregado de Dol-P y detergente produce una estimulación de más de dos veces, pero el efecto del EDTA es contrario al obtenido en la fase inferior. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que las primeras Man que se incorporan al oligosacárido en formación provienen de la transferencia directa desde GDP-Man y sólo las últimas derivan de Dol-P-Man (328). En otros sistemas el EDTA, aunque a menores concentraciones, estimuló la síntesis de ciertos miembros de la familia de oligosacáridos (313, 329).

En cuanto a la fracción insoluble en TCA caliente, la caída de la incorporación de la radiactividad que se produce con el agregado de Dol-P y Triton X-100 puede interpretarse debido a un mayor consumo del sistema suplementado por el nu-

cleótido azúcar, dificultando la glicosilación por transferencia directa del azúcar desde el nucleótido derivado a la proteína. También podría especularse que a la concentración de detergente utilizada, la actividad de la enzima transferente del oligosacárido se viera disminuida.

En la Figura 19 puede comprobarse que la formación de lípidos manosilados presentes en la fase inferior se incrementa concomitantemente con el añadido de Dol-P exógeno, mientras que la estimulación de la síntesis de lípido-oligosacáridos llega a un plateau con 1  $\mu$ g de Dol-P. En este caso, la incorporación de  $^{14}$ C-Man a glicoproteínas no se vio afectada.



**FIGURA 19:** Efecto de la concentración de Dol-P exógeno en las reacciones de transferencia de Man.

Se incubaron 525  $\mu$ g de microsomas malignos 2, 20 min a 30  $^{\circ}$ C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}$ C-Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4 y 0,5% de Triton X-100. Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior, y en el inserto al extracto C/M/A 10:10:3 (■) y a la fracción insoluble en TCA caliente (▲).



Por último, se estudió el efecto del agregado al medio de incubación de un aceptor de hígado (mezcla de doliquil-PP-sacáridos) cedido por el Dr. L. Quesada y preparado según el método de Parodi y col. (296). En el tubo control se agregó dicho aceptor hidrolizado. En la Tabla 9 puede observarse que el agregado del aceptor aumenta la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man a las 3 fracciones estudiadas.

Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA $\emptyset$	
	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación	cpm/ mg prot.	Estimulación
Aceptor de hígado	60.360	18,8	1.975	14,2	2.879	2,2
Idem hidrolizado	3.212		139		1.315	

TABLA 9: Estimulación de las reacciones de transferencia de Man por agregado de un aceptor de hígado.

Se incuban 165  $\mu\text{g}$  de microsomas malignos 1, 20 min a 30 °C con  $2,6 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}\text{C}$ -Man en presencia de Tris-Maleato pH 7,4 y 1% de Triton X-100. Se ensaya la influencia del agregado de un aceptor de hígado (mezcla de Dol-PP-sacáridos).

III.A.2.1.2.b.  
Concentración de  
proteína enzimática

En la Figura 20 puede verse que la actividad de la enzima transferente de Man aumenta a medida que lo hace la cantidad de proteína microso-

mal agregada al medio. Si comparamos la actividad de manosil transferasa en función de la concentración de proteínas microsomales totales observamos que ésta es de 4 a 10 veces menor en tejido benigno que en maligno. En estos ensayos no es posible establecer si esta diferencia se debe a una menor actividad específica de la enzima o a una menor proporción de dicha enzima en la fracción microsomal. Como alternativa podemos citar especulativamente la presencia de factores inhibitorios en la preparación benigna no existentes en la maligna.

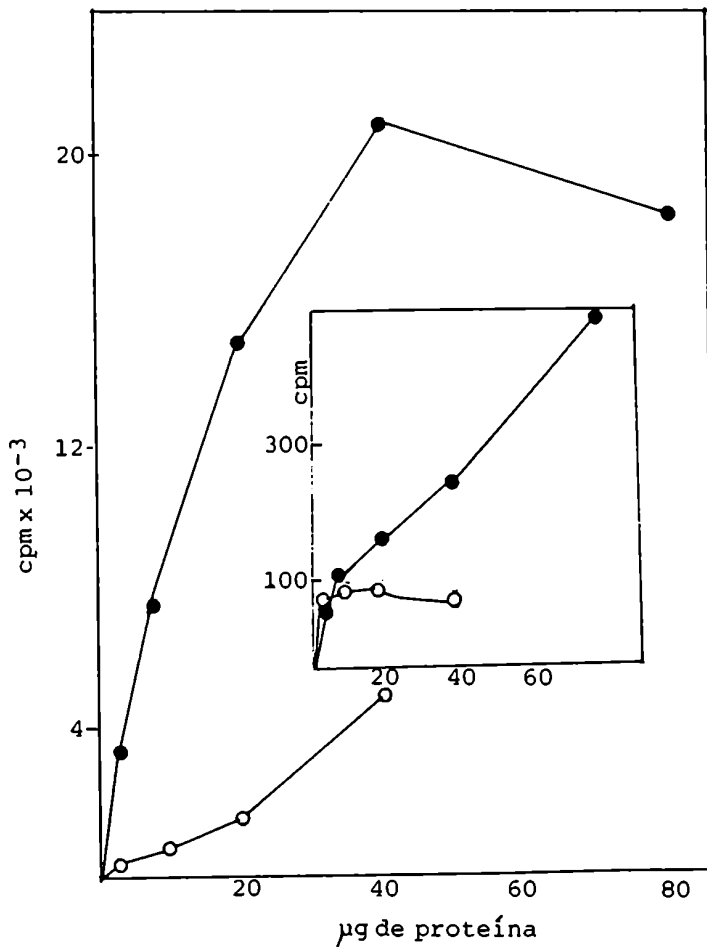
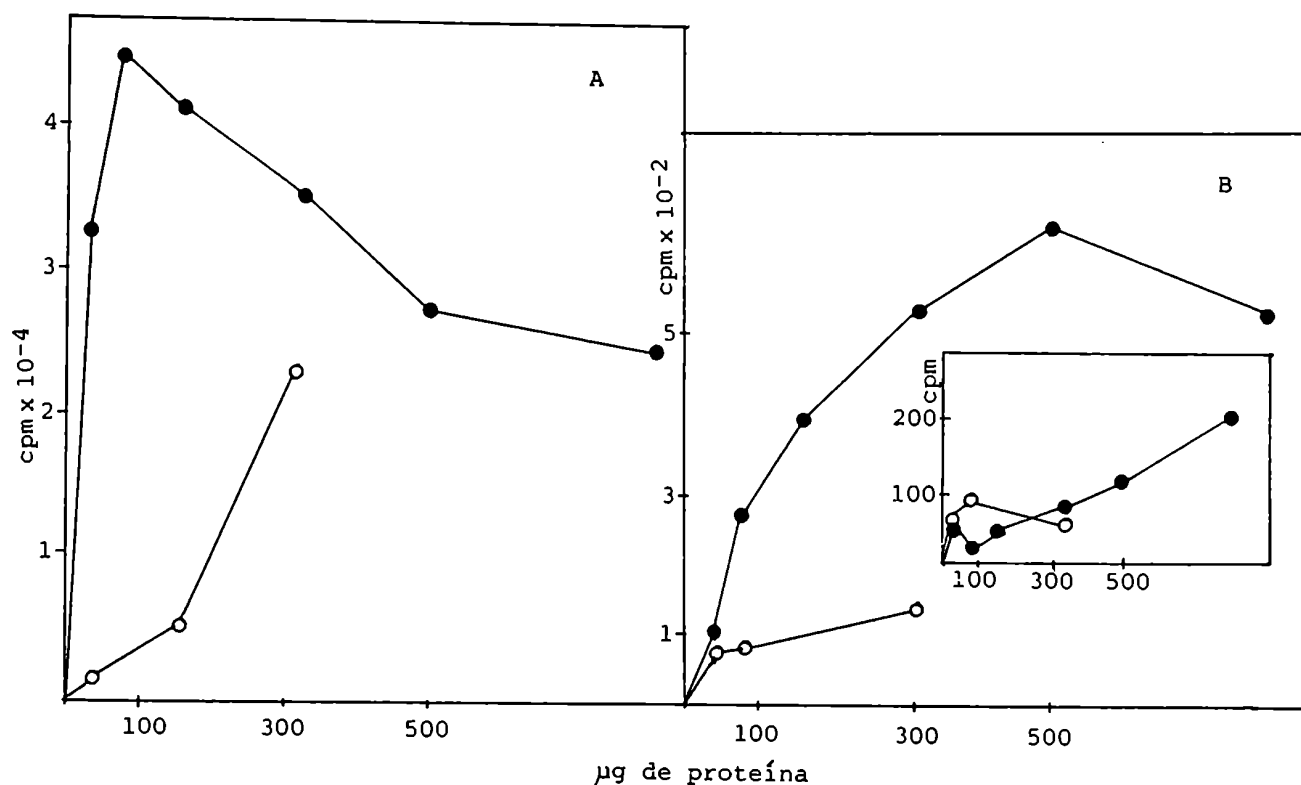


FIGURA 20: Formación de manolípidos en función de la concentración de proteína microsomal total.

Se incubaron cantidades variables de microsomas benignos (○) y malignos (●), 30 min a 30°C con  $1,3 \times 10^5$  cpm de GDP-<sup>14</sup>C-Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de Triton X-100 y 1 µg de Dol-P.

Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior y en el inserto al extracto C/M/A 10:10:3.

Se repitió el ensayo pero utilizando cantidades mayores de proteína mirosomal. En la Figura 21, A se observa que en el tejido maligno cuando la concentración de proteínas es superior a 80  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$  se produce una inhibición de la incorporación de radiactividad a la fase inferior. Es posible que al aumentar la cantidad de sustancias de carácter lipofílico presentes en dicha preparación consuman detergente, disminuyendo la formación del complejo enzima-Dol-P exógeno. Para aclarar este punto se diseñaron los experimentos descriptos en la Figura 24.



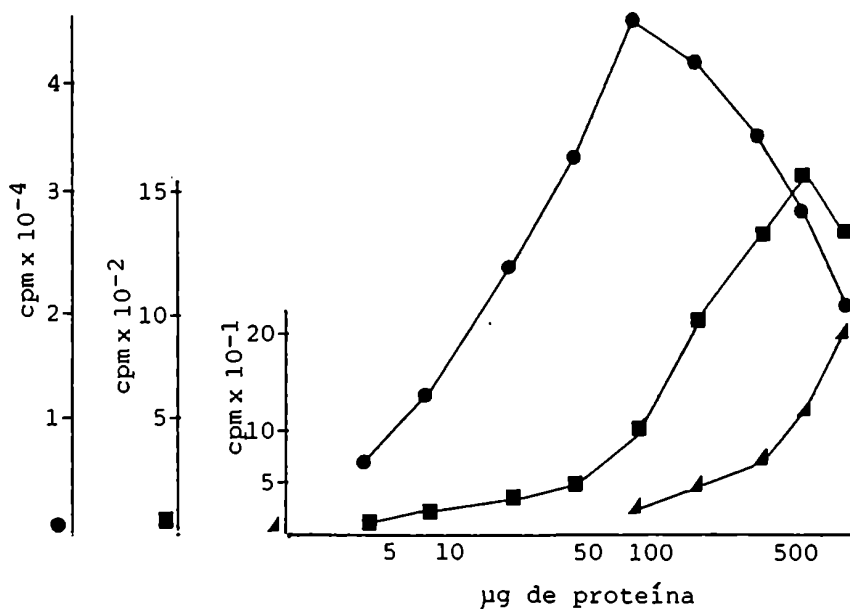
**FIGURA 21:** Efecto de concentración de proteína microsomal.

Se incubaron cantidades crecientes de proteína microsomal maligna (●) y benigna (○), 30 min a 30 °C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de  $\text{GDP-}^{14}\text{C-Man}$  en presencia de Tris-HCl pH 7,4; 0,2% de Triton X-100 y 2  $\mu\text{g}$  de Dol-P. En el Panel A se grafica radiactividad incorporada a fase inferior. En el Panel B, radiactividad incorporada al extracto C/M/A 10:10:3 y en el inserto a la fracción insoluble en TCA caliente.

Con respecto a la incorporación al extracto C/M/A 10:10:3, en ambos tejidos ésta aumenta al hacerlo la concentración de proteína (Figura 21, B). Sin embargo, para el tejido maligno se observa un máximo para 500  $\mu\text{g}$  de proteína, disminuyendo luego.

En cuanto a la transferencia de radiactividad a la fracción glicoproteica (inserto Figura 21, B), para el tejido maligno es función lineal de la concentración proteica mientras que para el benigno no pareciera observarse efecto alguno.

Se reunieron los datos obtenidos para el tejido maligno en los ensayos descritos en las Figuras 20 y 21 y se relacionó la transferencia de Man a las distintas fracciones con el logaritmo de la concentración de proteína microsomal.



**FIGURA 22:** Formación de compuestos manosilados en función del logaritmo de la concentración de proteína microsomal. Se procede según lo descrito en las Figuras 20 y 21. Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior (●), extracto C/M/A 10:10:3 (■) y fracción insoluble en TCA caliente (▲).

De la Figura 22 se desprende que la mayor incorporación de Man a fase inferior se logra con 80  $\mu$ g de proteína microsomal. La reacción es bifásica ya que una mayor cantidad de proteína induce una marcada disminución de dicha incorporación.

Al mismo tiempo, el producto de elongación de este lípido-P-monosacárido presente en el extracto C/M/A 10:10:3 se incrementa hasta 500  $\mu$ g de proteína para descender luego. Por otra parte, la manoproteína continúa aumentando junto con la concentración proteica.

Para analizar los resultados debemos considerar que concomitantemente con el incremento de la fracción microsomal ocurre un aumento simultáneo de la actividad enzimática y de los aceptores para el armado de las glicoproteínas, pero también un posible efecto de atenuación del detergente agregado.

#### III.A.2.1.2.c. Concentración de detergente

Cuando se adicionan lípidos al medio de incubación resulta necesario agregar detergentes.

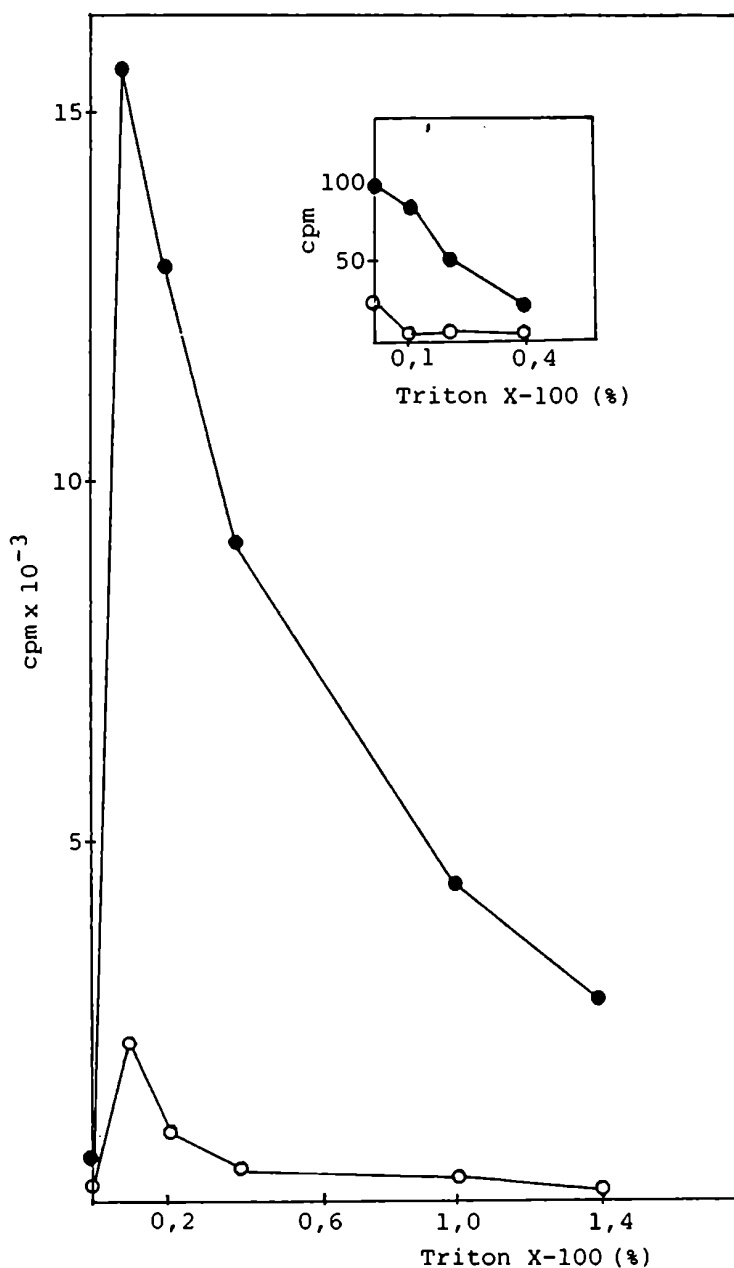
En la Figura 23 se observa el efecto de concentraciones crecientes del detergente neutro Triton X-100.

Puede comprobarse que las incorporaciones al aceptor endógeno se inhiben por la presencia de detergente (inserto). Una inhibición similar se ha descripto para enzimas de insecto

(326) y de páncreas vacuno (330).

En presencia de Dol-P exógeno, la incorporación de radiactividad a fase inferior se estimuló alrededor de 26 veces por medio del agregado de Triton X-100 0,1% en ambos tejidos.

Cantidades mayores de detergente produjeron una marcada reducción de la incorporación. Se observa que aunque la incorporación a tejido maligno es mucho mayor que a benigno, ambos tejidos presentan igual respuesta al detergente.



**FIGURA 23:** Efecto de la concentración de detergente sobre la transferencia de Man a fase inferior.

Se incubaron 40  $\mu$ g de microsomos benignos (○) o 110  $\mu$ g de microsomos malignos (●), 30 min a 30 °C con  $1,1 \times 10^5$  cpm de GDP-<sup>14</sup>C-Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4, con 1  $\mu$ g de Dol-P (figura mayor) o sin el el lípido (inserto).

III.A.2.1.2.d.  
Relación entre  
la concentración  
de proteína mi-  
croosomal y de  
detergente

Para relacionar mejor la concentración de proteína y de detergente se diseñaron los experimentos que se resumen en la Figura 24.

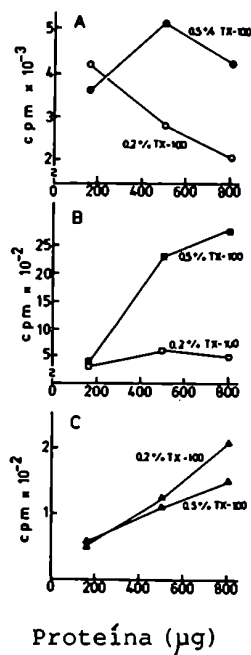


FIGURA 24: Relación entre la concentración de proteína microosomal y la de detergente en las reacciones de transferencia de Man.

Se incubaron 160, 500 u 800 µg de proteína microosomal maligna 1, 30 min a 30°C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP-<sup>14</sup>C-Man en presencia de Tris-HCl pH 7,4; 2 µg de Dol-P y 0,2 (o) o 0,5 (●) % de Triton X-100. Se grafica radioactividad incorporada a fase inferior (A); extracto C/M/A 10:10:3 (B) y fracción insoluble en TCA caliente (C).

En el Panel A se aprecia que la disminución de la radiactividad incorporada a los manolípidos presentes en la fase inferior previamente descrita, se revierte aumentando a 0,5 % el Triton X-100 añadido al medio. A esta concentración de detergente vemos nuevamente un aumento y una posterior disminución. Esto sugiere una deficiencia de detergente para solubilizar las sustancias lipofílicas asociadas a una mayor proporción de material microsomal.

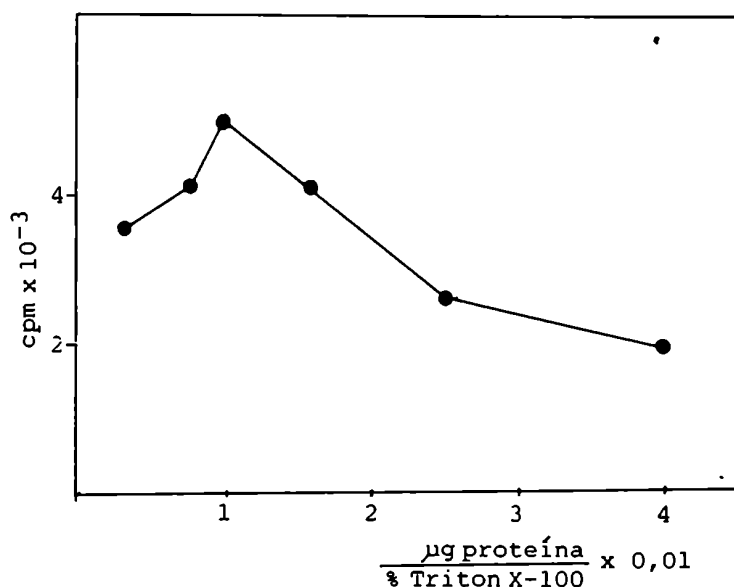
El Panel B indica que la adición de 0,2 % de detergente no produce mayores cambios en la incorporación de precursores al material extraído con C/M/A 10:10:3 a las concentraciones proteicas utilizadas, mientras que es evidente un rápido incremento cuando se realizó un ensayo similar con Triton X-100 0,5 %. Debemos considerar que la radiactividad incorporada a esta fracción deriva de dos posibles fuentes: la transferencia directa a partir de GDP-Man al núcleo central y la posterior elongación de este núcleo a través del Dol-P-Man recién formado (171).

El Panel C muestra que la formación de proteína manosilada se incrementa con la cantidad de fracción microsomal. Este resultado debe ser analizado teniendo en cuenta, como ya se ha indicado, que junto con el incremento de la fracción microsomal se produce un aumento simultáneo de la actividad enzimática y de los aceptores proteicos endógenos. El hecho de que niveles mayores de Triton X-100 reduzcan la cantidad de mano-



proteína obtenida indicaría que la enzima transferente del oligosacárido es inhibida por altas concentraciones de detergente.

Si en el experimento detallado en la Figura 24 graficamos la incorporación a fase inferior en función de la relación entre la concentración de proteína y de detergente, se obtiene la gráfica mostrada en la Figura 25.



**FIGURA 25:** Incorporación de Man a fase inferior en función de la relación entre la concentración de proteína y de detergente.

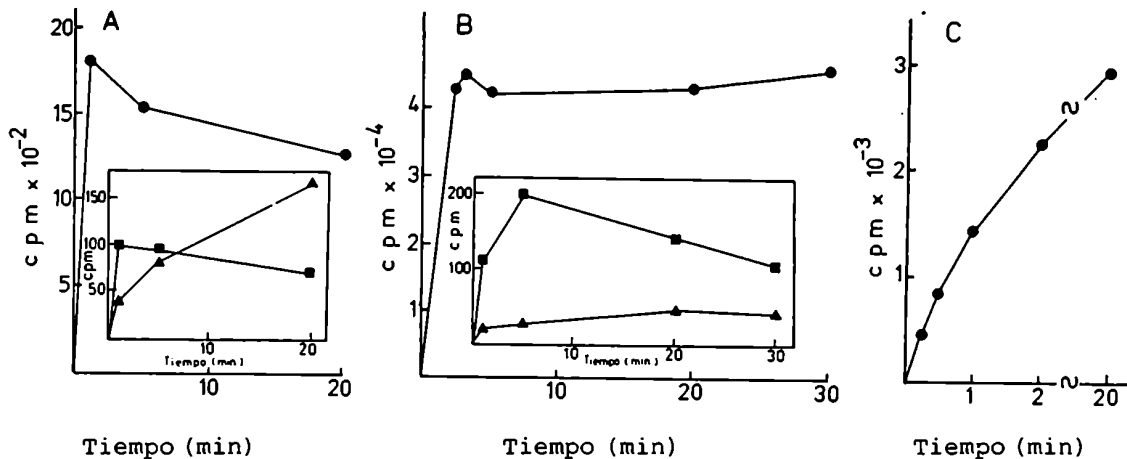
Con los datos obtenidos en la Figura 24 se grafica la radiactividad incorporada a fase inferior en función de la relación  $\frac{\mu\text{g proteína} \times 0,001}{\% \text{ Triton X-100}}$

En las condiciones utilizadas, con el sistema suplementado con 2  $\mu\text{g}$  de Dol-P, se logra máxima incorporación a fase

inferior cuando la relación calculada entre concentración de proteína y de detergente es igual a 1. Este parámetro se utilizó posteriormente para determinar la concentración de detergente apropiada para una dada cantidad de fracción microsomal.

III.A.2.1.2.e.  
Cinética

La cinética de incorporación de marca radiactiva a glicolípidos y glicoproteínas endógenos se grafica en la Figura 26, A.



**FIGURA 26:** Estudio de la cinética de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man. Se incubaron microsomas malignos 2 con  $1,7 \times 10^5$  cpm de  $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Man a  $30^\circ\text{C}$ , en presencia de Tris-HCl pH 7,4. Panel A (reacción endógena): 525 µg de proteína. Panel B: 525 µg de proteína más 2,5 µg de Dol-P y 0,5 % Triton. Panel C: 52 µg de proteína más 2,5 µg de Dol-P y 0,2 % Triton. Se grafica radioactividad incorporada a fase inferior (●), extracto C/M/A 10:10:3 (■) y fracción insoluble en TCA caliente (▲).

La incorporación máxima de  $^{14}\text{C}$ -Man a los productos solu-

bles en la fase inferior se obtiene esencialmente al primer minuto. El material extraído con el solvente C/M/A 10:10:3 sigue un perfil paralelo pero con mucha menor actividad. Por otro lado, la incorporación de radiactividad al material insoluble en TCA caliente se incrementa lentamente a lo largo del período experimental.

La declinación de la radiactividad asociada a la fase inferior puede explicarse a través de la transferencia del azúcar al oligosacárido y, a su vez, la disminución de la marca en el extracto C/M/A 10:10:3 por la transferencia de dicho oligosacárido a proteínas endógenas, que aumenta con el tiempo. Los resultados son coincidentes con los hallados en otros sistemas (331-333) donde la incorporación a manolípidos decae rápidamente, efecto interpretado como la acción conjunta de hidrolasas y transferasas (334).

En la Figura 26, B se muestran los resultados para el sistema suplementado con Dol-P y detergente. A los 2 min se logró una transferencia máxima a fase inferior, 25 veces superior a la obtenida en el caso anterior, que se mantiene con el tiempo, a diferencia de lo que ocurre con el sistema endógeno. En este caso no habría agotamiento del Dol-P acceptor ya que éste se agrega exógenamente.

En el inserto del Panel B se observa que la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man al extracto C/M/A 10:10:3 es el doble de la obtenida con el sistema endógeno. En una primera etapa

aumenta para disminuir luego de 10 min. Sin embargo, la incorporación de radiactividad a la fracción glicoproteica se ve inhibida por el agregado de lípido exógeno y detergente y casi no se modifica con el transcurso del tiempo.

En la Figura 26, C se aprecia la cinética en el sistema suplementado pero utilizando una concentración de proteína microsomal 10 veces menor. La transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Man a la fase inferior continúa aumentando por lo menos hasta los 20 min aunque dicha transferencia resulta 13 veces menor que la alcanzada en igual período de tiempo en incubaciones con mayor proporción de fracción microsomal.

#### III.A.2.1.2.f.

##### Efecto del pH

El efecto de la variación del pH en la actividad de manosil transferasas se aprecia en la Figura 27.

La actividad óptima para las enzimas involucradas en la transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Man a los lípidos presentes en la fase inferior y en el extracto C/M/A 10:10:3 se encuentra a pH 7,4 en buffer Tris-Maleato y cercano a 8,5 con Tris-HCl.

Considerando la incorporación a fase inferior, este último valor es más alto que el encontrado para enzimas bovinas (330,335) y de hígado de rata (336) aunque se encontró un pH de 8 para la manosil transferasa de linfocitos humanos (337,

338) y de insectos (326).

Con respecto a las discrepancias observadas entre ambos bufferes, también se encontró en insectos (313) que la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man en lípido-oligosacáridos era máxima a un pH de 6,8 cuando se empleaba un tampón de Tris-Maleato mientras que utilizando Tris-HCl la incorporación era menos eficiente y el óptimo se situaba en 7,4. La diferencia podría atribuirse al hecho de que se están promediando datos de varias manosil transferasas.

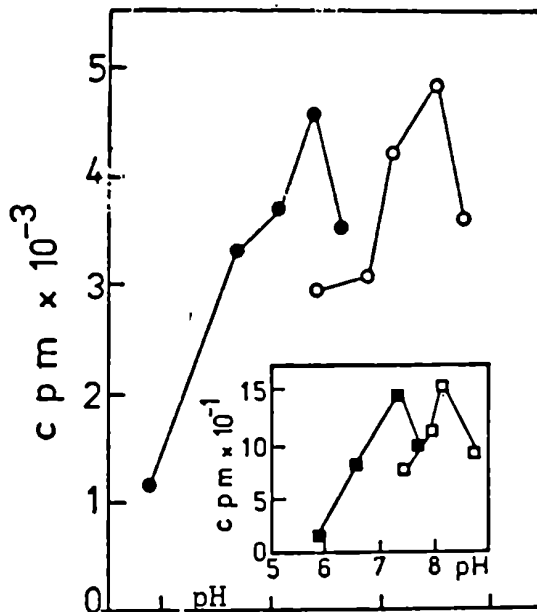


FIGURA 27: Curva de pH.

Se incubaron 52  $\mu\text{g}$  de microsomos malignos 2, 20 min a 30 °C con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}\text{C}$ -Man en presencia de 2,5  $\mu\text{g}$  de Dol-P y 0,2 % de Triton X-100. Se realizaron incubaciones variando el pH del buffer Tris-HCl (o) o Tris-Maleato (●) 100 mM.

Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior y en el inserto al extracto C/M/A 10:10:3

III.A.2.1.2.g.

Temperatura

Otro parámetro

estudiado en nuestro sistema fue la temperatura. En la Figura

28 se aprecia que la transferencia de Man a fase inferior presenta un amplio rango para la incorporación máxima con un óptimo a 30 °C, temperatura habitual para las manosiltransferasas de organismos homeotermos. En organismos poiquiloterms como insectos (326), hongos (339) y plantas (340) se encontró que dicho óptimo se sitúa alrededor de los 25°C.

En contraste, para la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man al extracto C/M/A 10:10:3 y a glicoproteínas se obtuvo mayor sensibilidad a las variaciones de temperatura y un óptimo a 25 y 27°C respectivamente.

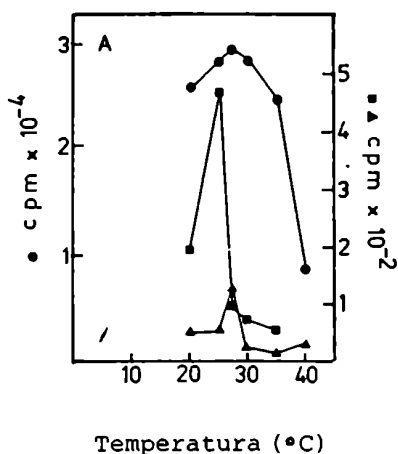


FIGURA 28: Dependencia de la temperatura de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man a lípidos-azúcares y glicoproteínas.

Se incubaron 52  $\mu\text{g}$  de microsomas malignos  $^2$  durante 20 min con  $1,7 \times 10^5$  cpm de GDP- $^{14}\text{C}$ -Man en presencia de Tris-Maleato pH 7,4; 2,5  $\mu\text{g}$  de Dol-P y 0,1% de Triton X-100. Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior (●), C/M/A 10:10:3 (■) y fracción insoluble en TCA caliente (▲).

### III.A.2.2. TRANSFERENCIA DE $^{14}\text{C}$ -GLC DESDE UDP- $^{14}\text{C}$ -GLC A POLI- PRENIL FOSFATO AZUCARES Y GLICOPROTEINAS

Se incubaron fracciones enriquecidas en microsomas preparadas a partir de tumores mamaros malignos y benignos con UDP-<sup>14</sup>C-Glc y se obtuvo transferencia de radiactividad a la fase inferior de la partición de Folch, al extracto C/M/A 10:10:3 y a la fracción insoluble en TCA caliente. Dicha incorporación se incrementó marcadamente adicionando al medio de cultivo Dol-P exógeno en presencia de detergente.

III.A.2.2.1. CARACTERIZACION  
DE LOS PRODUCTOS  
RADIOMARCADOS

Se emprendió la caracterización de los productos presentes en las distintas fracciones provenientes del procesamiento de los incubados descrito en II.2.A.4.

III.A.2.2.1.a.  
Fase inferior  
de la partición  
de Folch

Tratamiento ácido:

Se sometió el material proveniente de la fase inferior de la partición de Folch al tratamiento detallado en II.7.

Luego de la hidrólisis más del 90 % de la radiactividad se hizo hidrosoluble.

Esto indica que los lípidos glucosilados presentes en la fase inferior fueron sensibles a la hidrólisis a pH 2, sensibilidad al ácido típica de los poliprenil-P-azúcares (293,321), no conociéndose otros glicolípidos con tal labilidad.

Cromatografía de intercambio iónico:

Material proveniente de la fase inferior de incubaciones con microsomas malignos se cromatografiaron en columna de DEAE-celulosa según lo descrito en II.9.3.

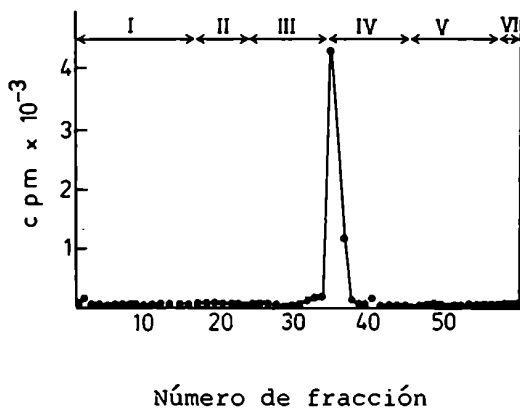


FIGURA 29: Cromatografía de intercambio iónico de los lípidos glucosilados presentes en la fase inferior.

Se cromatografiaron las fases inferiores del experimento descrito en la Figura 36. Los pasos de elución fueron: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.

En la Figura 29 se puede observar que la sustancia marcada es retenida por la columna de la que es eluída con 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3. Este resultado es compatible con la conducta cromatográfica de los poliprenil-P-azú-



cares descrita por numerosos autores (294) y permite suponer que nuestro producto inicialmente soluble en C/M 3:2 es un poliprenil-P-Glc y que no hay presentes derivados neutros ni pirofosfatados.

Cromatografía sobre capa delgada:

El material presente en la fase inferior se sometió a cromatografía sobre placa delgada (ver II.9.2.). En la misma placa se sembraron patrones radiactivos de Dol-P-Man, Dol-P-Glc, undecaprenol-P-Gal y Man.



FIGURA 30: Cromatografía sobre placa delgada de los mano y glucolípidos de tumores mamarios humanos malignos.

Se sembraron en placas de Silica gel aproximadamente 3.000 cpm de la fase inferior del tejido maligno del experimento descrito en la Tabla 11, canal 6. En otros canales se sembraron:  $^{14}\text{C}$ -Man (1); Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado (2); Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Man de hígado (3); undecaprenol-P-Gal de *Acetobacter xylinium* (4) y en el canal 5 lípido- $^{14}\text{C}$ -mancosilado de mama proveniente de experimentos detallados en III.A. 2.1.1.a; (6) idem lípido  $^{14}\text{C}$ -glucosilado. Se cromatografió en solvente G. Los compuestos radiactivos se detectaron por autorradiografía en placas Kodak X-Omat. O: origen; F: frente.

En la Figura 30 puede apreciarse que el compuesto glucosilado en estudio presenta igual  $R_{Man}$  (1,54) que el patrón de Dol-P-Glc de hígado.

Cromatografía sobre papel:

Se reunieron las fracciones 35 y 36 de la columna de DEAE descrita en la Figura 30. Se evaporaron bajo nitrógeno y se sometieron a partición de Folch para eliminar las sales. Se realizó luego una hidrólisis a pH 2 de dicho material (II.7.) y se cromatografió sobre papel la fase hidrosoluble de la hidrólisis de acuerdo a lo descrito en II.9.1. En el mismo lugar de la muestra se sembraron Glc y Gal como patrones internos. La tira de papel se analizó por medio de un radiocromatógrafo. En el radiocromatograma de la Figura 31 se observa un único pico de radiactividad coincidente con la posición de migración del patrón de Glc.

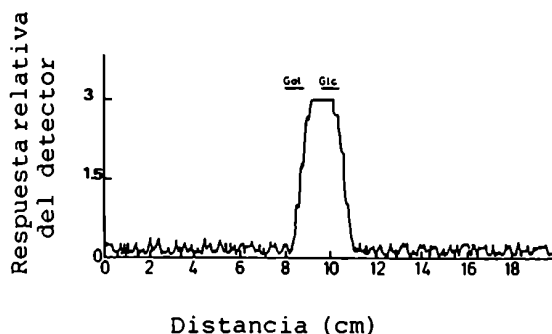


FIGURA 31: Cromatografía sobre papel de los azúcares liberados del glucolípido por hidrólisis ácida.

El material radiactivo eluido de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 29 se sometió a hidrólisis ácida y los productos hidrosolubles se cromatografiaron sobre papel durante 29 h con el solvente A. Se muestra la posición de migración de los azúcares patrones.

III.A.2.2.1.b.

Extracto C/M/A

10:10:3

Tratamiento ácido:

Se realizó una hidrólisis a pH 2 (II.7.) del material extraído con el solvente C/M/A 10:10:3. Con tal tratamiento más del 90 % de la radiactividad se hizo hidrosoluble, sensibilidad al ácido esperable para un poliprenil-PP-oligosacárido, como consecuencia de la ruptura entre el enlace fosfato proximal al azúcar y éste.

Cromatografía de intercambio iónico:

Se efectuó una cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (II.9.3.) del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 proveniente de incubaciones de UDP-<sup>14</sup>C-Glc con microsomas aislados de tumores malignos.

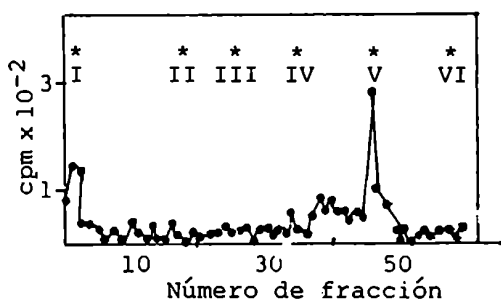


FIGURA 32: Cromatografía de intercambio iónico del material extraído con C/M/A 10:10:3.

Se evaporaron juntos los extractos C/M/A 10:10:3 del experimento descrito en la Figura 36 bajo flujo de N<sub>2</sub>. Se redisolviéron en 20 µl del mismo solvente y se sembraron en columna de DEAE-celulosa de acuerdo a lo descrito en II.9.3.

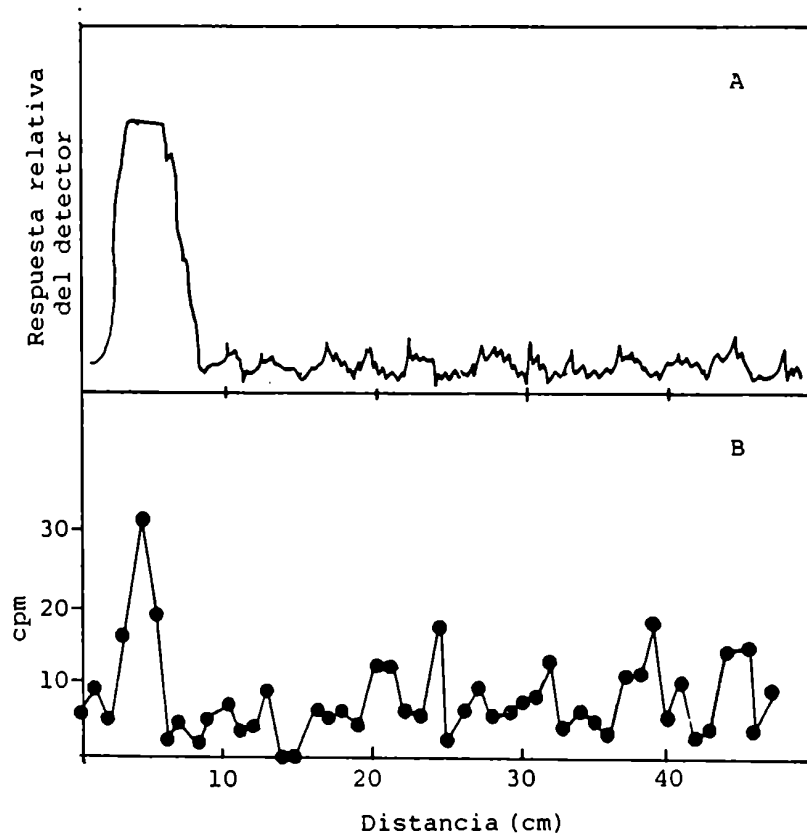
Analizando la Figura 32 vemos un pico radiactivo principal que emerge de la columna con 25 mM de formiato de amonio en C/M/A 10:10:3, comportamiento típico para un poliprenil-PP-oligosacárido (50,293-295). Se detectan contaminantes menores.

En otro ensayo se reunieron los extractos C/M/A 10:10:3 del experimento descrito en la Tabla 12. Se sembró el material en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con 18 ml de C/M/A 10:10:3, disuelto en 1 ml del mismo solvente. Se recicló 3 veces. Se agregaron 8,5 ml del mismo solvente y luego, cambiando los tubos, 5 ml de una solución 25 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3 y luego 7 ml de 50 mM en el mismo solvente. La radiactividad apareció en la fracción 50 mM.

#### Cromatografía sobre papel:

Se evaporó el tubo eluido con 50 mM de formiato de amonio en C/M/A 10:10:3 de la última columna de DEAE-celulosa descrita. Se eliminaron las sales (II.2.A.4.) y se realizó una hidrólisis a pH 2 (II.7.). Se efectuó una cromatografía sobre papel del material hidrosoluble de acuerdo a lo descrito en II.9.1. Simultáneamente se cromatografió un oligosacariglucosilado provisto por el Dr. L. Quesada.

En la Figura 33, B podemos observar un compuesto de escasa actividad a 4 cm del origen, igual distancia que la recorrida por el patrón de oligosacárido glucosilado (Figura 33, panel A).



**FIGURA 33:** Cromatografía sobre papel del material extraído con C/M/A 10:10:3 previamente purificado por columna de intercambio iónico.

Se realizó una cromatografía descendente sobre papel de los productos hidrosolubles de la hidrólisis a pH 2 del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 (B) y de un oligosacárido glucosilado patrón (A). Se cromatografió con solvente B durante 48 h. La cromatografía correspondiente al patrón se analizó en un radiocromatógrafo y para la muestra se cortó el cromatograma en fracciones de 1 cm cuya radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

III.A.2.2.2. CARACTERISTICAS  
DE LA TRANSFE-  
RENCIA DE GLC A  
LIPIDO AZUCARES  
Y GLICOPROTEINAS

Se prepararon fracciones ricas en microsomas (II.2.A.2.) a partir de tumores mamarios malignos y benignos. Estas se incubaron con UDP-<sup>14</sup>C-Glc de acuerdo a lo detallado en II.2.A.3. En cada ensayo se modificaron las condiciones de incubación y se determinó el efecto de las mismas sobre la incorporación del azúcar radiactivo a sustancias solubles en medios orgánicos y a glicoproteínas.

III.A.2.2.2.a.  
Agregado de lí-  
pidos exógenos

Se añadió al medio de incubación Dol-P de hígado porcino y un detergente neutro. En la Tabla 10 se observa que la incorporación a fase inferior se incrementó 2,6 veces en el sistema suplementado con lípidos exógenos en presencia de Triton X-100. Se obtuvo estimulación de la incorporación a la fracción insoluble en TCA caliente e inhibición de la transferencia del azúcar al extracto C/M/A

10:10:3

Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
	cpm/100 µg prot.	Estim <u>u</u> laci <u>o</u> n	cpm/100 µg prot.	Estim <u>u</u> laci <u>o</u> n	cpm/100 µg prot.	Estim <u>u</u> laci <u>o</u> n
----	1.288		492		6.350	
Dol-P + Tritón X-100	3.365	2,6	156	0,3	11.144	1,8

TABLA 10: Efecto del agregado de lípidos exógenos en presencia de detergente sobre las reacciones de transferencia de Glc.

Se incubaron 52 µg de microsomas malignos 2 durante 20 min a 15°C con  $7,5 \times 10^5$  cpm de UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc en presencia de Tris-Maleato pH 7,4. Se comparan los resultados obtenidos en el sistema endógeno y suplementado con 2,5 µg de Dol-P de hígado porcino en presencia de 0,1% de Triton X-100.

Sobre la base de los resultados obtenidos se diseñó el ensayo que se describe en la Tabla 11, en el cual se estudian los efectos del agregado de Dol-P, detergente o ambos agentes juntos, al medio de incubación de fracciones microsomales aisladas de tumores malignos o benignos. Al mismo tiempo se investigó el efecto del EDTA, agente que actúa quelando el  $\text{Mg}^{2+}$  necesario para las reacciones de transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc.

Podemos observar que la transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc a las 3 fracciones en el sistema endógeno es mucho mayor para el tejido maligno que para el benigno. Esto podría deberse a un menor pool endógeno de Dol-P en el tumor benigno, ya que el sistema benigno resultó más sensible a la estimulación con Dol-P y Triton X-100 que el maligno. El marcado aumento de la formación de poliprenil-P-Glc en ambos tejidos en presencia del lí

pido exógeno y de detergente y su inhibición con EDTA, indican que nuestra enzima se comporta en forma similar a otras glucosiltransferasas descriptas (50).

Con respecto a la incorporación al extracto C/M/A 10:10:3 y a glicoproteínas, es escaso el efecto del agregado de Dol-P y Triton X-100, pero se observa un efecto inhibitorio del EDTA. Este resultado es distinto del obtenido en las incubaciones con GDP-<sup>14</sup>C-Man (III.A.2.1.2.). Debemos tener en cuenta que, a diferencia de lo que ocurría con las Man, la Glc sólo se incorpora al oligosacárido a partir de Dol-P-Glc.

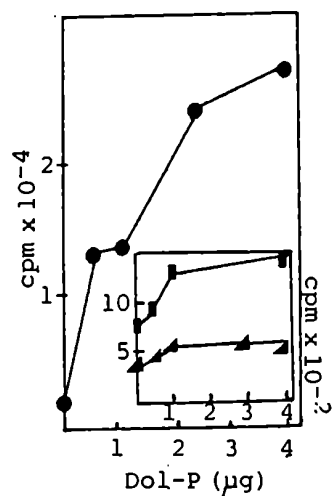
	Fase Inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
	cpm/ mg prot.	Estimulaci <sup>ó</sup> n	cpm/ mg prot.	Estimulaci <sup>ó</sup> n	cpm/ mg prot.	Estimulaci <sup>ó</sup> n
-----	3.801		3.060		6.235	
Triton X-100	3.728	1,0	1.602	0,5		
Dol-P	4.039	1,1	534	0,2	8.399	1,3
A Dol-P + Triton X-100	55.992	14,7	2.678	0,9	7.223	1,2
Dol-P + EDTA + Triton X-100	1.530	0,03*	480	0,2*		
<hr/>						
-----	676		1.488		2.000	
B Dol-P + Triton X-100	25.482	34,7	1.096	0,7	2.029	1,0
Dol-P + EDTA + Triton X-100	980	0,04*	231	0,2*	858	0,4*

TABLA 11: Efecto del agregado al medio de cultivo de Dol-P, detergente y EDTA sobre las reacciones de transferencia de Glc.

Se incubaron 550 µg de microsomas malignos 1 (A) o 300 µg de microsomas benignos 1 (B), 20 min a 30°C con  $7,5 \times 10^5$  cpm de UDP-<sup>14</sup>C-Glc en presencia de Tris-HCl pH 7,4; 14 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM de EDTA. Se estudió el efecto del añadido de 4 µg de Dol-P en presencia de Triton X-100 0,5% (A) o 0,2% (B). Se analizó el efecto del agregado de EDTA 18 mM en ausencia de MgCl<sub>2</sub>. \*: estimulación calculada con respecto a valores en presencia de Dol-P y Triton X-100.



En otro ensayo, descrito en la Figura 34, se analizaron las reacciones de transferencia de Glc en presencia de cantidades crecientes de Dol-P de hígado porcino.



**FIGURA 34:** Efecto de la concentración de Dol-P sobre las reacciones de transferencia de Glc.

Se incubaron 525 μg de microsomas malignos 2, 20 min a 30°C con  $7,5 \times 10^5$  cpm de UDP-<sup>14</sup>C-Glc en presencia de Tris-HCl pH 7,4 y 0,5% de Triton X-100. Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior (●) y en el inserto al extracto C/M/A 10:10:3 (■) y a la fracción insoluble en TCA caliente (▲).

Se aprecia que la incorporación de <sup>14</sup>C-Glc a los lípidos presentes en la fase inferior y en el extracto C/M/A 10:10:3 se incrementa concomitantemente con la cantidad de Dol-P añadido. La formación de glucoproteína se estimula en menor grado, llegando dicha estimulación a un máximo con el añadido de 1 μg de Dol-P.

III.A.2.2.2.b.

Temperatura

Se analizó el e

fecto de la temperatura sobre las reacciones de transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc. En la Figura 35 se muestran los resultados obtenidos.

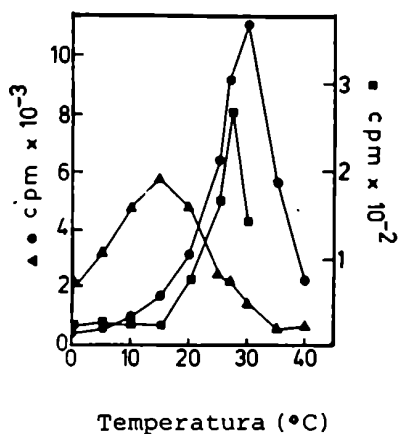


FIGURA 35: Efecto de la temperatura sobre las reacciones de transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc.

Se incubaron 52  $\mu\text{g}$  de microsomas malignos 2 durante 20 min con  $7,5 \times 10^5$  cpm de UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc en presencia de Tris-Maleato pH 7,4; 2,5  $\mu\text{g}$  de Dol-P y 0,1 % de Triton X-100. Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior (●); extracto C/M/A 10:10:3 (■) y fracción insoluble en TCA caliente (▲).

La temperatura óptima para la formación de lípidos glucosilados presentes en la fase inferior y en el extracto C/M/A 10:10:3 fue de 30 y 27°C, respectivamente, concordando con los valores obtenidos para las reacciones de transferencia de Glc (III.A.2.1.g.).

El resultado más sorprendente es el alcanzado para las glucoproteínas, donde la incorporación máxima se logra a 15°C.

Esto sugiere que a esta temperatura habría una menor actividad de glucosidasas, enzimas que degradan rápidamente el extremo glucosídico de las glicoproteínas formadas (83,341). Po

demos considerar que la radiactividad máxima encontrada a 15 °C es debida a que a esa temperatura hay un equilibrio entre la actividad de dos sistemas enzimáticos: las glucosidasas y la enzima transferente del oligosacárido.

III.A.2.2.2.c.  
Relación entre  
la concentración  
de proteína mi-  
croosomal y de  
detergente

Sobre la base de los resultados obtenidos para las manosiltransferasas (ver III.A.2.1.2.d.) se decidió emprender el estudio de la influencia de la relación entre la cantidad de proteína microosomal y la concentración de detergente en las reacciones de transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc. A tal efecto se diseñaron los ensayos descritos en la Figura 36.

Los resultados son similares a los obtenidos para las reacciones de transferencia de Man (Figura 24). La disminución de la radiactividad presente en la fase inferior (Panel A) al incrementar la concentración de proteína microosomal en presencia de 0,2 % de Triton X-100, se revierte aumentando a 0,5 % la concentración del detergente añadido. A esta concentración vemos que se produce un leve aumento y una posterior disminución en presencia de 525 ug de proteína. Puede inter-

pretarse como un déficit de detergente para solubilizar la mayor cantidad de sustancias lipofílicas involucradas en la mayor cantidad de fracción microsomal añadida.

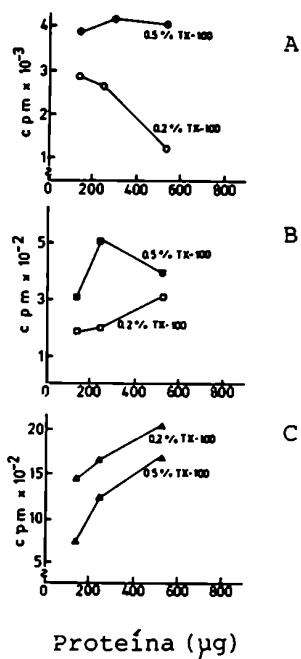


FIGURA 36: Relación entre la concentración de proteína microsomal y la de detergente en las reacciones de transferencia de Glc.

Se incubaron 140, 245 o 525 µg de proteína microsomal maligna 2, 20 min a 30°C con  $7,5 \times 10^5$  cpm de UDP-<sup>14</sup>C-Glc en presencia de Tris-Maleato pH 7,4; 2,5 µg de Dol-P y 0,2 (o) o 0,5 % (●) de Triton X-100. Se grafica radioactividad incorporada a fase inferior (A), extracto C/M/A 10:10:3 (B) y fracción insoluble en TCA caliente (C).

En el Panel B no encontramos explicación para la disminución observada al incrementarse la concentración proteica en presencia de 0,5 % de Triton X-100. En este caso, comparando

con la incorporación de Man al extracto C/M/A 10:10:3 (Figura 24, B), un factor de diferencia sería el hecho de que la incorporación de Glc al oligosacárido sólo se produce a través de poliprenil fosfato derivados.

Con respecto al Panel C, vemos nuevamente que la transferencia del azúcar a la fracción proteica se produce mejor a baja concentración de detergente, o quizás en estas condiciones las glucosidasas son menos activas. En el análisis tampoco puede descartarse el hecho de que se produzca transferencia directa del azúcar a la proteína a partir del nucleótido azúcar y que dicha transferencia sea más activa al disminuir la concentración del detergente.

$\mu\text{g}$ proteína	Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA $\emptyset$	
		cpm	Estimulación	cpm	Estimulación	cpm	Estimulación
52	----	2.956		480		2.045	
52	Dol-P + Triton X-100 (0,5%)	31.740	10,7	990	2,1	1.870	0,9
70	Dol-P + Triton X-100 (0,8%)	23.644		900		1.456	

TABLA 12: Efecto del agregado de Dol-P variando la concentración de proteína y de detergente.

Se incubaron microsomas malignos 2, 20 min a 27°C con  $7,5 \times 10^5$  cpm en presencia de Tris-Maleato pH 7,4. Se estudió el efecto del agregado de 2,5  $\mu\text{g}$  de Dol-P de hígado porcino en presencia de diferentes concentraciones de detergente y de proteína microsomal.

En la Tabla 12 se verifica nuevamente que el añadido de Dol-P exógeno en presencia de detergente produce un aumento en la incorporación de radiactividad a la fase inferior de la partición de Folch. Los resultados obtenidos para la transferencia del azúcar a glicoproteínas y al extracto C/M/A 10:10:3 son opuestos a los evidenciados en el ensayo descrito en la Tabla 10. Si bien en ambos experimentos se empleó la misma preparación microsomal e idéntica cantidad de Dol-P, debe notarse que entre ambos ensayos existe una notable diferencia en la relación proteína/detergente (ver definición en Figura 25) que es de 0,5 y 0,1 para los experimentos correspondientes a las Tablas 10 y 12 respectivamente.

De acuerdo a las conclusiones deparadas por el experimento detallado en la Figura 36, C, resulta comprensible que se logre mayor estimulación de la incorporación a glicoproteínas en el ensayo reseñado en la Tabla 10, ya que la cantidad relativa de detergente es menor. Del mismo modo es esperable que a mayor concentración relativa de Triton X-100 se alcance una mejor estimulación por agregado de Dol-P en el experimento correspondiente a la Tabla 12 (ver Figura 36, B).

III.A.2.3. TRANSFERENCIA DE  $^{14}\text{C}$ -GlcNac  
DESDE UDP- $^{14}\text{C}$ -GlcNac A POLI-  
PRENIL FOSFATO AZUCARES Y  
GLICOPROTEINAS

Se incubaron fracciones microsomas aisladas de tumores malignos con UDP-<sup>14</sup>C-GlcNAc. En la Tabla 13 se evidencia que si bien la incorporación de radiactividad fue mucho menor que la de Man o Glc, el sistema responde al agregado de detergente, Dol-P y EDTA en forma similar a la obtenida para las manosil y glucosiltransferasas.

Agregado	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
	cpm/100 µg prot.	Estimulación	cpm/100 µg prot.	Estimulación	cpm/100 µg prot.	Estimulación
----	83		178		62	
Triton X-100	63	0,7	48	0,3	35	0,6
Dol-P + Triton X-100	134	1,6	134	0,8	104	1,7
Dol-P + EDTA + Triton X-100	105	0,8*	88	0,6*	57	0,5*

TABLA 13: Incubaciones de microsomas tumorales malignos con UDP-<sup>14</sup>C-GlcNAc. Efecto de detergente, Dol-P y EDTA.

Se incubaron 110 µg de microsomas malignos 1, 20 min a 30°C con 4,5 x 10<sup>5</sup> cpm de UDP-<sup>14</sup>C-GlcNAc en presencia de Tris-HCl pH 7,4; 2 mM EDTA y 14 mM MgCl<sub>2</sub>. Se estudió el efecto del agregado de 4 µg de Dol-P de hígado porcino y 0,2 % de Triton X-100 o de EDTA 18 mM en el sistema suplementado pero sin MgCl<sub>2</sub>.

\*: Estimulación calculada con respecto al sistema suplementado con Dol-P y detergente.

#### III.A.2.4. BIOSINTESIS DE GLICOPROTEINAS

##### III.A.2.4.1. GLICOSILACION DE

##### PROTEINAS A PARTIR

##### DE NUCLEOTIDO-

##### AZUCARES

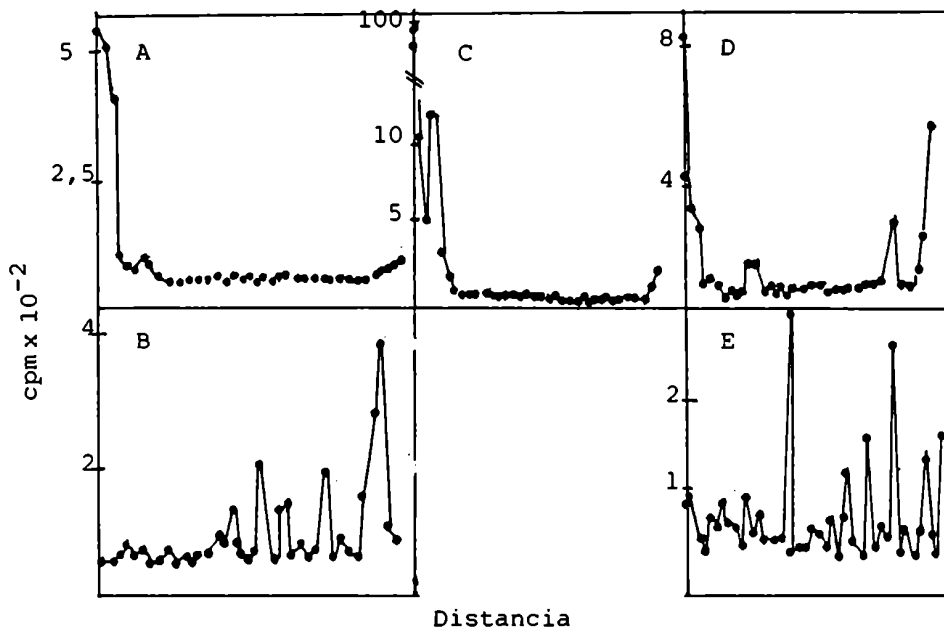
En los ensayos descritos en III.A.2.1. y III.A.2.2., al incubar fracciones microsomales con nucleótido azúcares se obtuvo incorporación de azúcares radiactivos a la fracción insoluble en TCA caliente, luego de realizar varios pasos extractivos con solventes orgánicos (ver II.2.A.4.). Se diseñaron experimentos tendientes a determinar las características del material precipitable por TCA.

Se incubaron los microsomas con UDP-<sup>14</sup>C-Glc a 15°C, debido a que a esta temperatura se lograba máxima incorporación de <sup>14</sup>C-Glc a la fracción de nuestro interés (ver III.A.2.2.2. b.). Las reacciones se detuvieron por enfriamiento y añadido de 12 µl de TCA 50%. Se centrifugó. Se hicieron 2 lavados con 0,5 ml de TCA 10% y se secó bajo nitrógeno. Se realizó un análisis electroforético de acuerdo a lo descrito en II.10. Simultáneamente se efectuó una electroforesis de las proteínas microsomales "frías" (sin incubar) malignas y benignas.

En un primer ensayo los microsomas malignos y benignos se incubaron durante 20 min. Se procesó el material según lo descrito (II.10). Los resultados obtenidos se aprecian en la Figura 37, Paneles A y B.

Se observa que en el tejido maligno no existe prácticamente migración de proteínas, a diferencia de lo que ocurre con el tejido benigno donde la mayor parte de la radiactividad se encuentra dentro del gel.





**FIGURA 37:** Electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas marcadas a partir de UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc.

Se incubaron 68  $\mu\text{g}$  de microsomas benignos 2 (Paneles B y E) o 70  $\mu\text{g}$  de microsomas malignos 2 (A, C y D), a 15°C con  $12,5 \times 10^5$  cpm de UDP- $^{14}\text{C}$ -Glc en presencia de Tris-Maleato 0,1 M pH 7,4;  $\text{MgCl}_2$  14 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM; 2,5  $\mu\text{g}$  de Dol-P y Triton X-100 0,1%. Se procede según se describe en II.10. y II.12. En el Panel A se incuba durante 20 min. En C durante 20 min pero antes de sembrar la muestra en el gel se centrifuga y se elimina el precipitado. En D y E se incuba durante 40 min y se realiza el tratamiento con TCA en caliente.

Para tratar de determinar si en las incubaciones con tumores malignos la radiactividad que no penetraba en el gel se debía a la presencia de agregados, se centrifugó la muestra antes de ser sembrada en el gel, eliminándose el precipitado.

En el Panel C puede apreciarse que la mayor parte del mate-

rial continuó sin penetrar en el gel.

Se intentó establecer si la radiactividad que permanecía en el gel "stacking" estaba asociada a material lipídico que pudiera ser sensible al tratamiento con TCA en caliente. En tal sentido, se realizaron incubaciones como las descritas durante 40 min. Se ensayó con una alícuota (previo agregado de albúmina bovina como "carrier") que porcentaje de la radiactividad se hacía soluble con TCA caliente. Se estimó que éste era del 72 %. Se agregó al resto del material TCA y se calentó 5 min a 100°C, en baño de agua, realizándose luego 2 lavados con 0,5 ml de TCA 10 % frío.

El perfil obtenido con el material insoluble en TCA caliente se muestra en la Figura 37, D y E. Nuevamente casi no hubo migración de proteínas en la muestra proveniente de incubaciones con microsomas malignos (Panel D) a diferencia de lo que ocurrió con el material benigno (Panel E). En este último caso no hubo diferencias con respecto al perfil obtenido previamente (Panel B).

Al analizar los perfiles electroforéticos de las proteínas radiomarcadas sometidas al tratamiento ácido en caliente, los resultados deben interpretarse con precaución, debido a que al comparar el perfil electroforético de las proteínas microso-males "frías" sometidas o no al tratamiento en caliente con TCA, se observó una distorsión de los polipéptidos visualizados con Coomassie blue, con predominio de formas de bajo

peso molecular en los microsomas sujetos al calentamiento en medio ácido.

III.A.2.4.2. GLICOSILACION DE  
PROTEINAS A PARTIR  
DE DOLIQUIL DERI-  
VADOS: TRANSFEREN-  
RENCIA DEL OLIGOSA-  
CARIDO DESDE DOL-PP  
OLIGOSACARIDO A  
PROTEINAS ACEPTO-  
RAS ENDOGENAS

Los datos cinéti-  
cos obtenidos en las reacciones de transferencia de Man a par-  
tir de GDP-<sup>14</sup>C-Man sugieren que los manooligosacáridos pueden  
estar involucrados en la glicosilación de proteínas mamarias  
endógenas (ver Figura 26).

El paso final en el mecanismo de glicosilación de proteí-  
nas a través de intermediarios lipídicos consiste en la trans-  
ferencia de un oligosacárido desde un Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub>  
a un resto asparagina de una proteína (28).

El objetivo de los trabajos que se describirán a conti-  
nuación fue probar la existencia de la enzima transferente  
del oligosacárido en microsomas mamarios humanos.

Para ello, el Dol-PP-oligosacárido a ser transferido se

preparó utilizando diferentes procedimientos.

Se estudió, además, el efecto del agregado al medio de cultivo de kojibiosa, un inhibidor de las glucosidasas I (342).

Estas actúan sobre del Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub> o sobre la glicoproteína formada, produciendo la escisión de la Glc terminal.

III.A.2.4.2.a.  
Transferencia de  
Dol-PP-oligosacá-  
rido preparado a  
partir de incuba-  
ciones de cortes  
de oviducto de  
gallina con <sup>14</sup>C-Glc

Inicialmente, el Dol-PP-oligosacárido utilizado en los ensayos de transferencia fue proporcionado por el Dr. L. Quesada. Provenía de oviducto de gallina y estaba uniformemente marcado en todos los azúcares con <sup>14</sup>C-Glc.

Se incubaron fracciones microsomales aisladas de tumores malignos con el Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido recientemente mencionado, en las condiciones descritas en II.2.A.3. Sobre la base de los estudios presentados en la Figura 35, la temperatura de incubación se fijó en 15°C. Los incubados se procesaron de acuerdo a II.2.A.4. Se determinó la radiactividad presente en la fase inferior de la partición de Folch, en el extracto

C/M/A 10:10:3 y en la fracción insoluble en TCA caliente. Los extractos C/M/A se sometieron a hidrólisis a pH 2 (II.7.) y se determinó la radiactividad remanente en la fase inferior del hidrolizado particionado. En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos.

Fracción	Sin kojibiosa		Con kojibiosa	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fase inferior	1.004	9,8	818	8,0
Fase superior	3.624	35,5	3.096	30,3
C/M/A 10:10:3 pos H*	282	2,8	457	4,5
Insoluble TCA Ø	800	7,8	988	9,7

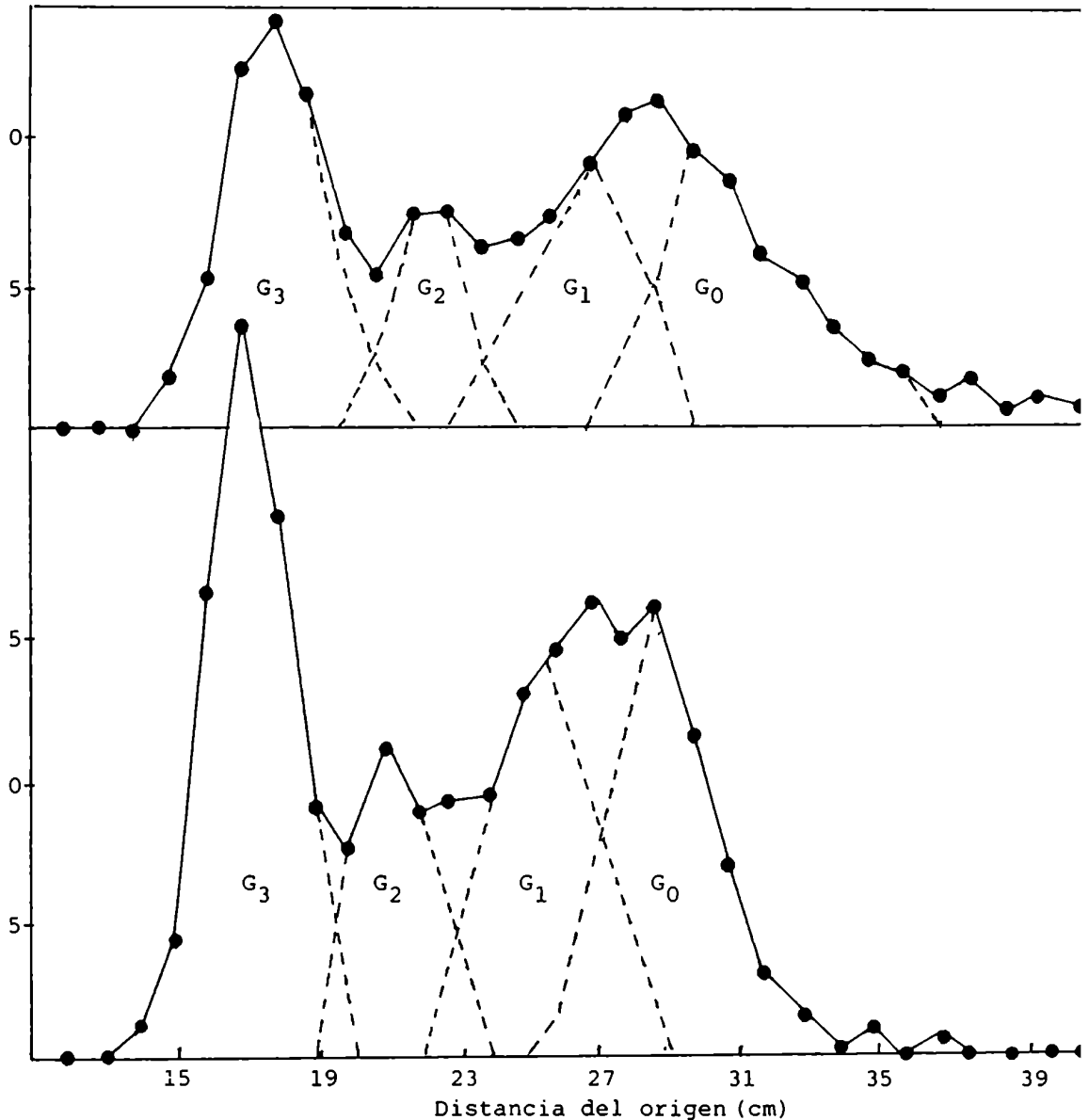
TABLA 14: Transferencia de Dol-PP-oligosacárido de oviducto de gallina a proteínas. Efecto de la kojibiosa.

Se incubaron 490 µg de microsomas malignos 2, 15 min a 15°C con 5.000 cpm de Dol-PP-14C-oligosacárido en presencia de Tris-Maleato pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 8 mM; MnCl<sub>2</sub> 8 mM; EDTA 2 mM y 0,2 % de Triton X-100. \*: radiactividad presente en la fase inferior del extracto C/M/A 10:10:3 particionado luego de la hidrólisis a pH 2.

Podemos apreciar que se produjo transferencia del oligosacárido a la fracción proteica. Los efectos de la kojibiosa son poco marcados: la transferencia de radiactividad aumentó de 7,8 a 9,7 % cuando se añadió al sistema el inhibidor (24 %).

Vemos también que en presencia de kojibiosa es menor la ruptura del oligosacárido representada por la radiactividad presente en las fases inferior y superior de la partición de Folch.

Se realizó una cromatografía sobre papel de los productos hidrosolubles de la hidrólisis del extracto C/M/A previamente descrita, que se muestra en la Figura 38.



**FIGURA 38:** Cromatografía sobre papel de los productos de hidrólisis del extracto C/M/A 10:10:3.

Se sometió a hidrólisis a pH 2 al material presente en el extracto C/M/A 10:10:3. Se particionó y los productos hidrosolubles se cromatografiaron en solvente C durante 64h. El cromatograma se cortó en fracciones de 1cm cuya radiactividad se determinó. G<sub>0</sub>: GlcNAC<sub>2</sub>Mang; G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>3</sub>: GlcNAC<sub>2</sub>Mang-Glc<sub>1-3</sub>. Incubaciones en ausencia (B) o presencia (A) de koji biosa.

En ambos cromatogramas se distinguen 4 picos. De acuerdo a su posición de migración el primero corresponde a un oligosacárido  $\text{GlcNAc}_2\text{-Man}_9\text{-Glc}_3$  ( $G_3$ ), el segundo al mismo con sólo 2 Glc ( $G_2$ ) y los otros dos, respectivamente, a oligosacáridos con una Glc o no glucosilado ( $G_1$  y  $G_0$ ).

Se determinó la radiactividad correspondiente a cada pico. En la Tabla 15 se evidencia que en ambos cromatogramas el porcentaje de radiactividad correspondiente a cada oligosacárido es equivalente, si bien las cuentas obtenidas en presencia de kojibiosa son menores, debido a pérdidas de material durante su procesamiento.

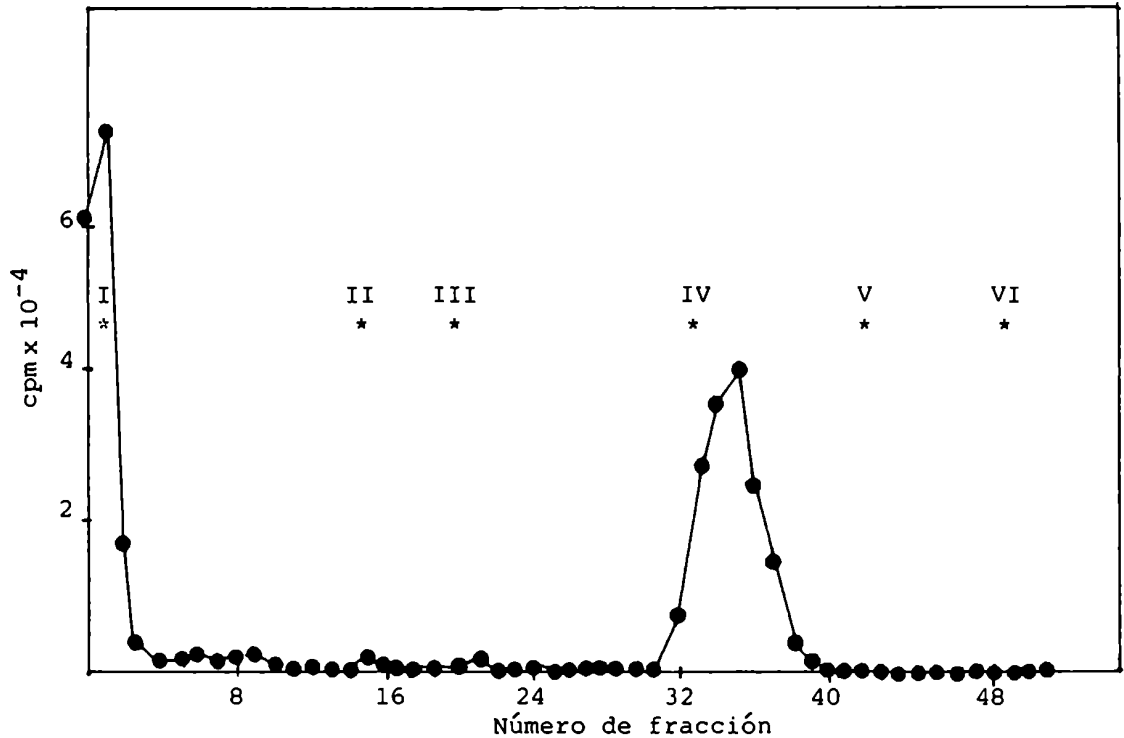
Oligosacárido	Sin kojibiosa		Con kojibiosa	
	cpm	%	cpm	%
$G_0$	582	26,3	454	27,6
$G_1$	543	24,6	406	24,6
$G_2$	319	14,4	230	14,0
$G_3$	766	34,7	557	33,8

TABLA 15: Distribución porcentual de los distintos oligosacáridos aislados del lípido remanente en el extracto C/M/A 10:10:3.

En la Figura 38 se discriminó la radiactividad correspondiente a cada pico y se determinó su porcentaje con respecto al total.

Sobre la base de los resultados obtenidos se decidió continuar el estudio de la reacción de transferencia, para lo

cual se preparó Dol-PP-oligosacárido a partir de oviducto de gallina de acuerdo a lo descrito en II.4. Se purificó el mismo a través de una columna de DEAE-celulosa (ver II.9.3.a.). En la Figura 34 se muestra el perfil cromatográfico obtenido.



**FIGURA 39:** Cromatografía de intercambio iónico del extracto C/M/A 10:10:3 proveniente de incubaciones de cortes de oviducto de gallina con <sup>14</sup>C-Glc.

Pasos de elución: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.

Se reunieron las fracciones 33 a 40, se las sometió a partición de Folch para eliminar las sales, previo agregado



de proteína "transportadora" (II.3.). La interfase se extrajo dos veces con 1 ml de C/M/A 10:10:3 (ver II.4.). Este extracto se evaporó bajo nitrógeno y se redisolvió en 400  $\mu$ l del mismo solvente. Se obtuvieron 134.000 cpm de Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido.

Se incubó el Dol-PP-oligosacárido así preparado con fracciones microsomales aisladas de tumores mamarios malignos y benignos.

La Tabla 16 muestra una muy escasa radiactividad asociada a la fracción resistente al TCA caliente. Al mismo tiempo, la marca presente en las fases inferior y superior sugiere que el <sup>14</sup>C-oligosacárido sufrió un marcado proceso degradativo que involucra a las glucosidasas, copurificadas en la fracción microsomal.

Fracción	Benigno		Maligno	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fase inferior	4.431	38,0	5.305	46,4
Fase superior	1.204	10,0	720	6,3
C/M/A 10:10:3	5.286	45,8	4.838	42,2
TCA soluble	485	4,2	371	3,2
Insoluble TCA $\emptyset$	133	1,2	213	1,9

TABLA 16: Transferencia del <sup>14</sup>C-oligosacárido a partir de Dol-PP-oligosacárido a proteínas aceptoras endógenas en tumores mamarios malignos y benignos.

Se incubaron 520  $\mu$ g de microsomas malignos 2 o benignos 2 con 6.000 cpm de Dol-PP-oligosacárido de acuerdo a lo descrito en la Tabla 14.

En tal sentido, se decidió reintentar la reacción de transferencia en presencia de kojibiosa.

La Tabla 17 muestra el marcado efecto del inhibidor: un incremento cercano a las 40 veces de la radiactividad asociada con las proteínas endógenas de microsomas provenientes de tumores malignos. Esto concuerda con el decrecimiento de la radiactividad encontrada en las fases inferior y superior, derivada de la ruptura del oligosacárido.

	Sin kojibiosa		Con kojibiosa	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fase inferior	4.826	64,8	3.796	42,0
Fase superior	402	4,6	356	3,9
C/M/A 10:10:3	2.520	29,0	2.660	29,5
TCA soluble	80	0,9	110	1,2
Insoluble TCA Ø	56	0,6	2.098	23,3

TABLA 17: Efecto de la kojibiosa sobre la reacción de transferencia del oligosacárido.

Se incubaron 500 µg de microsomas malignos 3, 5 min a 15°C, con 7.000 cpm de Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido preparado a partir de oviducto de gallina, como se describe en la Tabla 14. Se ensayó el efecto del agregado de kojibiosa 1mM.

Los trabajos de Singh (343) en oviducto de gallina demostraron que la 5- $\alpha$ -carboximetil-lactalbúmina puede actuar como aceptor exógeno del oligosacárido, aumentando el grado de transferencia.

Se diseñó , en tal sentido, un experimento en el cual se

incubaron 500 µg de microsomas 2 durante 1 h a 15°C con 7.000 cpm de Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido en las condiciones especificadas en la leyenda de la Tabla 14. Se realizó un ensayo control y otro con añadido de 125 µg de 5-α-carboximetil-lactalbúmina preparada según se describe en II.5. Se procedió como en los casos anteriores y se determinó la radiactividad presente en la fracción insoluble en TCA caliente. Se obtuvieron 55 y 43 cpm para los sistemas adicionado o no con el aceptor exógeno respectivamente.

La transferencia alcanzada en estos ensayos es escasa, lo que no permite sacar conclusiones. El bajo grado de transferencia obtenido puede deberse al mayor tiempo de incubación (1 h) lo que posibilitaría una mayor acción de las glucosidasas, ya que no se añadió kojibiosa al medio de incubación.

#### III.A.2.4.2.b.

Transferencia de Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de incubaciones de microsomas de oviducto con nucleótido-azúcares radiactivos

Como el rendimiento logrado en la preparación de Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido

a partir de cortes de oviducto fue bajo, se intentó la preparación del mismo incubando microsomas aislados de oviducto de gallina con nucleótido azúcares radiactivos, de acuerdo a lo propuesto por Singh y col. (343).

Los trabajos de Lucas y col. (211) describen la preparación de fracciones microsomales "lavadas" a las que finalmente se somete a una incubación a 37°C durante 15 min.

En tal sentido, preparamos microsomas "lavados" (ver II.2.A.2.b.) a los que se sometió o no a la incubación descripta.

Ambas fracciones microsomas tuvieron una concentración proteica de 60 mg/ml.

Se decidió comparar la actividad transferente de los microsomas "incubados" o "sin incubar" (II.2.A.2.b.) con el objeto de determinar cuál de ellos convenía utilizar en la preparación del lípido-oligosacárido.

Se incubaron los microsomas aislados de oviducto con UDP-<sup>3</sup>H-Glc y se procesaron los incubados según II.2.A.4. Se determinó la radiactividad presente en las diferentes fracciones, lo que se presenta en la Tabla 18.

Se observa que con los microsomas "sin incubar" 9% de la radiactividad se transfiere al extracto C/M/A 10:10:3, mientras que sólo el 3,4% lo hace con los microsomas "incubados". En contraste, la preparación "incubada" parece ser más efectiva para transferir el azúcar a la fracción proteica. Como los microsomas se iban a utilizar para preparar Dol-PP-oli

gosacárido, presente en el extracto C/M/A 10:10:3, se eligió emplear microsomas "no incubados".

Fracción	Microsomas incubados		Microsomas sin incubar	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fase inferior	193.067	18,0	170.867	16,9
Fase superior	698.817	65,1	553.150	54,6
Lavados FST	142.230	13,2	187.933	18,6
C/M/A 10:10:3	36.933	3,4	90.933	9,0
TCA soluble	1.600	0,1	9.900	0,9
Insoluble TCA Ø	583	0,05	250	0,02

TABLA 18: Actividad transferente de microsomas de oviducto de gallina.

Se incubaron 300 µg de proteína microsomal "incubada" o "sin incubar", 5 min a 37°C, con  $2,9 \times 10^5$  cpm de UDP-<sup>3</sup>H-Glc en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,5; 14 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM EDTA; 40 mM 2-S-etanol; 2,5 µg de Dol-P de hígado porcino y 0,2% de Triton X-100. FST: fase superior teórica.

Se efectuaron varios ensayos tendientes a encontrar las condiciones de incubación más apropiadas para lograr una máxima transferencia de radiactividad al Dol-PP-oligosacárido.

Se tuvo en cuenta el medio de incubación propuesto por Singh y col. (343) y el utilizado en los ensayos de transferencia descritos en la Tabla 14.

En la Tabla 19 se muestra el efecto de las diferentes condiciones de incubación sobre la incorporación de radiactividad a las distintas fracciones producto del procesamiento descrito en II.2.A.4.

Condiciones	Fase inferior		Fase superior		Lavados .EST		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø		
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%	
A	1	23.033	32,7	24.194	34,3	21.480	30,5	1.089	1,5	674	0,9
	2	19.889	30,8	15.250	23,6	27.771	43,0	889	1,4	824	1,3
	3	183.137	31,4	223.464	37,9	172.647	29,3	11.578	1,9	9.411	1,6
B	1	13.679	17,6	27.970	36,0	34.897	50,0	978	1,3	93	0,1
	2	11.608	15,8	27.180	36,7	33.166	45,2	1.667	2,3	87	0,1
Extracto C/M 3:2											
C	1	68.711		70,5	23.344	25,0	4.444	4,6			
	2	68.533		63,9	32.647	30,4	6.078	5,7			

TABLA 19: Condiciones para la incorporación del azúcar desde nucleótido azúcares al Dol-PP-oligosacárido presente en el extracto C/M/A 10:10:3.

Se incubaron 0,9 mg de proteína microsomal "sin incubar" aislada de oviducto de gallina, a 37°C con nucleótido azúcares radiactivos en las condiciones que se indican a continuación

A: Se incubó durante 30 min en presencia de  $MnCl_2$  8 mM y UDP-GlcNAc 3 mM, con (1) o sin (2) kojibiosalM, con  $2,5 \times 10^4$  cpm de GDP- $^3H$ -Man y  $1,4 \times 10^4$  cpm de UDP- $^3H$ -Glc; o sin kojibiosa con los mismos nucleótido azúcares pero en concentración 10 veces mayor.

B: Se incubó durante 10 min con  $2,5 \times 10^6$  cpm de GDP- $^3H$ -Man y  $5 \times 10^6$  cpm de UDP- $^3H$ -Glc, en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,5;  $MgCl_2$  6 mM;  $MnCl_2$  8 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM y Triton X-100 0,2%\*. Se ensaya la influencia del agregado (1) o no (2) de UDP-GlcNAc 3 mM.. \*:+ Dol-P 2,5 µg

C: Se incubó durante 5 min con  $1 \times 10^5$  cpm de UDP- $^3H$ -Glc en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,5;  $MgCl_2$  6 mM;  $MnCl_2$  8 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM y 4 µg de Dol-P de hígado porcino. Se ensaya el efecto del agregado de Triton X-100 0,5% (1) o 0,1% (2).

FST: fase superior teórica.

La presencia de kojibiosa no incrementa la incorporación de radiactividad al extracto C/M/A 10:10:3. Es probable que en la preparación de microsomas "lavados" se elimine, aunque sea en parte, la actividad de glucosidasas (211,342), lo que haría que el efecto del inhibidor no fuera apreciable.

El agregado de UDP-GlcNAc al medio de incubación está basado en los trabajos del grupo de Lucas (343,344). Sin embargo, en nuestro sistema su añadido no demostró ser ventajoso.

Luego de optimizar el sistema se ensayó la reacción de transferencia bajo las siguientes condiciones: se incubaron 0,9 mg de proteína de microsomas de oviducto "lavados" "sin incubar", 5 min a 37°C, con  $3 \times 10^5$  cpm de UDP-<sup>3</sup>H-Glc en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; MnCl<sub>2</sub> 8 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM; 4 µg de Dol-P y Triton X-100 1 %.

Se obtuvieron 17.000 cpm en el extracto C/M/A 10:10:3.

Se realizó una cromatografía sobre columnas de DEAE-celulosa (II.9.3.) del extracto obteniéndose el perfil que se presenta en la Figura 40.

Se reunieron las fracciones 28 a 46 y se eliminaron las sales (II.2.A.4.) utilizándose el material en un experimento de transferencia a aceptores proteicos que se describe en la Tabla 20.

Puede apreciarse que en el tejido tumoral hay mayor transferencia de radiactividad a la fracción proteica que en el tejido peritumoral aislado de la misma paciente, considera-

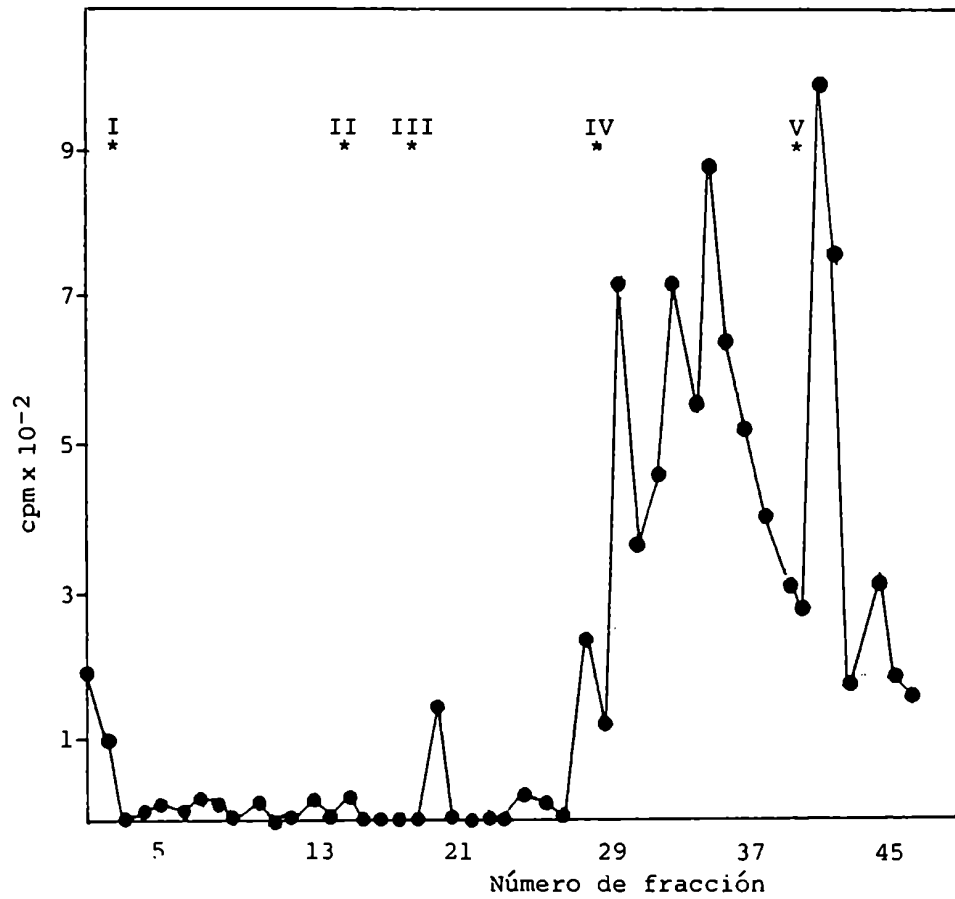


FIGURA 40: Cromatografía de intercambio iónico del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 proveniente de incubaciones de microsomas de oviducto con UDP-<sup>3</sup>H-Glc.

Se procede de acuerdo a lo descrito en el texto.  
 Pasos de elución: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3;  
 IV: 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM.

do normal.

El grado de transferencia del lípido-oligosacárido a proteínas aceptoras endógenas resultó menor que el alcanzado en los experimentos descritos en III.A.2.4.2.a.



Fracción	Normal		Maligno	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fase inferior	706	15,0	683	17,7
Fase superior	877	18,7	628	16,3
Lavados FST	500	10,6	237	6,1
C/M/A 10:10:3	2.148	45,7	2.071	53,6
TCA soluble	303	6,4	174	4,5
Insoluble TCA Ø	166	3,5	240	5,5

TABLA 20: Transferencia del Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido preparado a partir de microsomas de oviducto de gallina a proteínas mamarias endógenas.

Se incubaron 350 µg de proteína microsomal maligna o normal, 5 min a 15°C, en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,7; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; MnCl<sub>2</sub> 8 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM y 0,2 % de Triton X-100.

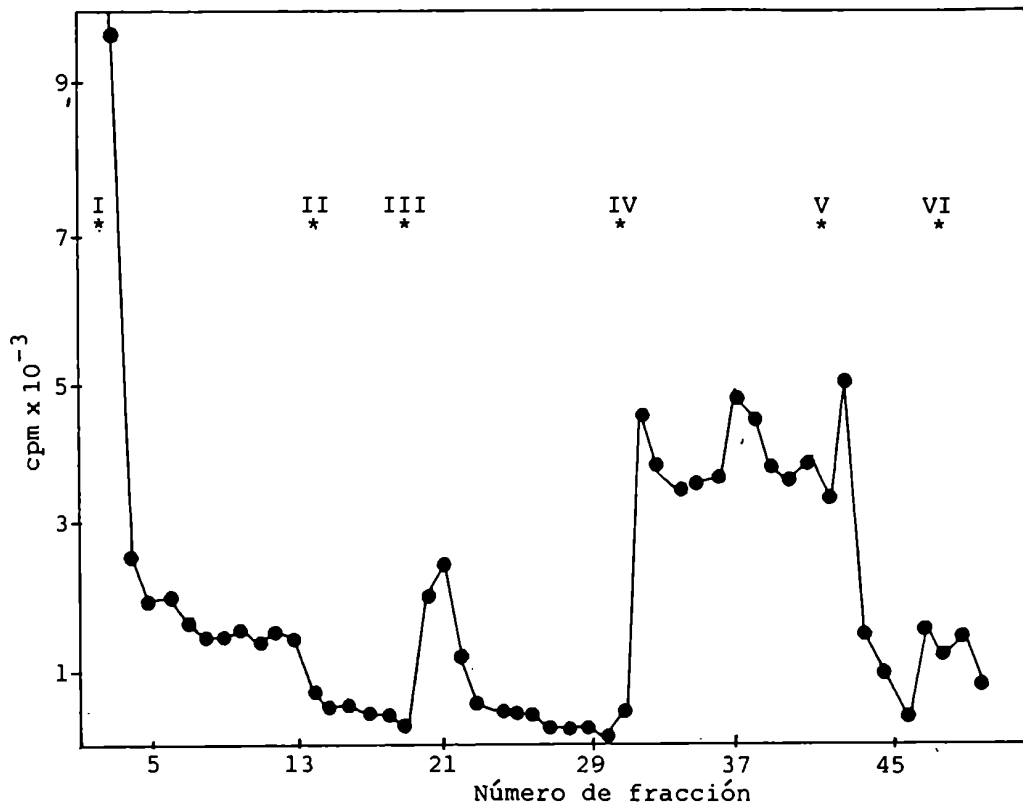
#### III.A.2.4.2.c.

Transferencia de Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de incubaciones de cortes de tiroides bovina con <sup>14</sup>C-Glc

A pesar de los esfuerzos realizados, el rendimiento de la preparación de Dol-PP-oligosacárido a partir de incubaciones de cortes o microsomas de gallina, fue escaso. En consecuencia se decidió intentar la preparación del lípido-oligosacárido incubando cortes

de tiroides bovina con  $^{14}\text{C}$ -Glc, basándonos en los trabajos de Staneloni y Leloir (345).

Se partió de 4 g de tiroides y se realizó una preparación similar a la descrita para oviducto de gallina (ver II. 4.) pero utilizando como buffer de resuspensión Tris-acetato 150 mM pH 7,4 y  $\text{MgCl}_2$  4 mM. Se obtuvieron 300.000 cpm en el extracto C/M/A 10:10:3, al que se le efectuó una cromatografía de intercambio iónico cuyo perfil se muestra en la Figura 41.



**FIGURA 41:** Cromatografía de intercambio iónico del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 proveniente de incubaciones de cortes de tiroides bovina.

Se preparó el lípido-oligosacárido como se describe en el texto. Pasos de elución: I: C/M 3:2; II: C/M 1:1; III: C/M/A 10:10:3; IV: 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3; V: idem 25 mM; VI: idem 250 mM.

Se reunieron las fracciones 31 a 47 (52.000 cpm) y se evaporaron reiteradamente para eliminar el formiato de amonio.

Se redisolvió en C/M/A 10:10:3. Se sometió una alícuota del material a hidrólisis a pH 2 (II.7.) y se efectuó una cromatografía sobre papel (II.9.1.) de los productos hidrosolubles.

El cromatograma resultante se presenta en la Figura 42.

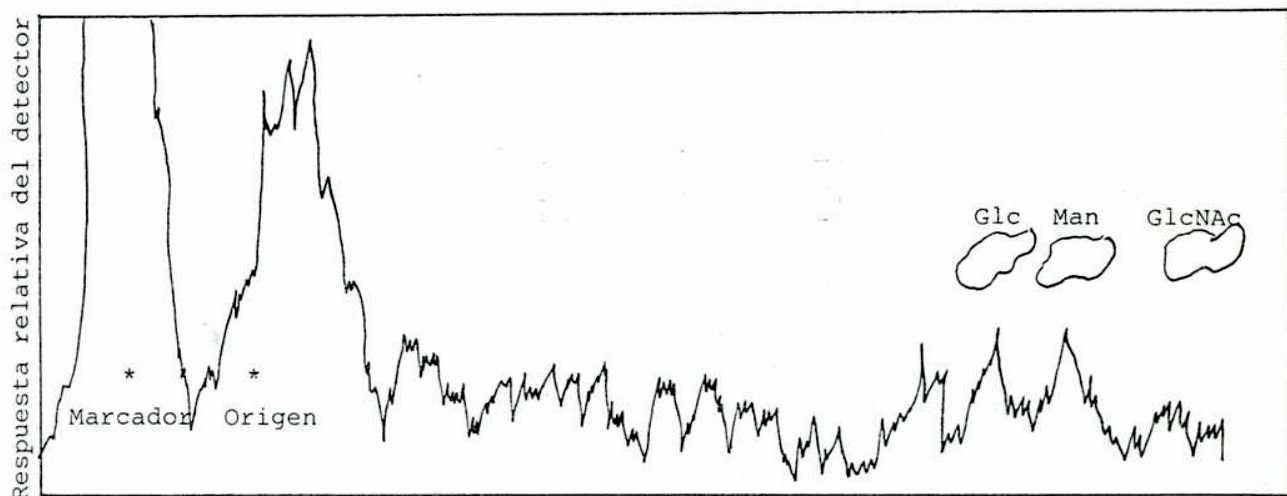


FIGURA 42: Cromatografía sobre papel de los productos hidrosolubles originados en la hidrólisis ácida suave del lípido-oligosacárido previamente purificado por columna de intercambio iónico.

Se cromatografió, en forma descendente, durante 18h con el solvente B, los productos liberados por hidrólisis del material lípidico cargado eluido de la columna de DEAE-celulosa descripta en la Figura 41.

Se observa un pico radiactivo cuyo rango de  $R_{Glc}$  (0,015-0,074) es compatible con el de un oligosacárido de gran tamaño (12-14 unidades).

Se utilizó el Dol-PP-oligosacárido eluído de la columna descripta en la Figura 41 en un ensayo de transferencia a proteínas. Para ello se incubaron microsomas "lavados" "sin incubar" malignos y normales (peritumorales), en presencia o no de kojibiosa. Los resultados se ilustran en la Tabla 21.

Fracción	Maligno + kojibiosa		Maligno		Normal	
	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%	cpm/ mg prot.	%
Fases inferior + superior	14.600	53,4	14.094	54,8	15.577	50,5
C/M/A 10:10:3	7.886	20,0	6.987	26,8	13.142	42,6
Insoluble TCA Ø	4.648	17,0	4.471	18,4	2.122	6,9

TABLA 21: Transferencia de  $^{14}\text{C}$ -oligosacárido en tejidos mamarios maligno y normal. Efecto de la kojibiosa.

Se incubaron 350 µg de microsomas "lavados" "sin incubar", malignos o normales (peritumorales), 10 min a 15°C, con 10.000 cpm de Dol-PP- $^{14}\text{C}$ -oligosacárido de tiroides bovina, en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 8 mM; MnCl<sub>2</sub> 8 mM; EDTA 2 mM; 2-S-etanol 40 mM y 0,2% de Triton X-100. Se ensayó el agregado o no de kojibiosa 1 mM.

Inesperadamente, la kojibiosa no incrementa la radiactividad asociada a la fracción insoluble en TCA caliente. Una explicación para este hallazgo es el hecho de que gran parte de la actividad de glucosidasa I se haya perdido en los procedimientos de preparación de microsomas "lavados".

Por otro lado, se observan diferencias entre ambos teji-

dos. En ausencia de kojibiosa las preparaciones malignas muestran mayor radiactividad asociada a la fracción resistente al tratamiento ácido (cerca de 3 veces) que su contraparte normal. Concomitantemente, la marca remanente en el extracto C/M/A 10:10:3 es menor. Estos hallazgos, junto con la similar cantidad de productos de degradación presentas en las fases superior e inferior, permiten concluir que la reacción de transferencia es más eficiente en las muestras malignas que en las normales.

### III.B. ESTUDIOS SOBRE LINEAS CELULARES DERIVADAS DE CANCER MAMARIO HUMANO

Los estudios descriptos en III.A. nos permitieron demostrar la participación del ciclo del Dol en tejido mamario humano. El siguiente punto de interés fue el conocimiento de la posible regulación hormonal de dicho camino metabólico.

En tal sentido, y de acuerdo a lo ya comentado en la Introducción (I.2.3.; I.2.5.), se decidió continuar los estudios en líneas celulares derivadas de cáncer mamario humano.

Se utilizaron como modelo de trabajo las líneas T47D y MCF-7, establecidas por Keydar y col. (269) y Soule y col. (268), respectivamente.

### III.B.1. ESTUDIOS SOBRE LA LINEA CELULAR T47D

En los experimentos descriptos a continuación se utilizaron las condiciones de incubación detalladas en II.2.B.4. El procesamiento de los incubados se realizó según II.2.B.5.

Si no se aclara lo contrario, la concentración de  $E_2$  usada en el curso de los experimentos es de  $10^{-9}$  M. La de Naf y Tam  $10^{-6}$  M.

En cada ensayo se aclara el período en que las células fueron cultivadas en medio libre de esteroides (tiempo de ayuno) (ver II.6.) o el medio definido empleado (II.2.B.1.) y, si las hubiera, las modificaciones con respecto al método general descripto (II.2.B.4. y II.2.B.5.).

#### III.B.1.1. INCORPORACION DE $^{14}C$ -GLC A FRACCIONES LIPIDICAS Y GLICOPROTEINAS EN CELULAS T47D-cll. CARACTERIZACION PRIMARIA DE LOS LIPIDO-AZUCARES FORMADOS. EFECTO DE $E_2$ Y NAF

En la Tabla 22 se observa que al incubar las células con  $^{14}C$ -Glc se obtiene incorporación de radiactividad a la fase inferior de la partición de Folch. Dicha incorporación no se ve afectada por el agregado

al medio de cultivo de  $E_2$ , pero es inhibida en un 20 % cuando se añade Naf.

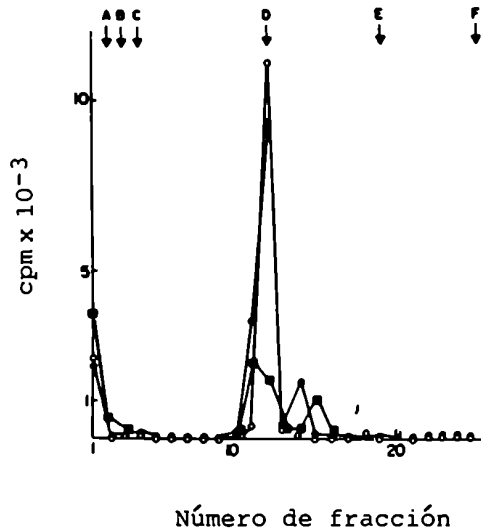
Condiciones	Radiactividad (cpm)*	
	Fase Inferior	C/M/A 10:10:3
Control	15.494 ± 319	52 ± 12
Estradiol	15.685 ± 490	38 ± 2
Nafoxidina	12.418 ± 757	35 ± 12

TABLA 22: Incorporación de  $^{14}C$ -Glc a fracciones lipídicas. Efecto de  $E_2$  y Naf.

, Las células se sometieron a un ayuno de 24h. Se incubaron en macrowells, en un volumen de 0,5ml con 10  $\mu$ Ci de  $^{14}C$ -Glc, durante 3h. Los incubados se procesaron según II.2.B.5.a. \*: Media ± ES; n=2.

Con el objeto de iniciar la caracterización del producto presente en la fase inferior, se tomó una de cada muestra duplicada, se evaporó bajo nitrógeno y se la sembró, disuelta en C/M 3:2 en una columna de DEAE-celulosa. Este procedimiento se realizó con tres columnas paralelas, una para la muestra control y otras dos para los cultivos realizados en presencia de  $E_2$  y Naf. La cromatografía se llevó a cabo según lo descrito en II.9.3. En la Figura 43 se presentan los resultados obtenidos. La mayor parte de la radiactividad fue retenida por la columna y eluyo de ésta con 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3. Esta conducta cromatográfica es caracterís-

tica de los lípido-monofosfato-azúcares (294).



**FIGURA 43:** Cromatografía de intercambio iónico de los glicolípidos de células T47D.

Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 250 mM. Se grafica radiactividad correspondiente a la muestra control (o) y tratadas con E<sub>2</sub> (●) o Naf (■).

En la Tabla 23 se aprecia el porcentaje de radiactividad total presente en cada fracción. Los resultados obtenidos son similares para las muestras control y tratada con E<sub>2</sub>: alrededor del 80 % del material radiactivo eluye con formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3. Sin embargo, en la muestra correspondiente a cultivos en presencia del estrógeno, se observa mayor proporción de un compuesto que es eluido con C/M/A 10:10:3.

Con respecto a las incubaciones con Naf, es mayor la proporción de lípidos neutros, eluidos con C/M 3:2, y la separación cromatográfica es mucho menos neta.



Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	2.528	16,4	2.352	12,4	3.878	31,5
B	0	-	6	-	646	5,2
C	121	0,8	484	2,6	1.524	12,4
D	12.525	81,1	15.824	83,5	6.038	49,0
E	270	1,7	281	1,5	226	1,8
F	0	-	30	0,1	1	-

TABLA 23: Distribución de la radiactividad en las distintas fracciones de la columna de intercambio iónico.

Se determinó la radiactividad correspondiente a cada fracción de elución de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 43 y se calculó el porcentaje que representaba de la radiactividad total eluída.

Con el objeto de continuar la caracterización de los intermediarios lipídicos, se realizó otro ensayo incrementando el número de células incubadas y la cantidad de azúcar radiactivo. En la Tabla 24 se muestra la incorporación de radiactividad obtenida en cada fracción.

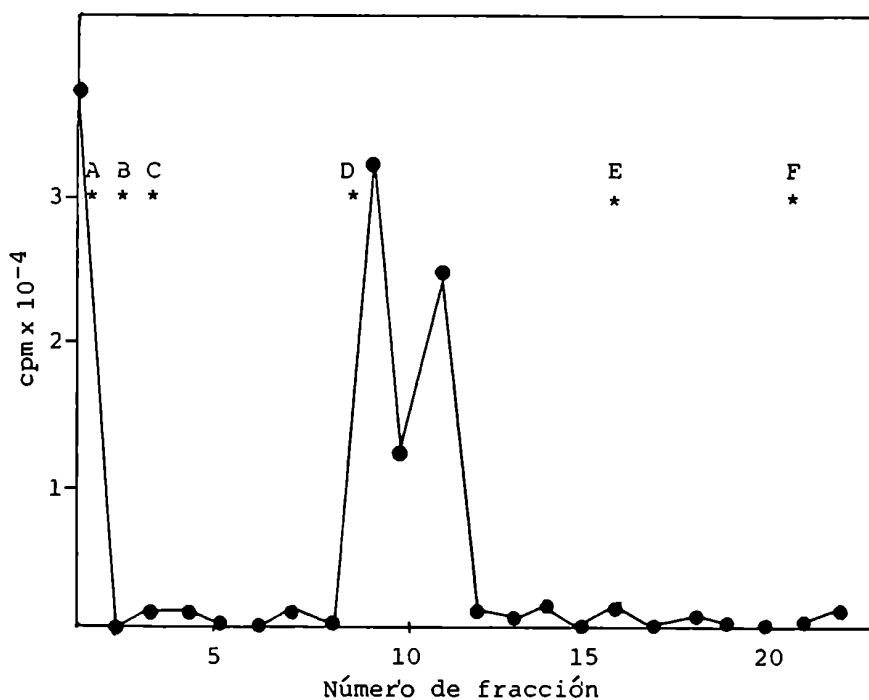
Condiciones	Radiactividad (cpm)		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Control	171.000	28.710	88.584
Estradiol	175.500	19.050	77.377
Nafoxidina	121.770	23.880	56.152

TABLA 24: Efecto de E<sub>2</sub> y Naf sobre la incorporación de <sup>14</sup>C-Glc a fracciones lipídicas y proteínas.

Se incubó las células plaqueadas en caja de Petri de 60 mm de diámetro con 40 µCi de <sup>14</sup>C-Glc. Se determinó el número de células que resultó ser de 7,5 x 10<sup>5</sup> por caja de Petri.

Los resultados alcanzados con respecto a la incorporación a fase inferior son concordantes con los expuestos en la Tabla 23: el  $E_2$  no la modifica mientras que la Naf provoca una inhibición del 30 % en dicha incorporación. En presencia de este antiestrógeno se observa una reducción de la radiactividad presente en las fracciones resistente al TCA caliente y soluble en C/M/A 10:10:3, del 37 y 17 % respectivamente. Resulta inesperada la menor transferencia de radiactividad a estas dos fracciones mencionadas en presencia de  $E_2$ .

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico de la fase inferior proveniente de incubaciones en presencia de Naf. En la Figura 44 se exhibe el cromatograma correspondiente.



**FIGURA 44:** Cromatografía sobre DEAE-celulosa de los glicolípidos presentes en fase inferior

Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 5 mM formiato de amonio en C/MA 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 250 mM. El material corresponde a cultivos con Naf.

Alrededor del 60% de la radiactividad eluyó con 5 mM formiato de amonio en C/M/A 10:10:3 y se observó, en forma similar a lo hallado en el cromatograma descrito en la Figura 43, lípido-azúcares que eluyen con el solvente C/M/A 10:10:3.

Se realizó una cromatografía sobre capa delgada (II.9.2.) del material proveniente de cultivos celulares eluido de una columna de DEAE-celulosa con formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3. Se utilizó el solvente F, que tiene la capacidad de separar en este tipo de placas, Dol-P-Man de Dol-P-Glc (312). La Figura 45 exhibe el perfil cromatográfico resultante.

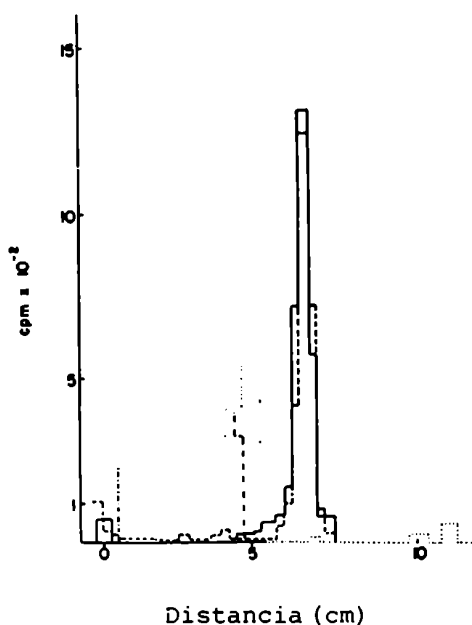


FIGURA 45: Cromatografía sobre capa delgada del glicolípido purificado por columna de intercambio iónico.

Material eluido de columna de DEAE-celulosa con formiato de amonio 5 mM en C/M/A 10:10:3, proveniente de cultivos controles, se cromatografía sobre capa delgada con solvente F. ---: lípido  $^{14}\text{C}$ -glicosilado de células T47D-cl1; —: Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de tumor mamario humano; ...: Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Man de tumor mamario humano; ----:  $^{14}\text{C}$ -Glc.

El compuesto proveniente de las células T47D-cl1 migró con un  $R_f$  idéntico (0,42) que Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de tumor mamario, previamente caracterizado (III.A.2.2.1.), mientras que el pa-

trón de mama Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Man (III.A.2.1.1.) lo hizo con  $R_f = 0,31$ .

Estos resultados cromatográficos indicarían que una proporción considerable de la radiactividad extraída en la fase inferior de la partición de Folch corresponde a poliprenil-monofosfato- $^{14}\text{C}$ -Glc. Sin embargo, no puede descartarse que otros derivados lípido-azúcares se formen en menor grado.

III.B.1.2. EFEECTO DE  $E_2$ , NAF Y TAM SOBRE LA INCORPORACION DE  $^{14}\text{C}$ -GLC A FRACCIONES LIPIDICAS Y GLICOPROTEINAS EN CELULAS T47D-cl1

Se repitió el esquema de trabajo empleado en III.B.1.1., incorporándose a los estudios otro antiestrógeno no esteroideo: el Tam.

En la Tabla 25 no se evidencian efectos del  $E_2$  sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a la fase inferior, pero se encontró una significativa disminución de la misma en presencia de Naf (45 %) y Tam (60 %).

Con respecto a la incorporación del azúcar radiactivo al extracto C/M/A 10:10:3, su reducción se estimó en 37 y 70 % para cultivos desarrollados en presencia de Naf y Tam, respectivamente, mientras que la formación de glicoproteínas presentó un decrecimiento similar con ambos antagonistas (70 %).

Debe notarse que el  $E_2$  reduce (29 %) la incorporación del

azúcar a las proteínas endógenas.

Fracción	Radiactividad (cpm)*		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Control	4.778 ± 343	94 ± 11	931 ± 159
Estradiol	4.836 ± 242	100 ± 28	663 ± 64
Nafoxidina	2.606 ± 388 <sup>b</sup>	60 ± 15	243 ± 34 <sup>b</sup>
Tamoxifeno	1.948 ± 286 <sup>a</sup>	28 ± 5 <sup>a</sup>	277 ± 39 <sup>b</sup>

TABLA 25: Efecto de E<sub>2</sub>, Naf y Tam sobre la incorporación de <sup>14</sup>C-Glc a fracciones lipídicas y glicoproteínas.

Las células, plaqueadas en macrowells, fueron sometidas a 6 días de ayuno de esteroides. Se incubaron con 2 µCi de <sup>14</sup>C-Glc. Los incubados se procesaron de acuerdo a II.2.B. S.a. \*: Media ± ES, n=3; <sup>a</sup>: p< 0,01; <sup>b</sup>: p< 0,02.

### III.B.1.3. ENSAYOS DE DOSIS-RESPUESTA DE E<sub>2</sub> Y NAF SOBRE LA INCOR- PORACION DE <sup>14</sup>C-GLC EN CE- LULAS T47D-cl1

Ante la falta de respuesta al estrógeno, se decidió incubar las células en presencia de concentraciones mayores de E<sub>2</sub>.

En la Tabla 26 se observa que el E<sub>2</sub> 10<sup>-11</sup> M no produce modificaciones en la síntesis de lípido-azúcares presentes en la fase infeior, pero que dicha síntesis disminuye al aumentar la concentración del estrógeno. Por su parte, la Naf 10<sup>-6</sup> M provoca una reducción del 40 % en la incorporación de

radiactividad a la fracción mencionada, efecto que disminuye al llevar la concentración a  $10^{-9}$  M.

La incorporación de radiactividad al extracto C/M/A 10:10:3 fue escasa, lo que no permite sacar conclusiones.

Condiciones	Radiactividad (cpm)*	
	Fase Inferior	C/M/A 10:10:3
Control	5.592 ± 1.643	39 ± 8
E <sub>2</sub> 10 <sup>-11</sup> M	5.629 ± 403	28 ± 1
E <sub>2</sub> 10 <sup>-9</sup> M	4.712 ± 562	36 ± 7
E <sub>2</sub> 10 <sup>-8</sup> M	3.751 ± 319	34 ± 10
E <sub>2</sub> 10 <sup>-6</sup> M	3.658 ± 181 <sup>a</sup>	32 ± 2
Naf 10 <sup>-9</sup> M	4.198 ± 554	24 ± 5
Naf 10 <sup>-6</sup> M	3.300 ± 293	18 ± 16

TABLA 26: Influencia de la concentración de E<sub>2</sub> y Naf sobre la incorporación de <sup>14</sup>C-Glc a fracciones lipídicas.

Las células plaqueadas en macrowells fueron sometidas a 5 días de ayuno. Se incubaron con 4 µCi de <sup>14</sup>C-Glc en un volumen de 500 µl. \*: Media ± ES, (n=2); <sup>a</sup>: p < 0,05 con respecto a E<sub>2</sub> 10<sup>-11</sup> M.

Se realizó un nuevo ensayo de dosis-respuesta que se presenta en la Tabla 27.

Puede comprobarse que el E<sub>2</sub> a altas concentraciones ejerce un efecto inhibitorio.

Con respecto a la Naf, al aumentar su concentración se

incrementa su acción inhibitoria, llegando a 35 % de reducción de la incorporación de radiactividad a fase inferior a una concentración de  $10^{-6}$  M.

Iguales conclusiones pueden extraerse con relación a la transferencia del azúcar al extracto C/M/A 10:10:3 y a la fracción glicoproteica.

Condiciones	Radiactividad (cpm/100 µg proteína)*		
	Fase Inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Control	16.064 ± 1.906	494 ± 24	3.779 ± 238
E <sub>2</sub> 10 <sup>-11</sup> M	15.454 ± 2.416	540 ± 25	3.886 ± 842
E <sub>2</sub> 10 <sup>-7</sup> M	10.220 ± 1.698	428 ± 24	2.193 ± 309 <sup>b</sup>
Naf 10 <sup>-9</sup> M	11.534 ± 1.163	462 ± 46	1.994 ± 115 <sup>b</sup>
Naf 10 <sup>-7</sup> M	11.044 ± 899	407 ± 102	
Naf 10 <sup>-6</sup> M	10.474 ± 48 <sup>c</sup>	301 ± 33	1.421 ± 123 <sup>a</sup>

TABLA 27: Efecto de la concentración de E<sub>2</sub> y Naf sobre la síntesis de poliprenil fosfato azúcares y glicoproteínas.

Luego de 3,5 días de ayuno, las células (78.500 ± 2.500, n=3) se incubaron con 3 µCi de <sup>14</sup>C-Glc. La concentración de proteínas se determinó por el método de Peterson (319) y resultó ser de 66,2 ± 3 ug/well (n=3). \*: Media ± ES (n=3); a: p < 0,01; b: p < 0,02; c: p < 0,05.

III.B.1.4. INFLUENCIA DEL E<sub>2</sub> LUEGO DEL  
TRATAMIENTO CON NAF Y TAM SO-  
BRE LA INCORPORACION DE  
<sup>14</sup>C-GLC EN CELULAS T47D-cl1

Dado que no encontramos efectos del  $E_2$  sobre las fracciones en estudio, decidimos preincubar las células con antiestrógenos con la intención de eliminar el posible  $E_2$  endógeno, remanente entre las células.

Luego de una hora de cultivo en presencia del antiestrógeno, éste se retira, reemplazando el medio por medio fresco adicionado de  $E_2$   $10^{-9}$  M. El esquema de trabajo se detalla en la Figura 46.

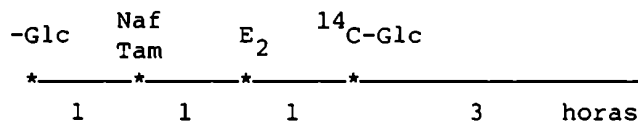


FIGURA 46: Pretratamiento de las células con antiestrógenos: esquema de trabajo.

En estos experimentos además del ensayo control deben considerarse otros dos grupos de controles. Así, las células cultivadas en presencia de Naf son la referencia para los cultivos pretratados con Naf y luego con  $E_2$ . Del mismo modo, las células expuestas a  $E_2$  luego de Tam deben compararse con los cultivos realizados en presencia de Tam.

En la Tabla 28 se evidencia que, nuevamente, el  $E_2$  solo no modifica la síntesis de lípido-azúcares y disminuye la formación de glicoproteínas endógenas. La Naf inhibe la incorporación del precursor radiactivo a los poliprenil azúcares pre



senten en la fase inferior y a las glicoproteínas (fracción insoluble en TCA caliente) en 35 y 42 % respectivamente, mientras que el Tam sólo decrece la formación de glicoproteínas.

Con respecto al corto protocolo de "rescate", observamos una clara diferencia entre ambos antiestrógenos. La adición de  $E_2$  a células pretratadas con Naf induce una reversión parcial del efecto inhibitorio en las tres fracciones estudiadas. En contraste, el  $E_2$  luego del pretratamiento con Tam produce una evidente disminución del material extraído en la fase inferior (37 %), en C/M/A 10:10:3 (25 %) e insoluble en TCA caliente (54 %).

Condiciones	Radiactividad (cpm)*		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Control	4.064 ± 442	121 ± 11	410 ± 21
Estradiol	3.671 ± 398	104 ± 21	266 ± 63
Nafoxidina	2.684 ± 125 <sup>a</sup>	112 ± 19	236 ± 18 <sup>c</sup>
Naf + $E_2$	3.031 ± 87	148 ± 20	287 ± 87
Tamoxifeno	3.616 ± 89	100 ± 10	240 ± 21 <sup>c</sup>
Tam + $E_2$	2.252 ± 172 <sup>b</sup>	75 ± 12	110 ± 18 <sup>d</sup>

**TABLA 28:** Influencia del pretratamiento con Naf y Tam sobre la posterior adición de  $E_2$  en células T47D-cl1 cultivadas en presencia de  $^{14}C$ -Glc.

Las células plaqueadas en macrowells se sometieron a 4 días de ayuno. Se incubaron con 4  $\mu$ Ci de  $^{14}C$ -Glc. \*: Media ± ES (n=3); a: p < 0,05 con respecto al control; b: p < 0,02 con respecto a Tam; c: p < 0,01 con respecto al control; d: p < 0,01 con respecto a Tam.

III.B.1.5. INCORPORACION DE <sup>3</sup>H-MAN, <sup>3</sup>H-GLCN Y <sup>14</sup>C-GLC EN CELULAS T47D c11 Y c8. EFECTO DE LA DEPRIVACION HORMONAL Y DEL TIEMPO DE INCUBACION

Las células T47D-c11 se incubaron con <sup>3</sup>H-Man o <sup>3</sup>H-GlcN, demostrándose incorporación de los azúcares radiactivos a las fracciones en estudio.

Debido a la falta de respuesta estrogénica encontrada hasta el momento, se cultivó las células en medio privado o no de esteroides, para investigar su presunta sensibilidad hormonal.

Azúcar	Tiempo incubación	Radiactividad (cpm)					
		Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
		Ayunadas	Sin ayunar	Ayunadas	Sin ayunar	Ayunadas	Sin ayunar
<sup>3</sup> H-GlcN	3 h	1.341	3.469	114	197	28.865	70.340
	5 h	1.853	3.254	84	216	42.575	103.290
<sup>3</sup> H-Man	3 h	2.252	2.838	35	35	20.740	40.550
	5 h	5.417	5.090	142	91	69.135	87.350

TABLA 29. Transferencia de <sup>3</sup>H-GlcN y <sup>3</sup>H-Man a lípido-azúcares y glicoproteínas. Efecto del tiempo de incubación y de la privación hormonal.

Las células se plaquearon en macrowells y se incubaron con 20 µCi de <sup>3</sup>H-Man o 15 µCi de <sup>3</sup>H-GlcN. Se compara la incorporación de radiactividad a células sometidas a 24 h de ayuno (Ayunadas) o sin ayunar.

En la Tabla 29 se aprecia que las células tienen dependencia hormonal. La incorporación de  $^3\text{H-GlcN}$  resulta más sensible a la deprivación esteroidea que la de  $^3\text{H-Man}$ , siendo ésta más dependiente del tiempo de incubación. Se evidencia mayor influencia de la deprivación a menores tiempos de incubación.

En otra serie de ensayos se analizó la incorporación de distintos azúcares radiactivos a fracciones lipídicas y proteicas, estudiando sobre la misma la influencia de la deprivación de esteroides y del tiempo de incubación. Los estudios se realizaron en forma paralela con células T47D clon 11 y clon 8.

Observando la Tabla 30 resulta evidente que la incorporación a células T47D-cl1 fue mucho mayor que a T47D-c8.

Con respecto a la influencia de la deprivación hormonal, los resultados obtenidos son compatibles con el hecho de que el clon 11 posee receptores hormonales mientras que el clon 8 carece de ellos (346). En T47D-cl1 se aprecia un neto efecto inhibitorio provocado por la supresión de esteroides, mientras que para T47D-c8 dicho efecto no es aparente.

En la Figura 47 puede apreciarse mejor que la incorporación de los tres azúcares presenta distinta sensibilidad a la carencia de esteroides, siendo la de  $^3\text{H-GlcN}$  la más afectada por el tratamiento del SFB con carbón.

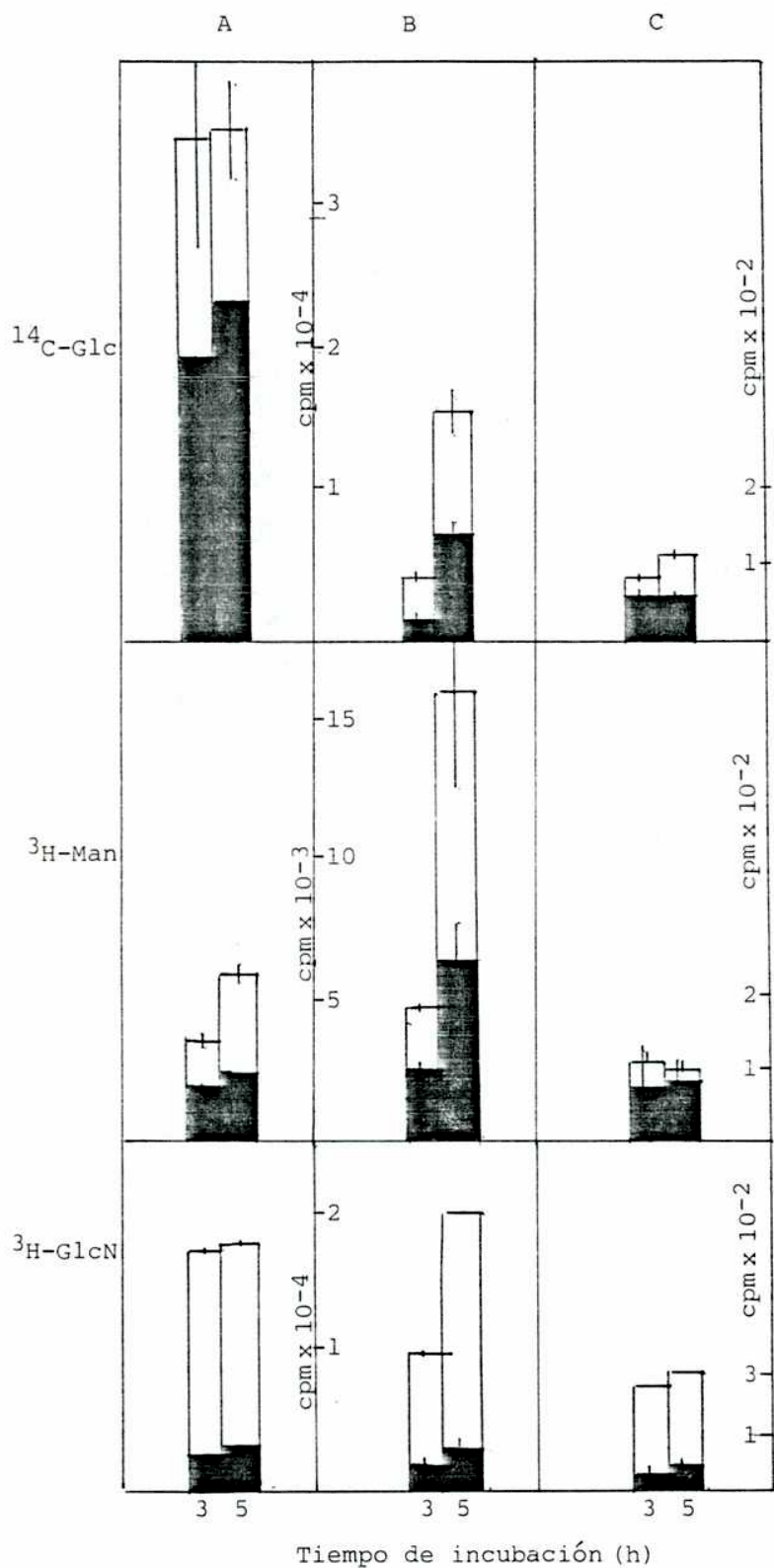
El efecto del período de incubación es más notable en cé

## Radiactividad (cpm)\*

Azúcar	Tiempo incubación	Fase inferior		C/M/A 10:10:3		Insoluble TCA Ø	
		Ayunadas	Sin ayunar	Ayunadas	Sin ayunar	Ayunadas	Sin ayunar
C l o n 11							
<sup>3</sup> H-Man	3 h	2.152 ± 100	3.454 ± 392	793 ± 552	1.080 ± 22	2.443 ± 181	4.718 <sup>a</sup> ± 57
	5 h	2.394 ± 196	5.806 <sup>b</sup> ± 386	793 ± 358	1.020 ± 90	6.182 ± 1.837	15.918 ± 6.118
<sup>14</sup> C-Glc	3 h	20.116 ± 261	35.768 ± 8.035	728 ± 69	935 ± 65	2.978 ± 397	4.164 ± 111
	5 h	24.171 <sup>c</sup> ± 287	36.118 ± 3.217	730 ± 195	1.175 ± 85	11.112 <sup>d</sup> ± 1.335	14.367 <sup>d</sup> ± 1.491
<sup>3</sup> H-GlcN	3 h	2.534 ± 27	17.162 <sup>a</sup> ± 856	50 ± 6	310	1.523 ± 153	10.173 <sup>a</sup> ± 562
	5 h	2.958 <sup>d</sup> ± 62	17.208 <sup>a</sup> ± 352	53 ± 16	340 <sup>a</sup> ± 1	2.920 ± 381	19.671
C l o n 8							
<sup>3</sup> H-Man	3 h	929 ± 130	1.418	395 ± 290	83 ± 8	314 ± 116	104 ± 22
	5 h	692 ± 33	1.252 ± 174	95 ± 48	40 ± 40	202 ± 26	101 <sup>b</sup> ± 19
<sup>14</sup> C-Glc	3 h	3.045	4.155 ± 440	131 ± 1	198 ± 39	312 ± 119	232 ± 14
	5 h	4.999	4.095 ± 685	149 ± 13	179 ± 8	284 ± 82	229 ± 13
<sup>3</sup> H-GlcN	3 h	898 ± 221	1.023	9 ± 9	86 ± 79	138 ± 11	132 ± 58
	5 h	949 ± 2	1.145 ± 98	10 ± 3	20 ± 20	176 ± 40	95 ± 21

**TABLA 30:** Incorporación de <sup>3</sup>H-Man, <sup>3</sup>H-GlcN y <sup>14</sup>C-Glc a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D-cl1 y c8. Efecto de la deprivación hormonal y del tiempo de incubación.

Se compara la incorporación de radiactividad a células sometidas a 60 h de ayuno (Ayunadas) o sin ayunar. \*: Media ± ES (n=2); <sup>a</sup>: p < 0,01 con respecto a células ayunadas; <sup>b</sup>: p < 0,02 con respecto a células ayunadas; <sup>c</sup>: p < 0,01 con respecto a 3 h de cultivo; <sup>d</sup>: p < 0,05 con respecto a 3 h de cultivo.



**FIGURA 47:** Efecto del tiempo de incubación y de la privación hormonal sobre la incorporación de azúcares a glicolípidos y glicoproteínas en células T47D, clon 11.

Las células se cultivaron durante 60 h con SFB libre de esteroides (●) o sin tratar (○), con  $15\ \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-Man}$ ,  $12\ \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-GlcN}$  o  $4\ \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C-Glc}$ . Panel A: incorporación a fase inferior; B: insoluble en TCA caliente; C: C/M/A 10:10:3.

lulas T47D-cl1 que en c8, fundamentalmente en cuanto a la incorporación de Man tritiada.

Conviene señalar que la fracción que denota mayor incremento al aumentar el tiempo de incubación es la resistente al TCA caliente. Esto es consistente con el hecho de que las glicoproteínas precisan mayor tiempo para su síntesis que los intermediarios que a ellas conducen.

III.B.1.6. INCORPORACION DE <sup>14</sup>C-GLC EN  
CELULAS T47D-cl1 CULTIVADAS  
EN MEDIO DEFINIDO I

Ante la posibilidad de que la falta de respuesta estrogénica pudiera deberse a una acción del E<sub>2</sub> remanente en el SFB luego del tratamiento del mismo con carbón (348), se decidió incubar las células en un medio definido libre de suero. Sobre la base de los trabajos del grupo de Sato (299,347) se diseñó el medio definido I, cuya composición se describe en II.2.B.4.

El suero también cumple la función de inhibidor de la tripsina (349) en las técnicas convencionales de cultivo. En consecuencia, como los procedimientos de subcultivo incluyen la tripsinización, el plaqueo de las células para realizar los ensayos se realizó en medio suplementado con suero. Luego de un día en dicho medio, se reemplaza el mismo por el medio definido a ensayar.

Se comparó la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a fracciones lipídicas y proteicas de células cultivadas en medio definido I o en el medio A, utilizado hasta el momento, que incluye suero. Los resultados se muestran en la Tabla 31.

	Medio definido I	Medio A
Número células/Petri	50.625 ± 1.875	128.750 ± 1.250
µg proteína/Petri	243 ± 18	762 ± 12
ng proteína/célula	5	6
<u>Incorporación a</u>		
<u>Fase inferior</u>		
cpm	19.859 ± 3.263	38.625 ± 136
cpm/10.000 células	3.923	3.000
cpm/mg proteína	81.724	50.689
<u>C/M/A 10:10:3</u>		
cpm	1.434 ± 296	1.665 ± 5
cpm/10.000 células	283	129
cpm/mg proteína	5.901	2.185
<u>Insoluble TCA Ø</u>		
cpm	10.430 ± 439	18.527 ± 3.073
cpm/10.000 células	2.062	1.439
cpm/mg proteína	42.959	24.313

TABLA 31: Comparación entre células T47D-cll cultivadas en medio definido I o medio suplementado con suero.

Las células se plaquearon en cajas de Petri de 35 mm en 2 ml de medio A. A los 2 días se pasan a medio definido I donde permanecen por 48 h. Otro grupo de células se cultivaron permanentemente en medio A. Las incubaciones se realizaron con 5 µCi de  $^{14}\text{C}$ -Glc, durante 5 h, por duplicado.

Se observa que si bien la incorporación a las tres fracciones resultó mayor en las células cultivadas en presencia de suero, cuando se normalizó dicha incorporación por número

de células o mg de proteína, las células cultivadas en medio definido resultaron más activas.

Se realizó un segundo ensayo en condiciones similares, cuyos resultados, mostrados en la Tabla 32 son semejantes a los alcanzados previamente.

	Medio definido I	Medio A
Número células/Petri	21.250	36.250
µg proteína/Petri	217 ± 23	
ng proteína/célula	10	
Incorporación a:		
<u>Fase inferior</u>		
cpm	12.920 ± 284	21.843 ± 1.125
cpm/10.000 células	6.080	6.026
cpm/mg proteína	59.539	
<u>C/M/A 10:10:3</u>		
cpm	1.794 ± 254	1.608 ± 365
cpm/10.000 células	844	443
cpm/mg proteína	8.267	
<u>Insoluble TCA Ø</u>		
cpm	9.356 ± 1.647	11.180 ± 961
cpm/10.000 células	4.403	3.084
cpm/mg proteína	43.115	

TABLA 32: Influencia del medio de cultivo sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D-cl1.

Las células se plaquearon en 2ml de medio A en cajas de Petri de 35 mm de diámetro. A las 48 h se pasan a medio definido I, donde se incuban por dos días. Se realiza un control con células cultivadas todo el tiempo en medio A. Se añadió a cada caja 5 µCi de  $^{14}\text{C}$ -Glc y se incubó durante 5 h, trabajándose por duplicado.

A pesar de que el crecimiento celular es más lento en medio definido I, las células cultivadas en dicho medio incorporan  $^{14}\text{C}$ -Glc más activamente que las cultivadas en medio A.



III.B.1.7. EFFECTO DE E<sub>2</sub>, NAF Y TAM  
SOBRE LA INCORPORACION DE  
<sup>3</sup>H-MAN EN CELULAS T47D-cl1  
Y T47D-c8 CULTIVADAS EN  
MEDIO DEFINIDO I

Se cultivaron células T47D, clones 8 y 11 en medio definido I y se estudió el efecto de estrógenos y antiestrógenos sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-Man a fracciones lipídicas y proteicas.

Condiciones	Radiactividad (cpm)		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
C l o n 11			
Control	5.545	4.345	673
Estradiol	5.523	4.339	461
Nafoxidina	4.403	1.417	298
Tamoxifeno	4.090	2.185	375
C l o n 8			
Control	616 ± 94	811 ± 112	167 ± 31
Estradiol	603 ± 88	691 ± 123	122 ± 11
Nafoxidina	799 ± 85	682 ± 172	169 ± 74
Tamoxifeno	622 ± 49	629 ± 78	115 ± 9

TABLA 33: Efecto de E<sub>2</sub>, Naf y Tam sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-Man a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D clon 11 y clon 8.

Las células se plaquearon en macrowells en medio A. A las 48 h se cambió el medio por medio definido I. A las 48 h se añadieron 15 µCi de <sup>3</sup>H-Man, incubándose durante 5 h en presencia o no de E<sub>2</sub>, Naf y Tam. En el clon 8 los resultados son promedio de duplicados ± ES.

En la Tabla 33 se aprecian los resultados obtenidos. En las incubaciones con el clon 11 dichos resultados son similares a los alcanzados cultivando las células en medio con suero tratado con carbón. Con respecto al clon 8, el añadido de  $E_2$  o de antiestrógenos no produce modificaciones en la incorporación del azúcar a las fracciones en estudio, resultado consistente con la falta de receptores hormonales reportados para este clon (346).

III.B.1.8. EFEECTO DE LA P SOBRE LA  
INCORPORACION DE AZUCARES  
RADIATIVOS EN CELULAS  
T47D-cl1

Se comparó la actividad transferente de  $^{14}C$ -GlcN en células T47D-cl1 sometidas o no al ayuno de esteroides. Cuando se las incubó con dicho azúcar en presencia de suero libre de esteroides, la incorporación de radiactividad a lípido-azúcares y glicoproteínas resultó menor con respecto a las células no ayunadas (ver Tabla 34).

La adición de P  $10^{-9}$  M revirtió dicha disminución en 22, 13 y 34 %, en fase inferior, extracto C/M/A 10:10:3 y fracción glicoproteica, respectivamente. Cuando se incrementó la concentración hormonal a  $10^{-7}$  M los porcentajes mencionados ascendieron a 35, 15 y 48 % respectivamente.

Por el contrario, la adición de  $E_2$   $10^{-10}$  M no produjo mo

dificaciones en la incorporación del azúcar a las fracciones en estudio.

Condiciones	Radiactividad (cpm/100 µg proteína) *		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Sin ayuno	41.323 ± 4.912	921 ± 114	36.520 ± 2.355
Ayuno	27.560 ± 1.262	462 ± 20 <sup>b</sup>	16.704 ± 3.630 <sup>b</sup>
Ayuno ± P 10 <sup>-9</sup> M	33.640 ± 4.980	524 ± 4	22.370 ± 3.570
Ayuno ± P 10 <sup>-7</sup> M	37.268 ± 1.468 <sup>a</sup>	530 ± 144	24.644 ± 1.130
Ayuno ± E <sub>2</sub> 10 <sup>-10</sup> M	26.808 ± 3.550	408 ± 18	17.724 ± 1.732

TABLA 34: Efecto de la P y E<sub>2</sub> sobre la incorporación de <sup>14</sup>C-GlcN a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D-cl1 sometidas a ayuno de esteroides.

Se plaquearon las células en macrowells en medio A. Se las sometió a 3 días de ayuno de esteroides o no. Se incubaron con 10 µCi de <sup>14</sup>C-GlcN durante 5 h. La concentración de proteínas resultó de 50 y 56 µg/well para células sometidas o no a ayuno respectivamente. \*: Media ± ES (n=2); a: p < 0,05 con respecto a control ayunado; b: p < 0,05 con respecto a control sin ayunar.

En otro ensayo se analizó la influencia de la concentración de P sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-GlcN a glicoproteínas y lípido-azúcares, en células cultivadas en medio definido II (ver II.2.B.4.). Los resultados se aprecian en la Tabla 35.

Al agregar la hormona se obtiene un aumento de la incorporación del azúcar a la fase inferior y a la fracción insoluble en TCA caliente. El efecto máximo se observa a una concentración de P de 10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup> M, y es de alrededor del 50 y del 20 %, para los lípido-azúcares y las glicoproteínas, respectivamente.

Condiciones	Radiactividad (cpm/mg proteína)*		
	Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø
Control	1.909 ± 89	108 ± 23	7.402 ± 479
P 10 <sup>-9</sup> M	2.053 ± 274	92 ± 5	9.614 ± 738
P 10 <sup>-8</sup> M	2.845 ± 238 <sup>b</sup>	107 ± 9	9.313 ± 743
P 10 <sup>-7</sup> M	2.815 ± 219 <sup>b</sup>	105 ± 29	9.972 ± 818 <sup>a</sup>
P 10 <sup>-6</sup> M	2.243 ± 199	135 ± 57	8.398

**TABLA 35:** Efecto de la concentración de P sobre la incorporación de <sup>3</sup>H-GlcN a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D-cl1 incubadas en medio definido II.

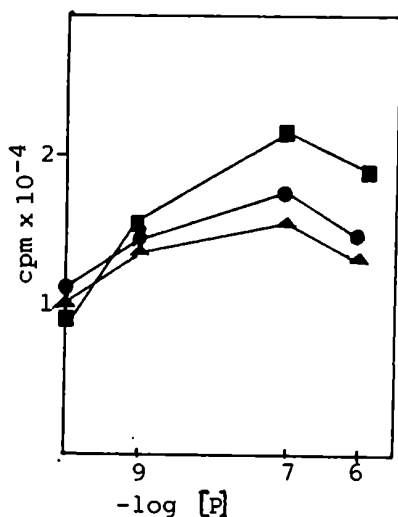
Se plaquearon las células en cápsulas de Petri de 35 mm en medio A. A las 24 h se cambia el medio por medio definido II. Luego de 3 días se realiza el ensayo, reemplazando el medio por MEM más 1 mg/ml de albúmina sérica bovina y 0,1 g/ml de Glc. A la hora se añade la P y 2 h después 3 µCi de <sup>3</sup>H-GlcN incubándose por 5 h más. Se determinó el número de células (89.500 ± 15.500/Petri) y la cantidad de proteínas (562,5 µg/Petri).  
\*: Media ± ES (n=3); a y b: p < 0,02 y p < 0,05 con respecto al control.

En las condiciones empleadas, la radiactividad incorporada al extracto C/M/A 10:10:3 fue muy escasa, por lo que se decidió repetir el ensayo aumentando la cantidad de azúcar radiactivo. En la Figura 48 se muestran los resultados obtenidos.

En las tres fracciones estudiadas la incorporación fue sensible al añadido de P. La respuesta máxima se alcanzó con una concentración hormonal de 10<sup>-7</sup> M y el incremento fue del 58 y el 51 % para la transferencia del azúcar a fase inferior y a la fracción insoluble en TCA caliente, respectivamente.

Con respecto al extracto C/M/A 10:10:3 se obtuvo una alta incorporación, que en presencia de P 10<sup>-7</sup> M se incrementó

en más de dos veces.



**FIGURA 48:** Efecto de la concentración de P sobre la incorporación de  $^3\text{H-GlcN}$  a lípido-azúcares y glicoproteínas en células T47D-cll cultivadas en medio definido II.

Se procedió como se ha descrito en la leyenda de la Tabla 35. Se incubó las células con  $15\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H-GlcN}$ . El número de células por cápsula de Petri fue de  $138.229 \pm 104$  ( $n=2$ ).

● : fase inferior; ■ : C/M/A 10:10:3; ▲ : insoluble TCA caliente.

Por último, se decidió estudiar el efecto de la P sobre células incubadas con  $^{14}\text{C-Glc}$  en su presencia, durante distintos períodos de tiempo.

En la Tabla 36 se aprecia que la hormona produce un incremento de la incorporación a fase inferior de 35, 39 y 21 % a las 1, 3 y 5 horas de incubación, respectivamente.

Con respecto al extracto C/M/A 10:10:3, la estimulación disminuye con el transcurso del tiempo, siendo del 57 % a la hora, del 9 % a las tres horas, mientras que a las 5 horas provoca una disminución del 42 %.

En cuanto a la formación de glicoproteínas, no se ve afectada por el añadido de P.

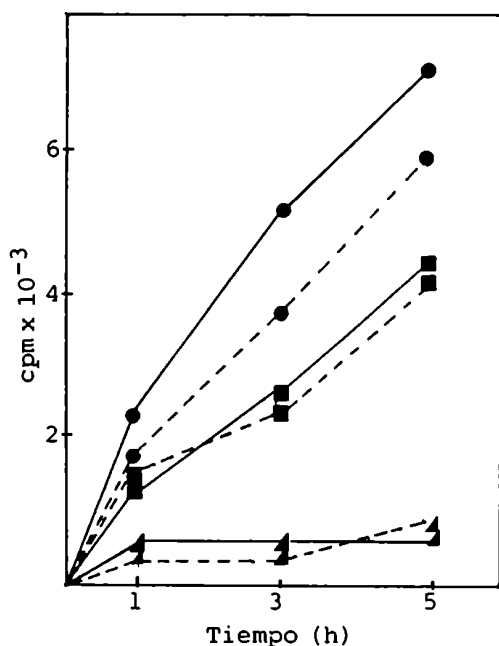
La incorporación a las 3 fracciones se incrementa al ha-

cerlo el tiempo, como se ilustra en la Figura 49.

Tiempo	Condiciones	Radiactividad (cpm/100 µg proteína)*			
		Fase inferior	C/M/A 10:10:3	Insoluble TCA Ø	
1 h	Control	1.769 ± 246	288 ± 15	1.587 ± 200	
	P	2.378 ± 396	452 ± 70	1.380 ± 170	
3 h	Control	3.774 ± 246	429 ± 10	2.452 ± 102	
	P	5.213 ± 1.497	469 ± 24	2.722 ± 752	
5 h	Control	5.954 ± 131	827 ± 117	4.312 ± 759	
	P	7.216 ± 199a	582 ± 82	4.359 ± 291	

**TABLA 36:** Influencia del tiempo de incubación sobre el efecto de la P en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a lípidos-azúcares y glicoproteínas.

Se plaquearon las células en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro, en 1,5 ml del medio A. Luego de 24 h se aspira el medio y se reemplaza por DMEM durante 3 h. Se lava con 1 ml de solución fisiológica. Se agrega 1 ml de medio definido I. Luego de 48 h se aspira el medio, se lava con solución fisiológica y se añade MEM sin Glc, suplementado con 1 mg/ml de albúmina sérica bovina. Después de 1 h se añaden simultáneamente P  $10^{-7}\text{M}$  y 5 µCi de  $^{14}\text{C}$ -Glc. Las incubaciones se interrumpen luego de 1, 3 o 5 horas. Se determinó el número de células y la cantidad de proteína por caja de Petri que resultaron ser de 21.250 células y  $217 \pm 23 \mu\text{g}$  (n=2), respectivamente. \*: Media  $\pm$  ES (n=2); a:  $p < 0,05$  con respecto a control.



**FIGURA 49:** Efecto del tiempo de incubación sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a lípidos-azúcares y glicoproteínas en células en presencia o no de P.

Se estudia el efecto del tiempo sobre la estimulación provocada por P  $10^{-7}\text{M}$ . Se grafica radiactividad incorporada a fase inferior (●), C/M/A 10:10:3 (■) y fracción insoluble en TCA caliente (▲), en presencia (—) o no (---) de P.

III.B.1.9. EFFECTO DE LA TUNICAMICINA  
SOBRE CELULAS T47D-cl1

Como ya se ha indicado (I.1. 4.7.) la tunicamicina es un antibiótico que inhibe la glicosilación de proteínas a través de lípidos intermediarios. En tal sentido, se decidió estudiar el efecto de esta droga sobre la síntesis de glicoproteínas en las células T47D.

III.B.1.9.1. EFFECTO SOBRE EL  
CRECIMIENTO  
CELULAR

En la Figura 43 se aprecia el efecto de dosis crecientes de tunicamicina, proveniente de Sigma, sobre el crecimiento celular.

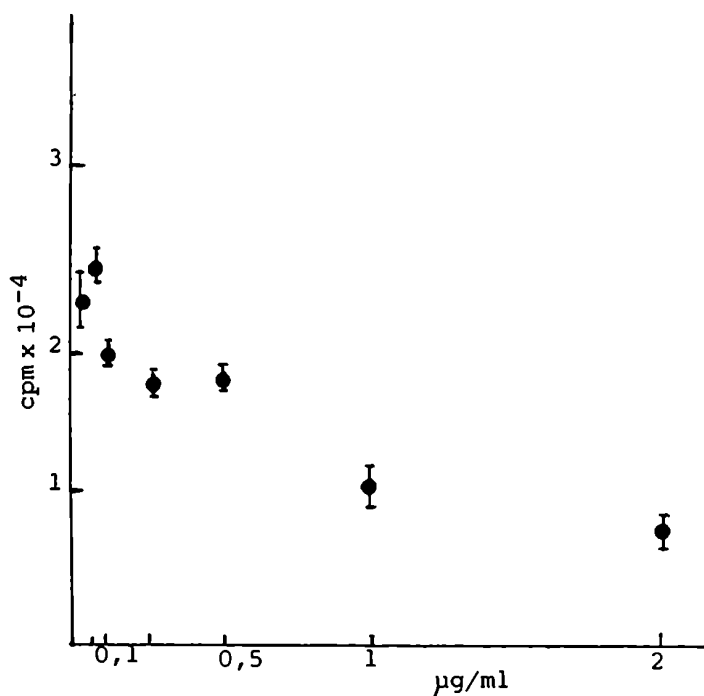


FIGURA 50: Efecto de la concentración de tunicamicina sobre el crecimiento celular.

Se cultivan células T47D-cl1 en macrowells en medio A, en presencia de distintas concentraciones de tunicamicina (Sigma), durante 3 días, período al cabo del cual se determina el número de células. Se grafica media  $\pm$  ES (n=2). \*:  $p < 0,05$  con respecto al control.

A una concentración de tunicamicina de 0,05 µg/ml no se afecta el crecimiento celular y éste disminuye a medida que se incrementa la concentración del antibiótico a partir de 0,10 µg/ml.

III.B.1.9.2. EFFECTO SOBRE LA  
INCORPORACION  
DE <sup>35</sup>S-METIONI-  
NA A PROTEINAS

Se estudió el efecto de la tunicamicina sobre la síntesis proteica, evaluada a través de la incorporación de <sup>35</sup>S-Met a la fracción TCA precipitable. Se ensayó con antibiótico proveniente de dos fuentes: Sigma y Lilly.

Concentración tunicamicina (µg/ml)	Radiactividad (cpm/10.000 células)*	
	Tunicamicina Lilly	Tunicamicina Sigma
0,00	144.742 ± 6.373	
0,05	129.653 ± 3.768	133.927 ± 2.905
0,10	122.624 ± 5.023	133.608 ± 8.772
0,25	96.030 ± 22.624	141.162 ± 12.990
0,50	68.164 ± 9.176	149.972 ± 9.166
1,00	78.013 ± 17.470	139.869 ± 12.896

TABLA 37: Efecto de la concentración de tunicamicina de distintas fuentes sobre la incorporación de <sup>35</sup>S-metionina a proteínas en T47D-c11.

Se plaquearon 10.000 células/well y se procedió según lo descrito en II.2.B.6. Al detener la reacción se determinó por duplicado el número de células que resultó de 26.675 ± 75. \*: Media ± ES (n=2).



Los resultados que se muestran en la Tabla 37 indican que a las dosis utilizadas la tunicamicina de Sigma no inhibe la síntesis de proteínas. En contraste, la proveniente de Lilly disminuye la incorporación del aminoácido y este efecto se incrementa al hacerlo la concentración del antibiótico.

III.B.1.9.3. EFFECTO SOBRE LA  
INCORPORACION  
DE AZUCARES A  
GLICOPROTEINAS

Se analizó la acción del antibiótico sobre la glicosilación proteica evaluada a través de la incorporación de azúcares radiactivos a la fracción TCA precipitable.

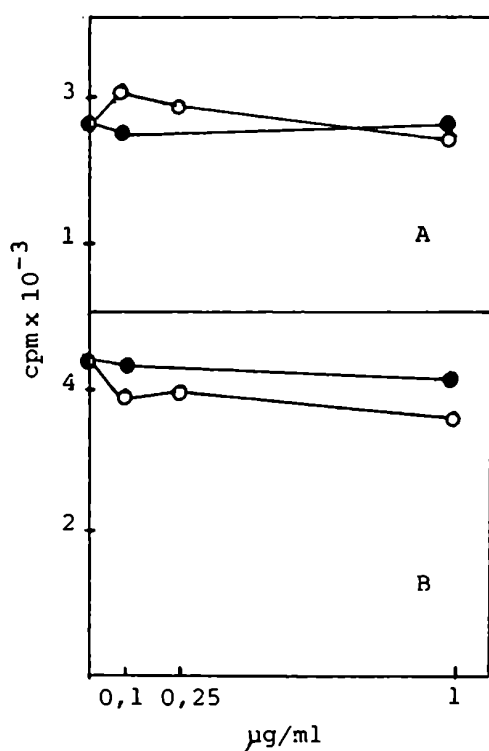
Se procedió de acuerdo a lo descrito en II.2.B.6. Las células se preincubaron durante 12 h con tunicamicina de Sigma o Lilly, momento en el cual se añaden los azúcares radiactivos continuándose las incubaciones por 6 h adicionales.

En la Tabla 38 y en la Figura 51 se aprecia que la tunicamicina de Sigma reduce la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc (10-20 %) a todas las dosis ensayadas. Con respecto a la  $^{14}\text{C}$ -Man, a concentraciones bajas del antibiótico se incrementa levemente la incorporación de este azúcar (5-12 %), mientras que a dosis mayores se reduce (12 %). La tunicamicina procedente de Lilly disminuye levemente la incorporación de ambos azúcares a las 2 dosis ensayadas (3-10 %).

Concentración tunicamicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Radiactividad (cpm)*			
	$^{14}\text{C-Glc}$		$^{14}\text{C-Man}$	
	Tunicamicina Sigma	Tunicamicina Lilly	Tunicamicina Sigma	Tunicamicina Lilly
0,00		4.406 $\pm$ 6		2.754 $\pm$ 38
0,10	3.980 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	4.288 $\pm$ 168	3.152	2.562 $\pm$ 57
0,25	3.998 $\pm$ 31 <sup>a</sup>		2.894 $\pm$ 35	
1,00	3.610 $\pm$ 114 <sup>b</sup>	4.208 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	2.448 $\pm$ 372	2.505 $\pm$ 23 <sup>c</sup>

**TABLA 38:** Efecto de la tunicamicina sobre la incorporación de azúcares radiactivos a glicoproteínas en T47D-cl1.

Las condiciones de ensayo son iguales a las descritas en la Figura 51. \*: Media  $\pm$  ES (n=2); a:  $p < 0,01$ ; b:  $p < 0,02$ ; c:  $p < 0,05$ .



**FIGURA 51:** Efecto de la tunicamicina sobre la incorporación de azúcares a glicoproteínas.

Se preincubó las células, plaqueadas en multiwells, durante 12 h con tunicamicina de Sigma (o) o Lilly (●), momento en el cual se añaden 2  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C-Man}$  (A) o 0,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C-Glc}$  (B), continuándose las incubaciones por 6 h más. Se determinó la radiactividad en el material TCA precipitable.

Como los resultados obtenidos con la tunicamicina de Sigma fueron sorprendentes, se repitió el ensayo aumentando el tiempo de preincubación con el antibiótico a 18 h.

Los valores observados en la Tabla 39 son inesperados. La incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc sólo se reduce levemente en presencia de tunicamicina a una concentración mayor a 0,25  $\mu\text{g/ml}$  y se ve incrementada por niveles menores del antibiótico.

Con respecto a la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Man, ésta se ve francamente incrementada por los niveles de tunicamicina ensayados.

Concentración tunicamicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Radiactividad (cpm/10.000 células)*	
	$^{14}\text{C}$ -Glc	$^{14}\text{C}$ -Man
0,00	10.253 $\pm$ 55	1.040 $\pm$ 43
0,05	11.241 $\pm$ 295	2.005 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
0,10	12.229 $\pm$ 149 <sup>a</sup>	
0,25	7.574 $\pm$ 318 <sup>b</sup>	
0,50	8.285 $\pm$ 42 <sup>a</sup>	
1,00	9.386 $\pm$ 480	2.271 $\pm$ 293

TABLA 39: Efecto de la concentración de tunicamicina de Sigma sobre la incorporación de azúcares radiactivos a glicoproteínas en células T47D-cl1.

Se preincubaron las células, plaqueadas en multiwells, durante 18h con tunicamicina (Sigma), momento en que se añade 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Glc o 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Man, continuándose las incubaciones por 6 h más. Se determinó la radiactividad TCA precipitable y el número de células/well que resultó de 41.120  $\pm$  3.582 (n=2).

III.B.1.10. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE  
DOLIQUIL-KINASA EN MICRO-  
SOMAS AISLADOS DE CELULAS  
T47D-cl1

Se decidió estudiar la posible actividad de Dol-kinasa en fracciones microsomales provenientes de células T47D-cl1. Esta enzima controla la síntesis de Dol-P-azúcares regulando los niveles de Dol-P disponible (350).

Se utilizó como sustrato  $^3\text{H}$ -Dol donado gentilmente por el Dr. E. Belocopitow (Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar").

Para controlar la pureza del  $^3\text{H}$ -Dol se realizó una cromatografía sobre capa delgada según lo descrito en II.9.2., utilizando cloroformo como solvente de corrida. En la Figura 52 se ilustra el cromatograma correspondiente.

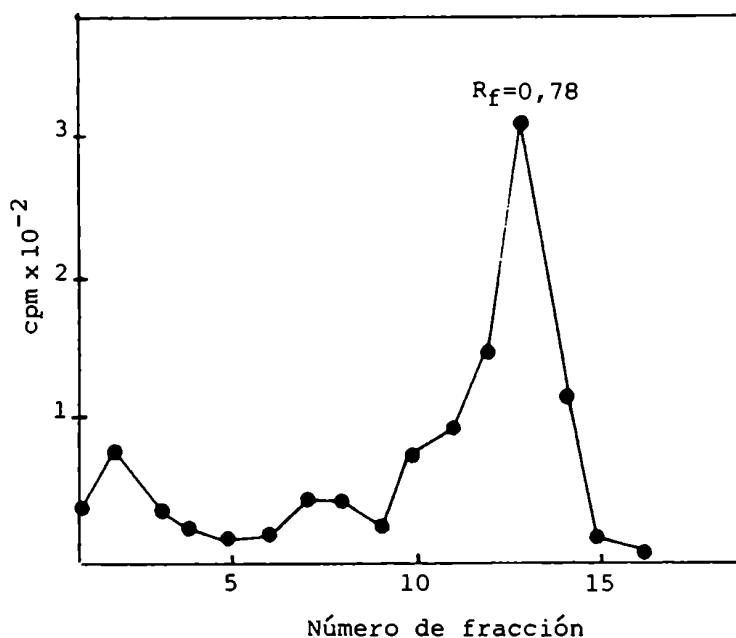


FIGURA 52: Cromatografía sobre placa delgada de  $^3\text{H}$ -Dol.

El  $^3\text{H}$ -Dol se cromatografió sobre capa delgada con solvente E, según se describe en II.9.2.

Los resultados son coincidentes con los presentados por Keenan y col. (311).

Se prepararon microsomas a partir de células T47D-cl1 según se detalla en II.2.B.7.a. Se midió la concentración proteica en la fracción microsomal obtenida por el método de Lowry. Resultó ser de 10 mg/ml.

Se llevó a cabo el experimento descrito en II.2.B.7.b., utilizándose tres cationes divalentes diferentes y dos concentraciones de detergente.

Se realizaron cromatografías de intercambio iónico en DEAE-celulosa (II.9.3.). En este tipo de columnas se separa Dol, que eluye con C/M 3:2, de Dol-P que lo hace con 250 mM de formiato de amonio en C/M/A 10:10:3.

En la Tabla 40 se informan los valores obtenidos.

Triton X-100	XCl <sub>2</sub>	Radiactividad (cpm)				% Trans- ferencia
		C/M 3:2	C/M 1:1	250 mM FA C/M/A 10:10:3		
0,1%	Mn	20.125	207	11.620	36	
0,2%	Mn	21.236	246	5.038	19	
0,2%	Ca	19.116	250	831	4	
0,2%	Mg	17.940	243	434	2	

TABLA 40: Cromatografía de intercambio iónico del material lipídico procedente de incubaciones de microsomas de células T47D-cl1 con <sup>3</sup>H-Dol.

La radiactividad eluída de la columna con C/M 3:2 corresponde a Dol y la eluída con 250 mM formiato de amonio (FA) en C/M/A 10:10:3 a Dol-P. Las incubaciones se realizaron según II.2.B.7.

Se comprueba la presencia de radiactividad en la fracción eluída con formiato de amonio 250 mM en C/M/A 10:10:3. Esto implica que el  $^3\text{H}$ -Dol se fosforiló a  $^3\text{H}$ -Dol-P.

De los tres cationes estudiados el Mn resultó el más efectivo, ya que con su agregado se alcanzó un 19% de transferencia de radiactividad a la fracción eluída con sales. Cuando en su presencia se redujo la concentración de detergente a 0,1%, el porcentaje de fosforilación ascendió al 36%.

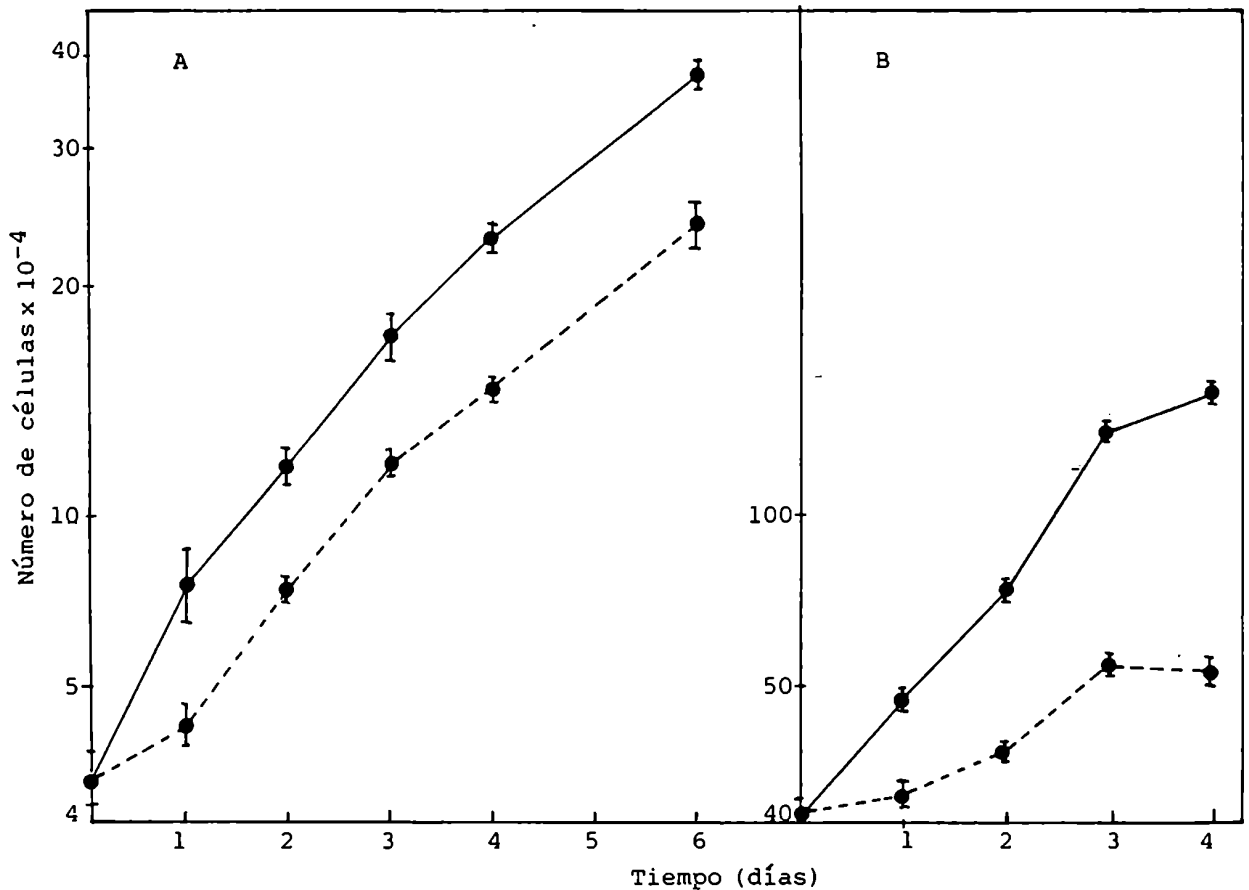
III.B.1.11. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS  
RADIOMARCADOS PROVENIENTES  
DE INCUBACIONES DE CELULAS  
T47D-cl1 CON  $^{14}\text{C}$ -GLC Y  $^{35}\text{S}$ -  
MET. EFECTOS DE  $\text{E}_2$  Y TAM

El objetivo de los trabajos que se describirán a continuación ha sido profundizar las investigaciones efectuadas hasta el momento con células T47D, intentando determinar si el  $\text{E}_2$  o el Tam producen diferencias cualitativas en los parámetros observados.

Como ya se ha comentado, para demostrar una posible acción hormonal sobre las células T47D es necesario eliminar del suero en el cual se cultivan, los esteroides endógenos (303). Para ello el suero se trató con carbón-dextrano según se describe en II.6.

Para evaluar el efecto de la deprivación esteroidea so-

bre los cultivos celulares, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes (ver II.2.B.3.).



**FIGURA 53:** Efecto de la deprivación esteroidea del suero sobre el crecimiento de células T47D-c11.

Se plaquearon 40.000 células (A) o 400.000 células (B) en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro en medio A. A las 24 h el medio se reemplaza por medio A en presencia de SFB completo (—) o de SFB libre de esteroides (---). Se procede según se describe en II.2.B.3.

Observando la Figura 53, A, se comprueba que en presencia

de suero deprivado de esteroides las células continúan creciendo normalmente, aunque a menor velocidad que con suero completo, al menos durante 6 días. En contraste, a una mayor densidad celular, la curva de crecimiento de las células cultivadas con suero tratado con carbón, se aparta más de la control, efecto que se acentúa luego del segundo día (Figura 53, B).

En consecuencia se decidió llevar a cabo los ensayos que se describen a continuación partiendo de 40.000 células, cultivándolas durante 4 días en suero libre de esteroides.

#### III.B.1.11.1. INCUBACIONES

##### CON <sup>14</sup>C-GLC

Los ensayos de marcación con el azúcar se llevaron a cabo según lo detallado en II.2.2.4.b. Los incubados se procesaron como se indica en II.2.B.5.b., determinándose la radiactividad transferida a cada fracción. En la Tabla 41 se muestran los valores correspondientes.

Se observa que en presencia de Tam la incorporación de radiactividad a la fase inferior (III) disminuye en un 30 %, mientras que ésta no se altera con el agregado de E<sub>2</sub>.

Con respecto a la transferencia del azúcar al extracto C/M/A 10:10:3 (VII), el E<sub>2</sub> no la modifica y el antiestrógeno produce una disminución del 33 %.



La incorporación de radiactividad a la fracción insoluble en TCA caliente (XI) se ve reducida en un 36 % por el Tam y duplicada por el estrógeno.

Fracción	Radiactividad (cpm)		
	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	22.974.113	22.100.954	19.156.166
II	314.480	264.640	256.760
III	131.910	129.095	90.640
IV	119.510	108.835	46.580
V	14.880	11.865	5.989
VI	945	878	609
VII	403	456	268
VIII	0	0	0
IX	7.975	8.555	3.670
X	12.950	25.350	17.140
XI	7.080	15.282	4.506

TABLA 41: Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a diferentes fracciones de células T47D-cl1. Efecto de  $\text{E}_2$  y Tam.

Se plaquearon 40.000 células en cápsulas de Petri de 35 mm en medio A. Se procedió según II.2.B.4.b. luego de incubar las células durante 4 días en presencia de SFB libre de esteroïdes. En el momento de realizar el experimento se determinó el número de células ( $160.250 \pm 10.250$ ,  $n=2$ ) y la cantidad de proteína (213,6 ug) por cápsula de Petri. Las células se incubaron con  $10 \mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Glc durante 3 h. Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II: fase superior; III: fase inferior; IV: fase superior teórica ( $4 \text{ mM MgCl}_2$ ); V: fase superior teórica; VI: metanol 1; VII: C/M/A 10:10:3; VIII: metanol 2; IX: soluble TCA frío; X: soluble TCA caliente; XI: insoluble TCA caliente.

Se procedió al análisis de los productos radiomarcados presentes en las distintas fracciones previamente detalladas (II.2.B.5.b).

III.B.1.11.1.a.

Medio de cultivo (I)

Se realizó una cromatografía sobre capa delgada del material presente en el medio de cultivo (ver II.9.2.).

FIGURA 54: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de las fracciones hidrosolubles procedentes de incubaciones de células T47D-cl1 con  $^{14}\text{C}$ -Glc.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Se cromatografió en solvente H durante 2 h 45 min. El frente recorrió 14 cm. La autorradiografía se reveló luego de 7 d de exposición. Carriles: 1,2,3: II(1/10 del total); 4,5 6: I(1/500 del total); 7,8: IX (total); 9,10,11: X(total). Corresponden a cultivos controles 1,4,7,9; a tratados con  $\text{E}_2$ : 2,5, 8,10; con Tam: 3,6,11. Se muestra la posición de migración de patrones de GlcN, Glc, Sac, Man y ácido glucurónico.

En la Figura 54, carriles 4, 5 y 6 se observan sustancias radiactivas de Rf 0,05; 0,29; 0,35; 0,42; 0,45 y 0,52,

predominando las de Rf 0,29-0,35.

En la misma placa se cromatografiaron azúcares patrones GlcN (Rf=0,025); ácido glucurónico (Rf=0,35); sacarosa (Rf=0,43); Glc (Rf=0,44) y Man (Rf=0,45).

LLama la atención que la mayor parte de los compuestos radiactivos presentes en las muestras migren con distinta velocidad que la Glc, azúcar radiactivo con el cual se incubaron las células.

III.B.1.11.1.b.

Fase superior

(II)

En la Figura

54 carriles 1, 2 y 3 se muestra la corrida cromatográfica sobre placa delgada del material presente en la fase superior de la partición de Folch.

En los tres canales se aprecian sustancias cuyos Rf son de 0,05; 0,21; 0,26; 0,31 y 0,40. En la muestra correspondiente a células tratadas con Tam puede verse una mancha de Rf 0,54 no aparente en los otros carriles.

Pueden hacerse las mismas consideraciones que con respecto al medio de cultivo en cuanto a la activa conversión de la Glc trazadora a sustancias de menor movilidad cromatográfica.

III.B.1.11.1.c.

Fase inferior

(III)

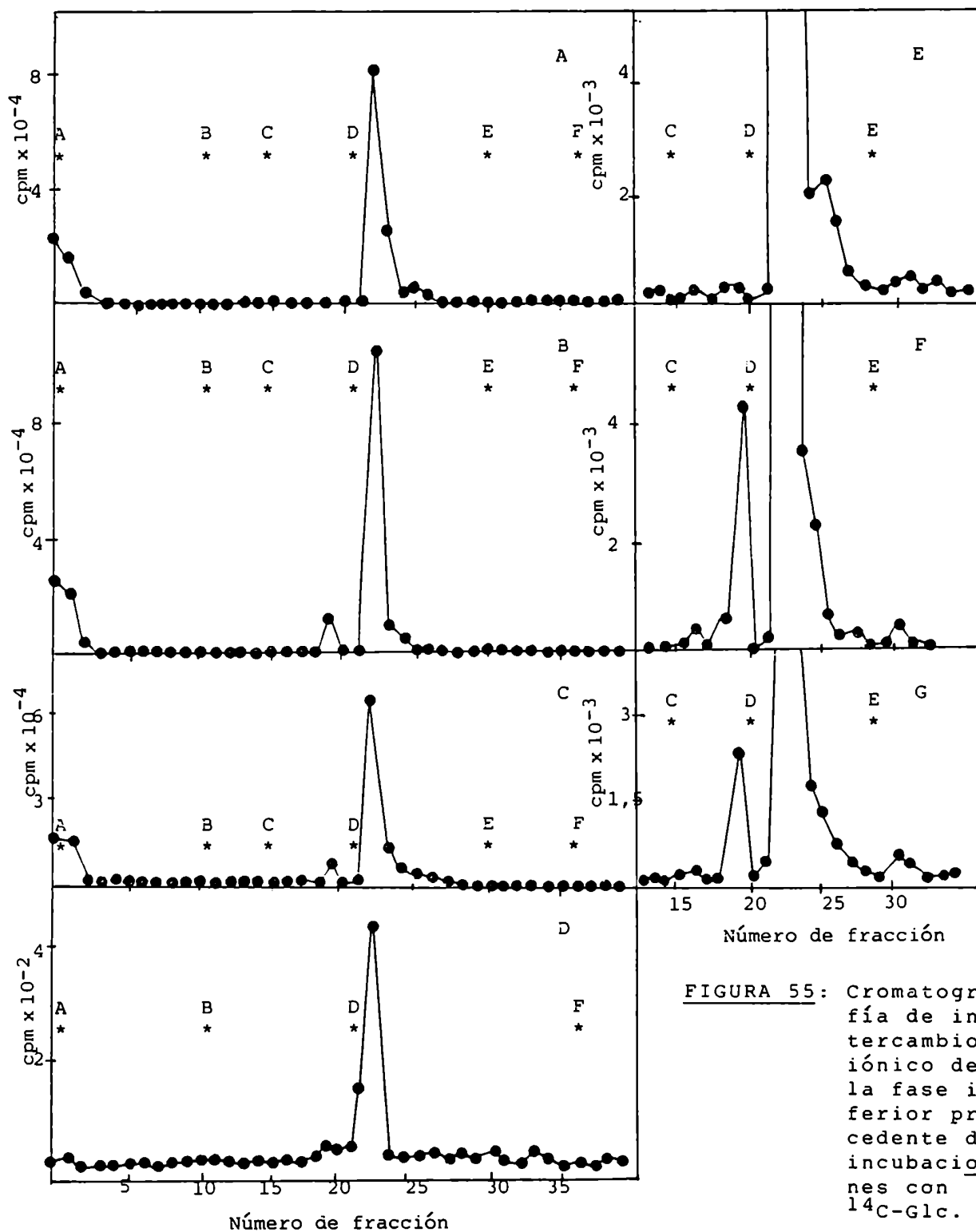
Se llevó a ca

bobó una cromatografía de intercambio iónico (II.9.3.) de la fase inferior resultante de la partición de Folch. Se trabajó con 4 columnas paralelas correspondientes a un patrón de Dol-P-Glc de hígado (proporcionado por el Dr. L. Quesada) y a muestras control y tratadas con  $E_2$  y Tam.

En la Figura 55 puede apreciarse que, en las 3 muestras, la mayor parte de la radiactividad eluye con acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3 (Paneles A a C), igual conducta que la evidenciada por el patrón de Dol-P-Glc (Panel D). Se observa la presencia de lípidos neutros no retenidos por la columna.

Cuando se grafica variando la escala aparecen picos menores que se observan en los Paneles E a G.

En la Tabla 42 se muestra la distribución de radiactividad en las distintas fracciones eluidas. Puede comprobarse que con el solvente C/M/A 10:10:3 (C) no hay elución de radiactividad en la muestra control, mientras que ésta es evidente en las otras dos muestras. Con el solvente 25 mM de acetato de amonio en C/M/A 10:10:3 (E), que podría involucrar lípido-azúcares pirofosfatados, hay mayor elución de radiactividad en la muestra tratada con Tam. Con respecto a la frac-



**FIGURA 55:** Cromatografía de intercambio iónico de la fase inferior procedente de incubaciones con  $^{14}\text{C}$ -Glc.

El total de las fases inferiores de muestras control (A; E), tratadas con  $\text{E}_2$  (B; F) o con Tam (C; G) del experimento descrito en la Tabla 41 se sembró en columnas de DEAE-celulosa. Se cromatografió en iguales condiciones un patrón de Dol-p- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata (Panel D). Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

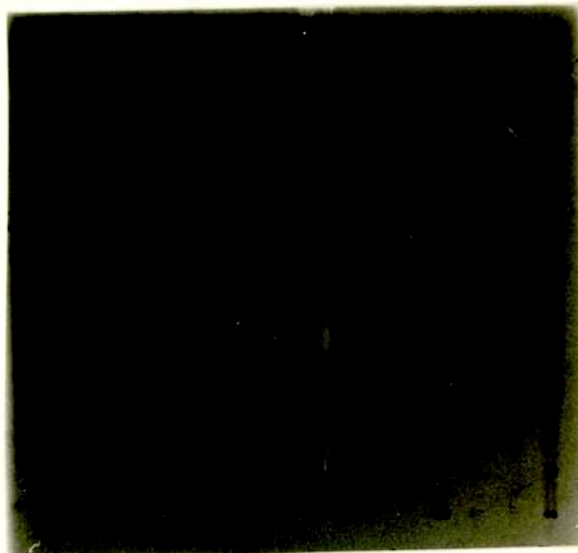
ción separada de la columna con acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3, las diferencias observadas en la muestra con E<sub>2</sub> pueden deberse a una diferente adjudicación de fracciones al pico principal (D) o al hombro (D'), ya que analizando el cromatograma de la Figura 55 se aprecia que la separación no es neta. Considerando ambos picos en conjunto, el porcentaje de radiactividad en la fracción 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3 (que correspondería a poliprenil-monofosfato-azúcares) es de 72,8; 65,6 y 68,3 % para las muestras control y tratadas con E<sub>2</sub> y Tam respectivamente.

Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	44 304	26,6	50.816	26,5	33.360	25,0
B	0	0,0	0	0,0	0	0,0
C	49	0,0	14.064	7,3	6.944	5,2
D	105.936	63,6	116.880	61,0	79.890	60,1
D'	15.360	9,2	8.656	4,5	10.880	8,2
E	976	0,6	928	0,5	1.840	1,4
F	0	0,0	0	0,0	0	0,0

**TABLA 42:** Distribución de la radiactividad en las distintas fracciones de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 55.

Se calcularon los porcentajes de radiactividad eluidos en cada fracción de la columna descrita en la Figura 55. Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: fracciones 22 y 23 para control y Tam y 22 a 24 para E<sub>2</sub> de acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3; D': idem fracciones 24-27 para control y Tam y 25-27 para E<sub>2</sub>; E: 25 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; F: idem 200 mM.

Se reúnen las fracciones eluidas, se eliminan las sales (II.2.A.4.) y se siembran disueltas en C/M 3:2 en una placa delgada de Sílica gel (II.9.2.). Se cromatografía en solvente G y la autorradiografía correspondiente se aprecia en la Figura 56.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

FIGURA 56: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de los lípido-azúcares eluidos de la columna de intercambio iónico de la Figura 55.

La cromatografía se desarrolló durante 2 h 30 min en solvente G a 25°C. El frente recorrió 15,3 cm. La autorradiografía corresponde a 14 d de exposición. Carriles: 1: Dol-P-<sup>14</sup>C-Glc de hígado de rata; 2-5: muestra control; 6-10: tratada con E<sub>2</sub>; 11-15: con Tam; 16: Dol-P-<sup>14</sup>C-Man de hígado de rata; 2,6,11: corresponden a fracción A; 7,12: C; 3,8,13: D; 4,9,14: D'; 5,10,15: E.

Analizando la fracción A (carriles 2, 6 y 11) pueden detectarse algunas diferencias entre las muestras. Las sustancias de Rf 0,11; 0,67 y 0,82 muestran menor intensidad en la muestra tratada con Tam. La mancha de Rf=0,42 presenta diferente forma en el cultivo con E<sub>2</sub>. En la muestra correspondiente al antiestrógeno la mancha de Rf = 0,06 presenta menor intensidad con respecto a la de Rf = 0,04 que en las otras dos muestras.

La sustancia de Rf = 0,11 que eluye en la fracción C podría ser la misma que aparece en la fracción A.

Con respecto a la fracción D, la sustancia de Rf = 0,60 está en mayor cantidad en la muestra correspondiente a Tam. La mancha mayor presenta un Rf de 0,46 comprendido en el rango de Rf de los Dol-P-Glc y Dol-P-Man patrones que van de 0,43 a 0,46.

En cuanto a la separación de la fracción correspondiente al solvente acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3 en dos picos, ambos presentan sustancias comunes y no comunes. Sólo en la fracción D aparecen manchas de Rf 0,29; 0,52 y 0,60 y en la D' de 0,33. Esta última es más intensa en los cultivos con Tam. Las diferencias que aparecen en cuanto a la distribución en D y D' en los cultivos con el estrógeno, se deben a la adjudicación de fracciones a cada pico, como ya se ha comentado.

En la fracción E aparecen sustancias con igual Rf que en la D, pero dos exclusivas de Rf 0,22 y 0,35. La primera sólo



está presente en la muestra tratada con Tam, y la segunda está en ésta en mayor proporción. Podrían corresponder a poliprenil pirofosfato de 3 o 4 unidades de azúcares.

Cuando se realiza una tinción con iodo de esta placa según II.9.2., la mayor parte del material se localiza en el frente.

Fracción	Rf	Fracción	Rf	Fracción	Rf
Dol-P-Glc	0,46	C	0,11	D'	0,12
Dol-P-Man	0,43	D	0,12		0,16
			0,16		0,33
A	0,04		0,29		0,41
	0,06		0,35		0,46
	0,11		0,41	E	0,16
	0,42		0,46		0,22
	0,67		0,52		0,35
	0,75		0,60		0,41
	0,82				0,46

TABLA 43: Datos de movilidad de las sustancias evidenciadas en el cromatograma de la Figura 56.

Solventes de elución: idem Tabla 42.

Se raspó la Sílica gel correspondiente a las sustancias eluidas con acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3 con Rf 0,46; 0,41; 0,35; 0,33 y 0,29, denominadas desde ahora I, II, III, IV y V, y se la colocó en respectivos tubos. Se añadieron 400 µl de HCl 0,02 N, 5 µl de azul de Timol y se calentó 30 min a 100°C. Se agregaron 2 ml de C/M 3:2, continuándose la extracción durante toda la noche. Se separó la fase superior. Se lavó la fase inferior 2 veces con 0,2 ml de fase superior teórica y se reunieron los lavados con la fase superior.

Se separa la fase inferior. Se lava la sílica con C/M 3:2. Se determina la radiactividad en alícuotas de ambas fases obteniéndose los valores que se indican en la Tabla 44.

Sustancia	Radiactividad (cpm)		% de hidrólisis
	Fase inferior	Fase superior	
I	22.520	17.820	44
II	4.590	1.260	21
III	190	580	75
IV	200	230	53
V	290	420	59

TABLA 44: Tratamiento ácido suave de los glicolípidos eluidos de la cromatoplaque de la Figura 56.

$R_f$ : I: 0,46; II: 0,41; III: 0,35; IV: 0,33; V: 0,29.

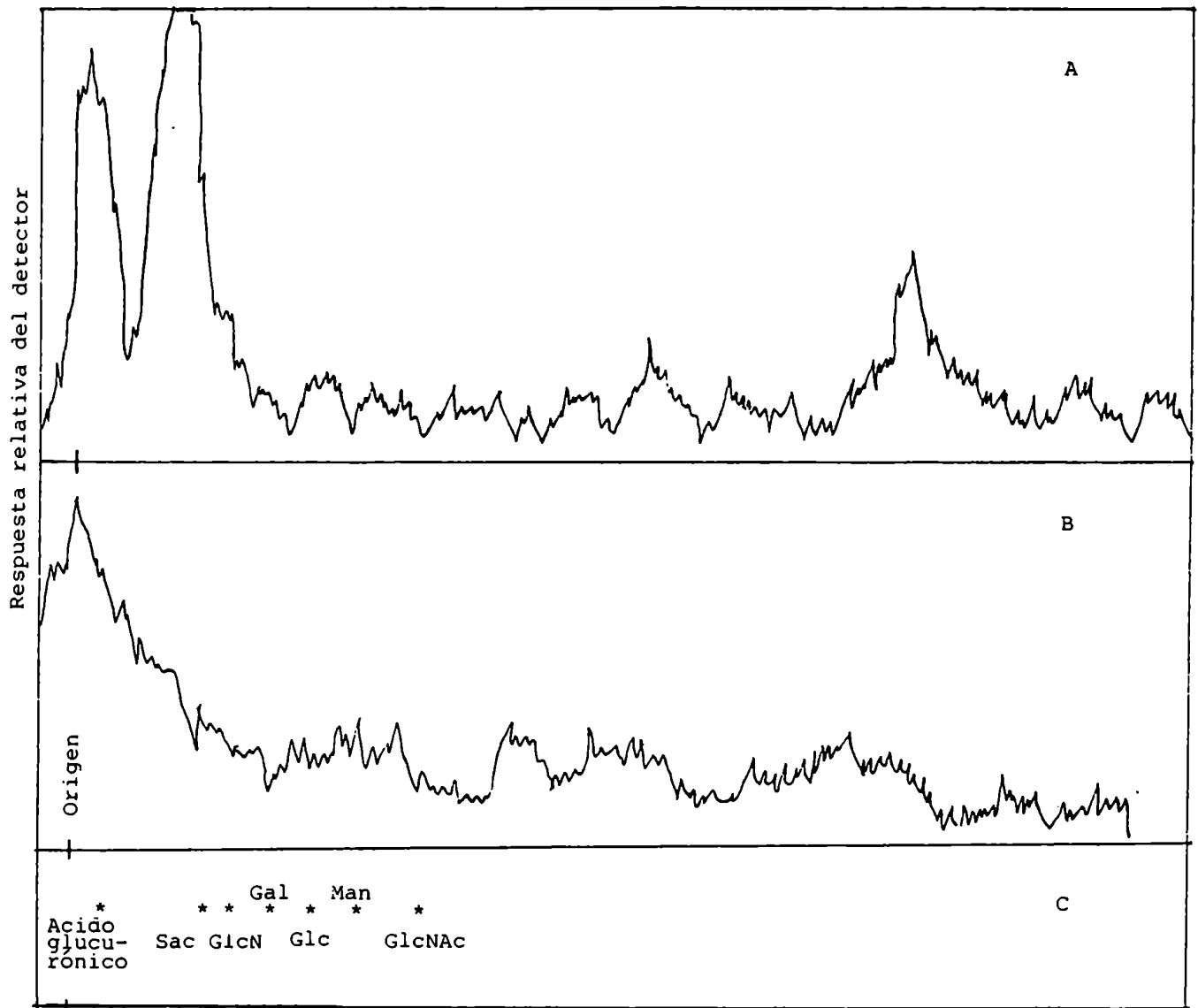
Se realiza una cromatografía sobre papel (II.9.1.) de las fases superiores. La escasez del material correspondiente a las sustancias III, IV y V no permitió su revelado. En la Figura 57 se muestran los cromatogramas obtenidos para las sustancias I (Panel A) y II (Panel B).

Puede apreciarse que para la sustancia II se obtuvo un solo pico radiactivo que migró escasos mm del origen.

Para el compuesto I, se observan 3 picos que migran con  $R_{Glc}$  de 0,01; 0,10 y 2,19. No puede descartarse que el compuesto correspondiente al mayor  $R_f$  sea el glicolípido no hidrolizado remanente..

En la Tabla 45 se muestran los  $R_f$  correspondientes a dis

tintos azúcares patrones.



**FIGURA 57:** Cromatografía sobre papel de los productos liberados por hidrólisis de los glicolípidos I y II.

Se sometió a los glicolípidos I y II a hidrólisis ácida suave. Se cromatografiaron sobre papel los productos hidrosolubles en solvente C, en forma descendente. Paneles: A: glicolípido I; B: II; C: se muestra posición de migración de azúcares patrones.

Azúcares	A	B	C
D(+)-Glc	100	100	100
D(+)-Man	126 ± 1,7	119	126
D-GlcNAc	150 ± 3,4	146	139
D(+)-GlcN-HCl	59 ± 3,4	60	
D(+)-Gal	85 ± 4,0	82	82
D-glucurónico	9 ± 2,0	9,7	
D(+)-GalN-HCl	43 ± 4,0		
D-GalNAc	139 ± 2,6		
D(-)-ribosa	185 ± 2,9		
D(+)-fucosa	175 ± 4,1		
D-glucuronolactona	249 ± 12,0		
sacarosa		56	
maltosa			48
maltotriosa			23*
maltotetrosa			10*

**TABLA 45:** Datos de movilidad de azúcares cromatografiados en cromatogramas como el desarrollado en la Figura 57.

Datos experimentales B) y obtenidos de la literatura A) (351) y C) (303). \*: comunicación personal Dr. L. Quesada.

Se recromatografió la tira de papel correspondiente a la sustancia I, en solvente B. Dicha tira tenía como patrón interno ácido glucurónico. En la Figura 58 se aprecia que hubo una separación neta de los picos que permanecían cerca del origen, localizándose ahora a 0,20 y 1,85 cm del origen. El patrón de ácido glucurónico se ubicó a 1,45 cm.

Se repitió la hidrólisis pero efectuando primero la extracción con C/M 3:2 y eliminando la Sílica gel. Para la sustancia I se obtuvo alrededor de 30 % de la radiactividad en la fase superior. Para la sustancia II no se detectó radiactividad hidrosoluble, dado el escaso material de partida.

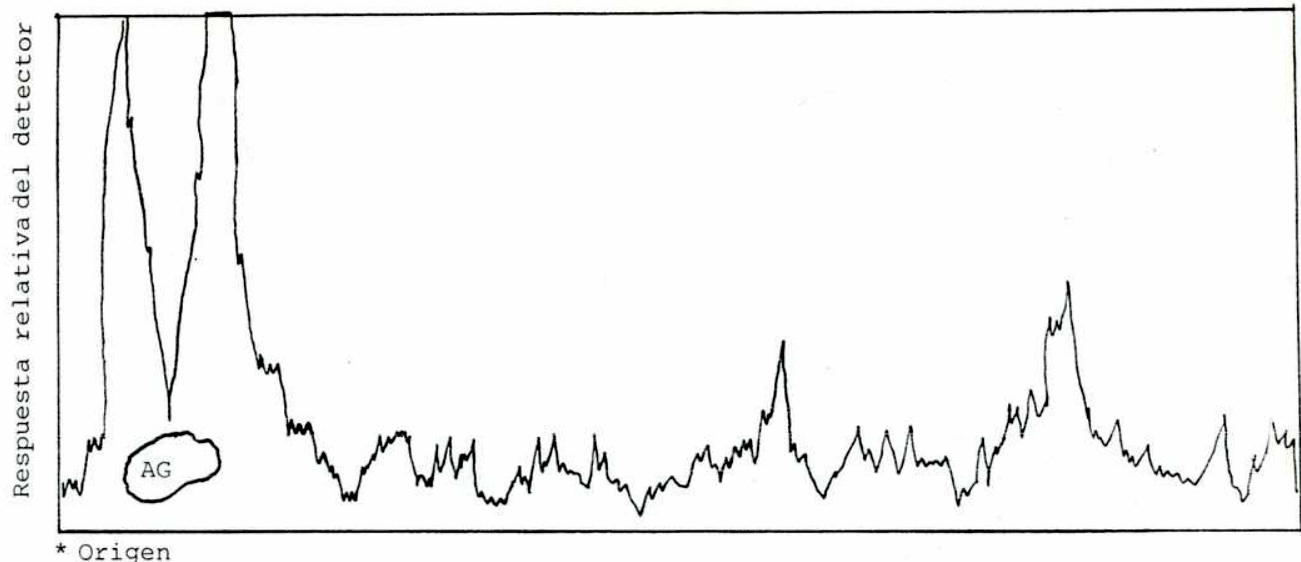
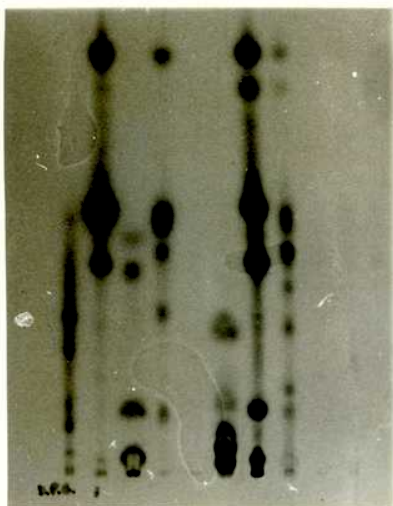


FIGURA 58: Cromatografía sobre papel de las sustancias liberadas por hidrólisis de la sustancia I.

Se recromatografió el cromatograma correspondiente a la sustancia I de la Figura 57, en forma descendente en solvente B. Se muestra la posición de migración de un patrón interno de ácido glucurónico.(AG).

Se efectuó una cromatografía sobre capa delgada de las fases superior e inferior provenientes de la hidrólisis y del patrón de Dol-P-Glc eluído de la sílica de la cromatografía descrita en la Figura 56. En la Figura 59 se observan los resultados.

Puede comprobarse que el patrón de Dol-P-Glc presenta una conducta cromatográfica anómala. Por alguna razón accidental no determinada se produjo la degradación de los lípidos presentes en la placa, por lo cual el material que se sometió a la hidrólisis no es representativo de los gli



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

FIGURA 59: Autorradiografía de la cromatografía sobre capa delgada de los productos de hidrólisis de las sustancias I y II.

Se cromatografió en solvente G durante 2h 20min. El frente recorrió 15,7cm. Carriles: 1: Dol-P-<sup>14</sup>C-Glc de hígado de rata; 2: sustancia I, fase inferior de la hidrólisis; 3: idem fase superior; 4: sustancia II fase inferior de la hidrólisis; 5: idem fase superior; 6: fase superior del extracto C/M 3:2 inicial; 7: sustancia I fase superior de la hidrólisis en presencia de alúmina; 8: idem sustancia II; 9: idem sustancia III; 10 y 11: idem sustancias V y IV respectivamente.

colípidos eluidos de la columna con acetato de amonio 4 mM en C/M/A 10:10:3. Eso explicaría la inesperada baja sensibilidad a la hidrólisis del material que hasta el momento había demostrado conducta compatible con la de un Dol-monofosfato-monosacárido. Lamentablemente, no se contó con suficiente material como para repetir las experiencias.

En otro sentido, resulta interesante analizar las sustancias remanentes en la fase inferior luego del tratamiento ácido, cuando dicha hidrólisis se efectuó en presencia (carriles 7 y 8) o no (carriles 2 y 4) de la sílica gel.

Si comparamos las sustancias presentes en el carril 2 ( $R_f = 0,36; 0,54$  y  $0,86$ ) con las del carril 7 ( $R_f = 0,13; 0,36; 0,54; 0,78$  y  $0,86$ ) y las del carril 4 ( $R_f = 0,13; 0,33;$

0,45; 0,52 y 0,86) con las del carril 8 ( $R_f = 0,13; 0,17; 0,30; 0,38; 0,45; 0,52; 0,78$  y  $0,86$ ), puede comprobarse que la presencia de la sílica gel durante la hidrólisis re du nda en la aparición de nuevos compuestos. La sustancia de  $R_f = 0,78$  sería un ejemplo para ambas sustancias de partida (I y II).

En la fase superior de la hidrólisis (carriles 3 y 5), aparecen tres sustancias de  $R_f = 0,13; 0,35$  y  $0,48$  quizás emparentadas con las tres sustancias detectadas por cromatografía sobre papel (ver Figura 57).

Por último, en el carril 6 correspondiente a la fase superior previa a la hidrólisis (material no presente en la placa que resultó alterada), se detectan principalmente dos sustancias de  $R_f = 0,15$  y  $0,30$ . De los datos de la lite ra tu ra podría especularse que se trata de di y monosacáridos, respectivamente (313).

III.B.1.11.1.d.

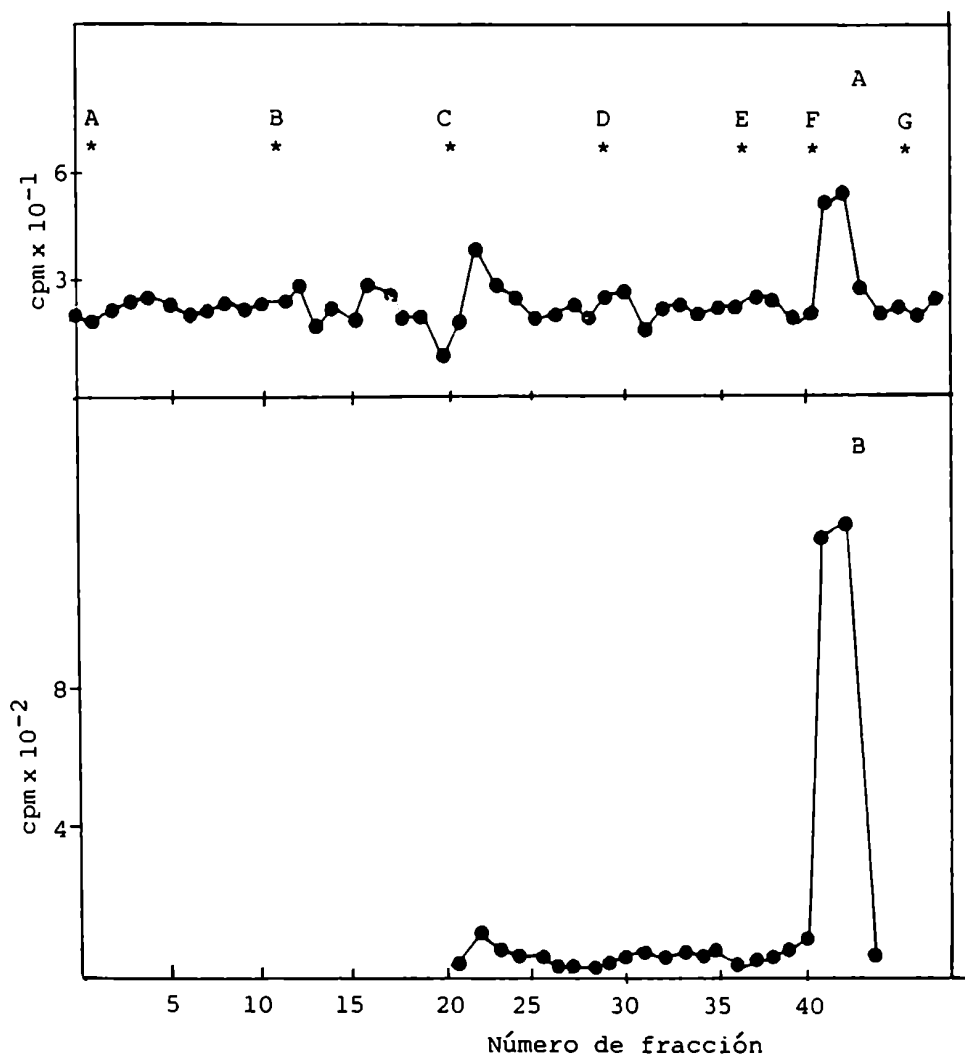
Extracto C/M/A

10:10:3 (VII)

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico (II.9.3.) del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3. En la Figura 60 se ilustra el cromatograma correspondiente.

Puede apreciarse que si bien hay escasa proporción de compuestos que eluyen con solventes D y E, la mayor parte

del material lo hace con solvente G (450 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3), concentración salina algo mayor de la esperada para un lípido-pirofosfato-azúcar.



**FIGURA 50:** Cromatografía de intercambio iónico del extracto C/M/A 10:10:3.

Se reunieron los extractos C/M/A 10:10:3 del experimento descrito en la Tabla 41. Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 100 mM; G: idem 450 mM; H: metanol/acetato de amonio 1/1. Panel A: alícuota contada en Omnifluor; Panel B: total contado en mezcla de Bray.



III.B.1.11.1.e.  
Lavados con TCA  
(IX y X)

Se procede de acuerdo a II.2.B.5.b. Las fracciones IX y X, que representan las sustancias solubles en TCA 10% frío y caliente respectivamente, se lavan reiteradamente con éter, descartándose la fase etérea. Luego de evaporar la fase acuosa bajo nitrógeno, se la siembra redisuelta en agua en la placa delgada presentada en la Figura 54.

La fracción soluble en TCA frío (carriles 7 y 8) presenta dos manchas: una que permanece en el origen y otra que migra con un  $R_f = 0,19$ . En la fracción soluble en TCA caliente (carriles 9-11), se evidencia una mancha radiactiva en el origen y otras con  $R_f = 0,21$ ;  $0,43$  y  $0,47$ . Con estos datos puede comprobarse que el tratamiento con TCA en frío resultó insuficiente para eliminar probables contaminantes de la fracción insoluble en el ácido, considerada como proteica.

III.B.1.11.2. INCUBACIONES  
CON  $^{35}\text{S}$ -MET

El experimento se realizó en forma paralela al descrito en III.B.1.11.1., incubado las células con  $^{35}\text{S}$ -metionina (ver II.2.B.4.).

Se procesó según II.2.B.5.b. y se determinó la radiacti-

vidad presente en cada fracción, resultados que se ilustran en la Tabla 46.

Fracción	Radiactividad (cpm)		
	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	16.441.059	18.424.000	17.288.249
II	60.920	57.720	62.830
III	17.945	25.635	30.905
IV	17.120	9.355	11.740
V	2.147	1.673	1.027
VI	82	115	317
VII		2.350	3.647
VIII	0	0	0
IX	13.300	22.680	28.520
X	180.940	183.730	188.730
XI	1.943.533	2.368.300	3.703.840

TABLA 46: Incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met a diferentes fracciones de células T47D-cll.

Se procedió como se indica en la Tabla 41, incubando con  $10\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -Met. Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II: fase superior; III: fase inferior; IV: fase superior teórica ( $4\text{mM MgCl}_2$ ); V: fase superior teórica; VI: metanol 1; VII: C/M/A 10:10:3; VIII: metanol 2; IX: soluble TCA frío; X: soluble TCA caliente; XI: insoluble TCA caliente.

Aunque la mayor parte de la radiactividad se concentra en la fracción insoluble en TCA caliente (proteínas), hay una inesperada incorporación de la marca en todas las fracciones estudiadas.

La Tabla 47 muestra la relación  $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$  en las diferentes fracciones analizadas.

Puede observarse que la inhibición en la incorporación

de  $^{14}\text{C}$ -Glc provocada por el Tam no se refleja en la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met. Más aún, parecería haber un incremento de ésta en presencia del antiestrógeno. De todos modos los experimentos son preliminares y no permiten sacar mayores conclusiones.

Fracción	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	1,40	1,12	1,11
II + IV + V	5,60	5,60	4,10
III	7,35	5,04	2,93
VII		0,19	0,07
IX + X	0,11	0,16	0,10
XI	0,004	0,007	0,001

TABLA 47: Relación entre  $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$  en las diferentes fracciones de células T47D-c11 incubadas con  $^{14}\text{C}$ -Glc o  $^{35}\text{S}$ -Met.

I: medio de cultivo; II + IV + V: total de las fases superiores; III: fase inferior; VII: C/M/A 10:10:3; IX y X: fracciones solubles en TCA; XI: insoluble TCA caliente.

Se procedió al análisis de los productos radiomarcados presentes en las distintas fracciones previamente detalladas (II.2.B.5.b.)

III.B.1.11.2.a.  
Medio de cultivo (I)

Se llevó a cabo una cromatografía sobre placa delgada (II.9.2.) del mate-

rial presente en el medio de cultivo. En la Figura 61, carriles 14 a 16 se observan los resultados.

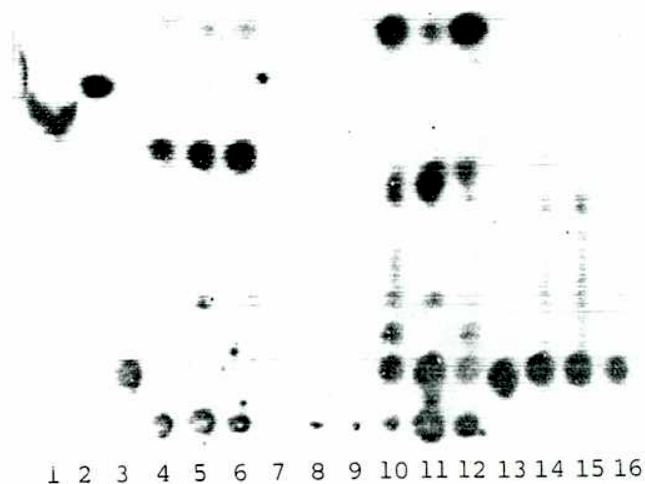


FIGURA 61: Autorradiografía de la cromatografía sobre capa delgada de diferentes fracciones correspondientes a la incubación de células T47D-cl1 con  $^{35}\text{S}$ -Met.

Se realizó una cromatografía en solvente G durante 2 h 50 min. El frente recorrió 14 cm. La autorradiografía se reveló luego de 9 días de exposición. Carriles: 1: Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Man de hígado de rata; 2: Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata; 3 y 13:  $^{35}\text{S}$ -Met; 4, 5 y 6: III (1/2 del total) de muestras control y tratadas con  $\text{E}_2$  y Tam; 7: VI (totales reunidos); 8: VIII (totales reunidos); 9: VII (totales reunidos); 10, 11 y 12: II (1/3 del total) control,  $\text{E}_2$  y Tam; 14, 15 y 16: I (1/500 del total) control,  $\text{E}_2$  y Tam.

En estos ensayos no se detectan diferencias entre las 3

muestras ensayadas y observamos preponderantemente una mancha de  $R_f = 0,11$ , ligeramente superior al patrón de metionina ( $R_f = 0,09$ ). Esta diferencia puede deberse a la presencia de sustancias que alteren la velocidad de migración del aminoácido. También se detectan, en mucho menor proporción, dos sustancias de  $R_f$  0,41 y 0,51, coincidente esta última con una sumamente débil presente en el patrón de  $^{35}\text{S-Met}$ .

III.B.1.11.2.b.

Fase superior

(II)

Se cromatografió sobre capa delgada el material presente en la fase superior de la partición de Folch de células T47D-cl1 incubadas con  $^{35}\text{S-Met}$ .

En la Figura 61 se observan notables diferencias entre las tres muestras ensayadas. Las sustancias que permanecen en el origen se presentan en mucha mayor cantidad en la muestra tratada con el estrógeno (canal 11) que en la tratada con Tam (carril 12) y en ésta a su vez más que en el control (carril 10).

La mancha de  $R_f = 0,10$  (coincidente con el patrón de  $^{35}\text{S-Met}$ ) es más intensa en el cultivo con  $\text{E}_2$ , luego en el control y por último en el tratado con Tam.

La sustancia que migra con  $R_f = 0,17$  está en similar proporción en los cultivos controles y con Tam, y en mucho menor

grado en la muestra tratada con  $E_2$ .

El compuesto de  $R_f = 0,24$  presenta menor intensidad en la muestra correspondiente al antiestrógeno, y la de  $R_f = 0,30$  es más intensa en el control que en el cultivo con Tam, mayor a su vez que en el incubado con  $E_2$ .

La sustancia que migra con  $R_f = 0,46$  se evidencia con mucha mayor intensidad en los cultivos con el estrógeno.

Por último, la mancha de  $R_f = 0,74$  es más evidente en presencia de Tam que en el control, siendo en los cultivos con el estrógeno notablemente más débil.

III.B.1.11.2.c.

Fase inferior

(III)

El material

presente en la fase inferior de la partición de Folch se sembró en la placa delgada descrita en la Figura 61, carriles 4 a 6. La misma placa se reveló con vapores de yodo (ver II.9.2.). Si bien en la Figura 62 se aprecia que la tinción con el halógeno da un perfil similar en las tres muestras, la incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met presenta diferencias.

Aunque hay sustancias ( $R_f = 0,74$  y  $0,89$ ) que son similares en las tres muestras, la de  $R_f = 0,22$  es claramente mayor en los cultivos con  $E_2$  que con Tam, y en éstos que en el control.

En contraste, la mancha de  $R_f = 0,52$ , que coincide con u-

na sustancia detectada en la tinción con  $I_2$ , es mayor en los cultivos con Tam que en las otras dos muestras.

La sustancia de  $R_f = 0,64$  es más evidente en presencia del estrógeno que en los otros cultivos.

El compuesto de  $R_f = 0,52$  migra con igual velocidad que una sustancia presente en el medio de cultivo.

Si bien la mancha de  $R_f = 0,74$  está presente en ambas fases de la partición de Folch, en la fase inferior se reveló con vapores de yodo y en la fase superior no.

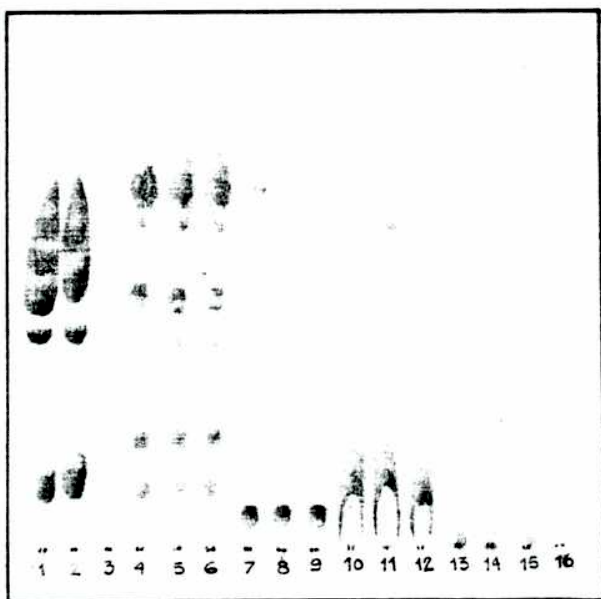
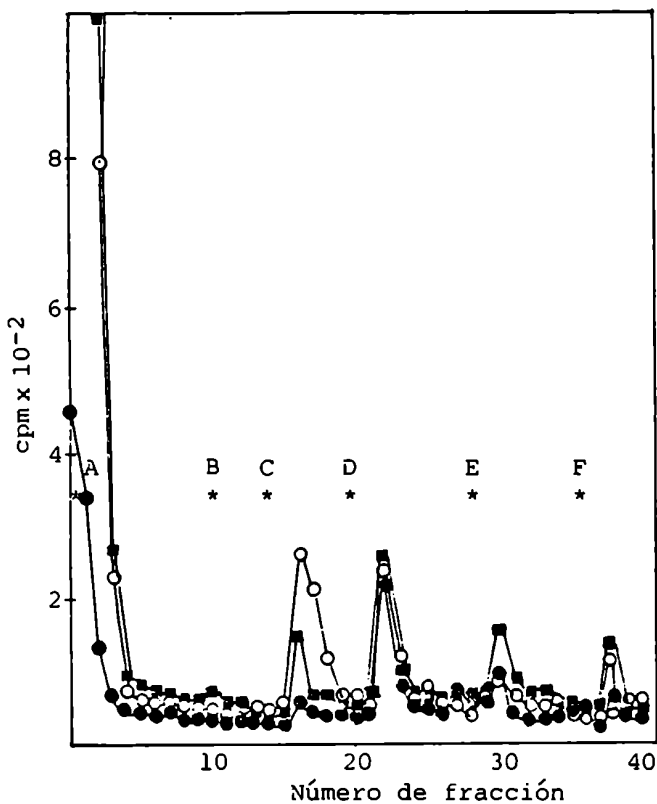


FIGURA 62: Revelado con yodo de la placa de Sílica gel descripta en la Figura 61.

Se reveló con yodo como se describe en II.9.2. la placa correspondiente a la Figura 61. Los carriles son los enumerados en la leyenda de la citada figura.

Para tratar de caracterizar mejor el material presente en la fase inferior y tratar de determinar la presencia o no

de lípidos cargados, se sometió dicho material a una cromatografía en columnas de DEAE-celulosa (II.9.3.).



**FIGURA 63:** Cromatografía de intercambio iónico de los lípidos presentes en la fase inferior marcados a partir de  $^{35}\text{S}$ -Met.

Se sometió la mitad del material presente en la fase inferior procedente del experimento descrito en la Tabla 46 a cromatografía de intercambio iónico. Cultivos controles (○) y tratados con  $\text{E}_2$  (●) o Tam (■). Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

Observando la Figura 63 y la Tabla 48 se aprecia que los perfiles cromatográficos difieren para las tres muestras ensayadas. En el cultivo control el 20 % de la radiactividad eluye con 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3, mientras que en las otras dos muestras ese porcentaje es cercano al 6 %. En la muestra tratada con  $\text{E}_2$  el 11 % de la radiactividad se separa de la columna con C/M/A 10:10:3 siendo dicho porcentaje del 4 % en presencia del antiestrógeno y del 1 % en el control. En las incubaciones con  $^{14}\text{C}$ -Glc se observa un resultado



similar para la mencionada fracción de elución (ver Tabla 42).

Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	853	70,2	3.375	78,0	4.016	84,0
B	0	0,0	13	0,3	46	1,0
C	12	1,0	487	11,2	172	3,6
D	244	20,1	296	6,8	305	6,4
E	77	6,3	92	2,1	196	4,1
F	28	2,3	74	1,7	94	2,0

TABLA 48: Distribución de la radiactividad entre las diferentes fracciones de la columna de DEAE celulosa descrita en la Figura 63.

Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

III.B.1.11.2.d.

Extracto C/M/A

10:10:3 (VII)

Se realiza una cromatografía sobre placa delgada del material marcado con  $^{35}\text{S}$  presente en el extracto C/M/A 10:10:3. En la Figura 61, carril 9, se evidencia que el material radiactivo no migra con el solvente elegido.

III.B.1.12. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS  
RADIOMARCADOS PROVENIENTES  
DE INCUBACIONES DE CELULAS  
T47D-X CON  $^{14}\text{C}$ -GLC Y  $^{35}\text{S}$ -  
MET. EFECTOS DE  $\text{E}_2$  Y TAM

Se decidió reproducir los experimentos desarrollados en células T47D-cl1 en células T47D provenientes del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Louisville, a las que de ahora en adelante denominaremos T47D-X.

Se procede en forma similar a la descrita en III.B.1.11.

#### III.B.1.12.1. INCUBACIONES

CON <sup>14</sup>C-GLC

Las incubaciones y el procesamiento de los incubados se llevaron a cabo según lo descrito en III.B.1.11.1. En la Tabla 49 se muestran los resultados obtenidos.

Puede apreciarse que no se observan diferencias entre las muestras ensayadas, en contraste con el experimento realizado en células T47D-cl1 descrito en la Tabla 41. Comparando con dicho experimento, la incorporación de radiactividad al extracto C/M/A 10:10:3 y a la fracción insoluble en TCA caliente resulta mayor, a diferencia de la transferencia a la fase inferior de la partición de Folch que es menor. Estas diferencias se conservan aun cuando los resultados se expresen por número de células o por mg de proteína.

Se procedió al análisis de los productos radiomarcados presentes en las distintas fracciones previamente detalladas (ver II.2.B.5.b.)

Fracción	Radiactividad (cpm)*		
	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	20.587.300 ± 998.700	21.321.150 ± 309.620	21.280.400 ± 350.400
II	282.400 ± 22.600	337.000 ± 13.000	248.850 ± 8.750
III	65.900 ± 4.300	72.800 ± 600	70.200 ± 200
IV	29.540 ± 580	30.165 ± 385	28.520 ± 100
V	6.125 ± 25	7.015 ± 475	5.190 ± 130
VI	2.390 ± 810	2.860 ± 120	2.400 ± 1.030
VII	2.790 ± 920	2.860 ± 630	2.650 ± 380
VIII	0	0	0
IX	3.335 ± 715	4.380 ± 270	4.390 ± 410
X	18.910 ± 910	16.265 ± 2.145	17.935 ± 5
XI	48.780 ± 9.460	61.620 ± 1.660	54.340 ± 12.220

TABLA 49 : Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a diferentes fracciones de células T47D-X. Efecto de E<sub>2</sub> y Tam.

Se plaquearon 40.000 células en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro en medio A. Se procedió según II.2.B.4. luego de incubar las células durante 6 días en suero libre de esteroides. En el momento de realizar el experimento se determinó el número de células ( $323.125 \pm 1.875$ , n=2) y la cantidad de proteína (500 µg) por cápsula de Petri. Las células se incubaron con 10 µCi de  $^{14}\text{C}$ -Glc durante 3 h. Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II: fase superior; III: fase inferior; IV: fase superior teórica (4 mM MgCl<sub>2</sub>); V: fase superior teórica; VI: metanol 1; VII: C/M/A 10:10:3; VIII: metanol 2; IX: soluble TCA frío; X: soluble TCA caliente; XI: insoluble TCA caliente.

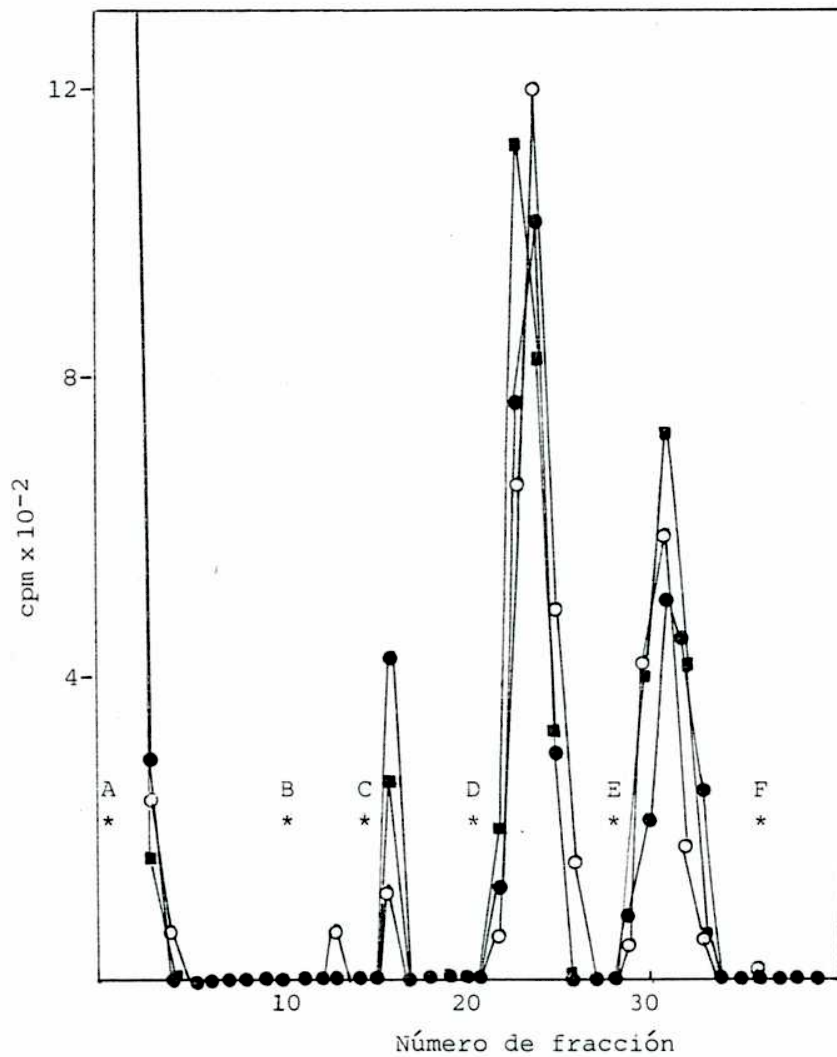
III.B.1.12.1.a..

Fase inferior

(III)

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico (II.9.3.) del material presente en la fase inferior resultante de la partición de Folch.

En la Figura 64 se muestra el perfil cromatográfico obtenido.



**FIGURA 64:** Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa de la fase inferior procedente de incubaciones de células T47D-X con <sup>14</sup>C-Glc.

Se reúnen los duplicados y se siembra aproximadamente la mitad del material presente en la fase inferior del experimento descrito en la Tabla 51. Muestra control (o), trata da con E<sub>2</sub> (●) o con Tam (■). Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

El cromatograma de las tres muestras es similar. La ma-

yor parte de la radiactividad no es retenida por la columna, pero se observan tres picos de elución con C/M/A 10:10:3 y 4 mM y 25 mM de acetato de amonio en dicho solvente. Estos dos últimos picos podrían representar lípido-azúcares mono y difosfatados.

En la Tabla 50 se muestra la distribución de radiactividad en las distintas fracciones eluidas.

Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	46.450	91,7	50.110	92,5	45.460	91,2
B	0	0,0	70	0,1	0	0,0
C	440	0,9	120	0,2	260	0,5
D	2.230	4,4	2.590	4,8	2.500	5,0
E	1.530	3,0	1.260	2,3	1.620	3,2
F	0	0,0	20	0,04	10	0,02

**TABLA 50:** Distribución de la radiactividad en las distintas fracciones de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 64.

Se calcularon los porcentajes de radiactividad eluidos en cada fracción de la columna descrita en la Figura 64. Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

La distribución de radiactividad es similar para las 3 muestras ensayadas, pero es completamente diferente de la obtenida con las células T47D-cl1 (Tabla 42). La incorporación de radiactividad a lípidos cargados es baja (menor al 10 %), en contraste con el 70 % alcanzado previamente.

En el experimento correspondiente a la Tabla 42 no se ob

servaba elución de radiactividad con el solvente C/M/A 10:10:3 en la muestra control, en oposición a lo evidenciado en la Tabla 50.

Se realizó una hidrólisis ácida suave (II.7.) del material presente en la fase inferior. En la Tabla 51 se presentan los valores obtenidos.

Muestra	Radiactividad (cpm)		
	Fase inferior	Fase superior	% de hidrólisis
Control	6.490	525	7,4
Estradiol	7.060	360	4,8
Tamoxifeno	11.390	805	6,6
Dol-P- <sup>14</sup> C-Glc	60	780	92,8

TABLA 51: Tratamiento ácido suave de los glicolípidos presentes en la fase inferior de incubaciones de células T47D-X con <sup>14</sup>C-Glc.

Se realiza la hidrólisis a pH 2 (II.7.) de las muestras control y tratadas con E<sub>2</sub> o Tam y de un patrón de Dol-P-<sup>14</sup>C-Glc de hígado de rata.

El porcentaje de hidrólisis obtenido para la fase inferior es concordante con la proporción de lípidos cargados presentes en dicha fracción (ver tabla 50, fracciones D y E).

Se llevó a cabo una cromatografía sobre placa delgada de los glicolípidos extraídos en la fase inferior. La autorradiografía correspondiente se aprecia en la Figura 65.

Las tres muestras ensayadas muestran similar conducta cromatográfica. Se evidencian sustancias radiactivas de Rf = 0; 0,12; 0,26; 0,41; 0,44; 0,53; 0,59; 0,66; 0,76 y 0,88.

Las que se encuentran en mayor proporción se han denominado I ( $R_f = 0,26$ ), II ( $R_f = 0,41$ ), III ( $R_f = 0,44$ ), IV ( $R_f = 0,53$ ), V ( $R_f = 0,76$ ) y VI ( $R_f = 0,88$ ). El patrón de Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata migró con un  $R_f = 0,55$ .

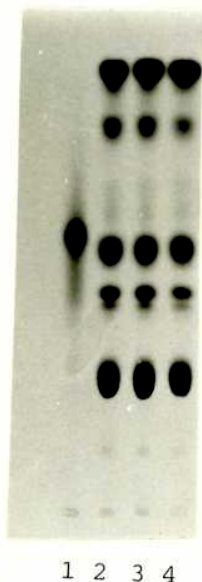


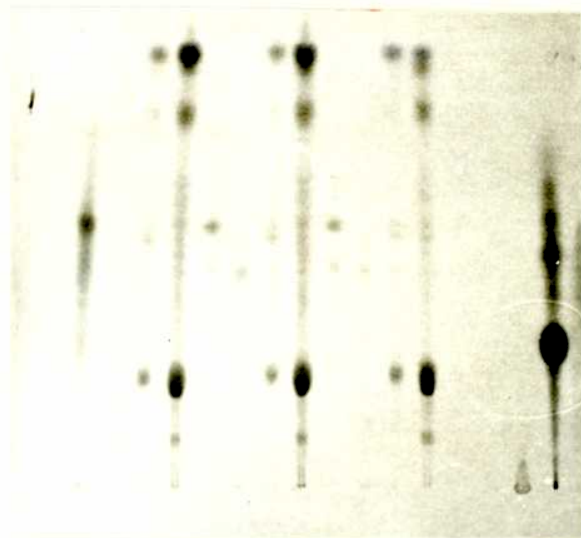
FIGURA 65: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de la fase inferior procedente de incubaciones de células T47D-X con  $^{14}\text{C}$ -Glc.

La cromatografía se desarrolló durante 1 h 45 min en solvente G a  $23^\circ\text{C}$ . El frente recorrió 14,3 cm. La autorradiografía corresponde a 13 días de exposición. Carriles: 1; Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata; 2, 3 y 4: fases inferiores correspondientes a cultivos controles y tratados con  $\text{E}_2$  y Tam respectivamente.

Cuando se realizó una cromatografía sobre placa delgada de los glicolípidos extraídos en la fase inferior previamente separados por medio de una columna de DEAE-celulosa se obtuvo la autorradiografía presentada en la Figura 66.

No se aprecian diferencias entre las muestras ensayadas ya que la menor cantidad de sustancias aparente en los carriles 13 y 14 se deben a inconvenientes en la siembra.

En la Tabla 52 se ilustran los datos de movilidad de las sustancias presentes en cada fracción.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

**FIGURA 66:** Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de los glicolípidos procedentes de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 64.

La cromatografía se desarrolló durante 2 h 10 min a 25°C con solvente G. El frente recorrió 15,9 cm. La autorradiografía corresponde a 30 días de exposición. Carriles: 1: Dol-p- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata; 2: fracciones C reunidas; 3, 7 y 11: fase inferior (3.000 cpm); 4, 8 y 12: fracción A; 5, 9 y 13: fracción D; 6, 10 y 14: fracción E (carriles 3 a 6 corresponden a cultivos control; 7 a 10 a tratados con E<sub>2</sub> y 11 a 14 con Tam); 15: extractos C/M/A 10:10:3 reunidos; 16:  $^{14}\text{C}$ -Glc.

En correspondencia con lo enunciado para la Figura 65, en la fase inferior podemos considerar seis compuestos mayoritarios: I ( $R_f = 0,21$ ); II ( $R_f = 0,42$ ); III ( $R_f = 0,48$ ); IV ( $R_f = 0,51$ ); V ( $R_f = 0,81$ ) y VI ( $R_f = 0,86$ ).

Si observamos las sustancias presentes en la fracción A se comprueba que migran levemente más rápido que las sustan-



cias correspondientes presente en la fase inferior que las incluye.

En la fracción C se evidencia un compuesto no presente en las otras fracciones.

En la fracción D la sustancia predominante migra con  $R_f$  idéntico al obtenido para el patrón de Dol-P-Glc.

Con el solvente E eluye una sustancia común a la fracción D ( $R_f = 0,43$ ) y otra no común ( $R_f = 0,48$ ).

Fracción	$R_f$	Fracción	$R_f$	Fracción	$R_f$
Glc	0,29	A	0,09	C	0,39
			0,21		
Dol-P-Glc	0,52		0,38	D	0,43
			0,43		0,52
Fase inferior	0,21		0,46		0,61
	0,42		0,49		
	0,48		0,53	E	0,43
	0,51		0,57		0,48
	0,81		0,75		
	0,86		0,82		
			0,87		

TABLA 52: Datos de movilidad cromatográfica de las sustancias evidenciadas en la autorradiografía de la Figura 66.

Fracciones de elución: A: C/M 3:2; C: C/M/A 10:10:3; D: 4mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM.

En la Tabla 53 se compara la migración de las sustancias I a IV en forma relativa a la del patrón de Dol-P-Glc en las cromatografías correspondientes a las Figuras 65 y 66.

Sustancia	$R_{Dol-P-Glc}$	
	Figura 65	Figura 66
I	0,47	0,41
II	0,75	0,82
III	0,80	0,94
IV	0,96	0,99
V	1,38	1,57
VI	1,59	1,67

TABLA 53: Posición de migración de las sustancia I a IV relativa a la del patrón de Dol-P-14C-Glc en las Figuras 65 y 66.

Se puede apreciar que salvo para la sustancia I, los  $R_{Dol-P-Glc}$  son mayores en los compuestos cromatografiados en la Figura 66. En dicha cromatografía se sembró menor cantidad de fase inferior. Podría concluirse que la cantidad y la calidad de los lípidos totales sembrados modifican la posición de migración de cada compuesto en particular. En consecuencia no puede descartarse que la sustancia IV que en la Figura 65 migra retrasada con respecto al patrón de Dol-P-Glc puede tratarse de un poliprenil-monofosfato-azúcar. Más aún, el compuesto IV presente en la fase inferior de la Figura 66 tendría correspondencia con el compuesto mayoritario de la fracción D que, al estar purificado, migra con  $R_f$  idéntico al del patrón mencionado.

III.B.1.12.1.b.  
Extracto C/M/A  
10:10:3 (VII)

Se realiza un tratamiento ácido suave (II.7.) de los compuestos extraídos con el solvente C/M/A 10:10:3. En la Tabla 54 se aprecia que el material resultó sumamente sensible a la hidrólisis a pH 2, conducta característica de los poliprenil-pirofosfato-azúcares selectivamente solubles en el solvente C/M/A 10:10:3 (321).

Muestra	Radiactividad (cpm)		% de hidrólisis
	Fase inferior	Fase superior	
Control	20	200	91
Estradiol	110	610	85
Tamoxifeno	50	445	89

TABLA 54: Tratamiento ácido suave de las sustancias presentes en el extracto C/M/A 10:10:3 proveniente de incubaciones de células T47D-X con  $^{14}\text{C}$ -Glc.

Cuando se cromatografió sobre capa delgada con solvente G el extracto en cuestión, el material radiactivo permaneció en el origen o migró escasos mm de éste (Figura 66, carril 15). Esta conducta también sería compatible con la de un Dol-PP-o-ligosacárido.

#### III.B.1.12.2. INCUBACIONES

##### CON $^{35}\text{S}$ -MET

El ensayo se efectuó en forma paralela al descrito en II.B.1.12.1., incubando las células con  $^{35}\text{S}$ -metionina (ver II.2.B.4.). Se proceu

só según II.2B.5.b. y se determinó la radiactividad presente en cada fracción, lo que se ilustra en la Tabla 55.

Fracción	Radiactividad (cpm)*		
	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	32.938.000 ± 969.000	31.615.600 ± 45.800	31.472.100 ± 52.900
II	301.450 ± 21.450	340.000 ± 33.200	309.250 ± 2.150
III	53.050 ± 550	52.900 ± 1.400	70.250 ± 750
IV	37.960 ± 10.340	41.360 ± 2.010	38.465 ± 1.095
V	96.355 ± 36.595	61.755 ± 13.635	106.300 ± 44.050
VI	9.135 ± 3.515	17.580 ± 5.470	
VII	12.260	6.695	14.520
VIII	680	1.210	1.360
IX	37.380 ± 20	45.165 ± 6.265	38.720 ± 255
X	737.580	732.370	774.030
XI	6.787.240 ± 2.573.560	10.990.340 ± 2.367.100	8.203.660 ± 92.460
II +IV+V	435.765 ± 68.385	459.815 ± 65.545	454.075 ± 40.805

**TABLA 55:** Incorporación de  $^{35}\text{S}$ -Met a diferentes fracciones de células T47D-X.

Se procedió como se indica en la Tabla 49 incubando las células con  $10\mu\text{Ci}$  de  $^{35}\text{S}$ -Met. Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II: fase superior; III: fase inferior; IV: fase superior teórica ( $4\text{ mM MgCl}_2$ ); V: fase superior teórica; VI: metanol 1 VII: C/M/A 10:10:3; VIII: metanol 2; IX: soluble TCA frío; X: soluble TCA caliente; XI: insoluble TCA caliente.

Aunque la mayor parte de la radiactividad se asocia al material insoluble en TCA, se observa, en forma similar a lo descrito para células T47D-cl1 (Tabla 46), que hay incorporación de  $^{35}\text{S}$  en todas las fracciones estudiadas.

La Tabla 56 muestra la relación  $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$  en las diferentes fracciones.

No se observan mayores diferencias entre las muestras estudiadas.

Fracción	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	0,62	0,67	0,68
II + IV + V	0,73	0,81	0,62
III	1,24	1,38	1,00
VII	0,23	0,42	0,18
IX + X	0,029	0,026	0,027
XI	0,007	0,006	0,007

TABLA 56: Relación entre  $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$  en las diferentes fracciones de células T47D-X incubadas con  $^{14}\text{C}$ -Glc y  $^{35}\text{S}$ -Met.

Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II + IV + V: fase superior y lavados con fase superior teórica; III: fase inferior; VII: C/M/A 10:10:3; IX + X: TCA soluble; XI: insoluble TCA caliente.

En la Tabla 55 se evidencia que la incorporación de  $^{35}\text{S}$ - a la fase inferior se incrementa un 32 % en presencia de Tam. Este resultado es concordante con el obtenido para células T47D-cl1 (Tabla 46) y se acompaña de una incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc no modificada (Tabla 49).

Con respecto al extracto C/M/A 10:10:3 (fracción VII), en los cultivos tratados con  $\text{E}_2$  es menor la incorporación que en los incubados en presencia de Tam, lo que produce una relación  $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$  de casi el doble para las células T47D-X tratadas con el estrógeno. Esto concuerda con los resultados presentados para células T47D-cl1 (Tabla 47).

En cuanto a la incorporación a la fracción glicoproteica (fracción XI), no se aprecian diferencias entre las tres muestras en cuestión.

Se procedió al análisis de los productos radiomarcados presentes en las distintas fracciones previamente detalladas (II.2.B.5.b.)

III.B.1.12.2.a.

Medio de cultivo

(I)

Se efectuó una cromatografía sobre capa delgada (II.9.2.) del material presente en el medio de cultivo de células T47D-x con  $^{35}\text{S}$ -Met.

En la Figura 67, carriles 5 a 7 se aprecian los resultados obtenidos.



FIGURA 67: Autorradiografía de la cromatografía sobre capa delgada de diferentes fracciones correspondientes a incubaciones de células T47D-X con  $^{35}\text{S}$ -Met.

Se realizó una cromatografía en solvente G durante 1h 45 min a 23°C. El frente recorrió 14,3 cm. La autorradiografía corresponde a 13 días de exposición. Carriles: 1,2,3: fracción II (1/20 del total) de control, E<sub>2</sub> y Tam; 4:  $^{35}\text{S}$ -Met; 5,6,7: fracción I (1/1.000 del total), control, E<sub>2</sub> y Tam. Se corrió simultáneamente un patrón de Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc que migró con  $R_f = 0,55$ .

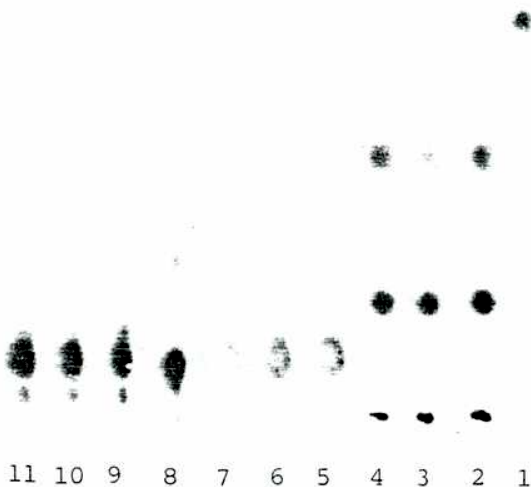
No se detectan diferencias entre las tres muestras estudiadas. Se observa preponderantemente una mancha de  $R_f = 0,07$ , algo mayor que el del patrón de  $^{35}\text{S-Met}$  (0,06). Esta diferencia podría atribuirse a la existencia en el medio de cultivo de compuestos que alteran la migración del aminoácido. También se observa, en menor proporción, sustancias de  $R_f = 0,03$ ; 0,29; 0,63 y 0,70. En el patrón de Met se aprecian manchas apenas evidentes de  $R_f = 0,28$ ; 0,56, 0,63 y 0,70.

La de  $R_f = 0,29$  en el medio de cultivo correspondería a la de 0,28 en el patrón, considerando las razones ya expuestas.

Se realizó otra cromatografía sobre capa delgada en idénticas condiciones, cuya autorradiografía se presenta en la Figura 68.

FIGURA 68: Autorradiografía de la cromatografía sobre capa delgada de diferentes fracciones procedentes de incubación de células T47D-X con  $^{35}\text{S-Met}$ .

Se realizó una cromatografía en solvente G durante 2 h 10 min a  $19^\circ\text{C}$ . El frente recorrió 15,3 cm. La autorradiografía corresponde a 12 días de exposición. Carriles: 1: Dol-P- $^{14}\text{C-Glc}$  de hígado de rata; 2,3,4: III (1/3 del total), control, E2 y Tam; 5,6,7: II (1/20 del total) control, E2 y Tam; 8:  $^{35}\text{S-Met}$ ; 9,10,11: I (1/1.000 del total) control, E2 y Tam.



Puede apreciarse que tanto en el medio de cultivo como en el patrón de Met hay variaciones con respecto a la cromatografía descrita en la Figura 67. Estas modificaciones se atribuyen al ciclo adicional de congelamiento y descongelamiento que sufrieron las sustancias cromatografiadas en la Figura 68. En el patrón de Met se aprecia que, además de la mancha específica del aminoácido ( $R_f = 0,06$ ) se observan sustancias de  $R_f = 0,29$  y  $0,57$ . Las sustancias de  $R_f = 0,63$  y  $0,70$  apreciables en la Figura 67 desaparecen coincidentemente con la aparición de sustancias de  $R_f = 0,20$ ,  $0,33$  y  $0,52$ . La mancha de  $R_f = 0,20$  es especialmente notable.

Con respecto al medio de cultivo, se conservan las sustancias de  $R_f = 0,03$ ;  $0,08$  (interpretada como Met) y  $0,29$ , mientras que aparecen sustancias de  $R_f = 0,33$  y  $0,52$  concomitantemente con la desaparición de compuestos de  $R_f = 0,63$  y  $0,70$ .

Puede apreciarse que el proceso de degradación sufrido por el medio de cultivo es semejante al del aminoácido radiactivo.

En la Figura 70, carril 8, se aprecia un perfil cromatográfico esencialmente idéntico al descrito en la Figura 68.

III.B.1.12.2.b.

Fase superior

(II)



Se cromatografió sobre capa delgada el material presente en la fase superior de la partición de Folch de células T47D-X incubadas con  $^{35}\text{S}$ -Met. En la Figura 67, carriles 9 a 11, se aprecian leves diferencias entre las tres muestras, en parte coincidentes con las mucho más importantes observadas para células T47D-cl1 (ver Figura 61, carriles 10 a 12).

El compuesto que permanece en el origen presenta menor intensidad para la muestra tratada con Tam que para el control, y éste, a su vez, menos que para los cultivos conducidos con  $\text{E}_2$ .

La mancha de  $R_f = 0,07$  es más evidente para cultivos en presencia del estrógeno, luego para el control y finalmente para los tratados con el antiestrógeno.

Con  $R_f = 0,14$  migra una sustancia que con Tam es menos aparente que en las otras dos muestras.

La sustancia de  $R_f = 0,32$  es más intensa en células tratadas con Tam que con  $\text{E}_2$ , que a su vez es mayor que en el control.

El compuesto de  $R_f = 0,61$  es más notable en los cultivos con el antiestrógeno.

Las sustancias que migran con  $R_f = 0,18$  y  $0,43$  no muestran variaciones entre las tres muestras.

Se realizó una nueva cromatografía sobre placa delgada en iguales condiciones. La Figura 68, carriles 5 a 7 muestra

la autorradiografía correspondiente.

Comparando los resultados presentados en las Figuras 67 y 68 pueden hacerse las mismas consideraciones que con respecto al medio de cultivo. La sustancia de  $R_f = 0,33$  es notoriamente más evidente en la Figura 68, en contraste con lo que sucede para la de  $R_f = 0,58$  de igual  $R_{Dol-P-Glc}$  (1,1) que la de  $R_f = 0,61$  en la Figura 67. En la segunda cromatoplaaca aparece un compuesto de  $R_f = 0,27$  al tiempo que desaparece uno de  $R_f = 0,43$  presente en la primera placa.

Con respecto a las diferencias entre las tres muestras son similares a las descritas en la Figura 67. La mancha de  $R_f = 0,33$ , ahora intensificada, es más evidente para los cultivos en presencia de Tam.

En la Figura 70, carril 9, se muestra otro perfil cromatográfico de las fases superiores, coincidente con el observado en la Figura 68.

III.B.1.12.2.c.

Fase inferior

(III)

El material lipídico presente en la fase inferior de la partición de Folch marcado a partir de  $^{35}\text{S}$ -Met se sembró en placa delgada. La autorradiografía correspondiente se presenta en la Figura 68, carriles 2 a 4.

Se observa la aparición de numerosas manchas de  $R_f = 0$ ; 0,06; 0,14; 0,20; 0,22; 0,27; 0,34; 0,39; 0,44; 0,55; 0,60; 0,65; 0,78 y 0,84.

Se evidencian algunas diferencias entre las tres muestras ensayadas. El compuesto de  $R_f = 0,27$  está en mayor proporción en células tratadas con  $E_2$ , en contraste con el de  $R_f = 0,34$  que en dichas células es menor que en el control y en éste menor, a su vez, que en cultivos en presencia de Tam. La mancha de  $R_f = 0,44$  es levemente menor en las células incubadas con el estrógeno.

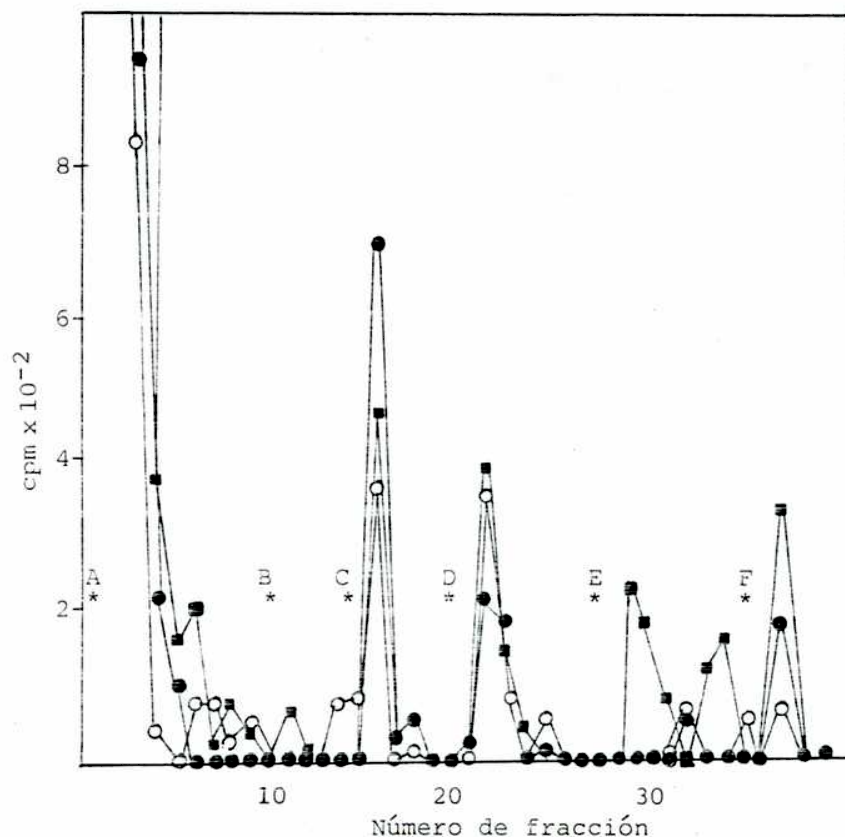
El perfil cromatográfico tiene puntos en común con el obtenido para las fases inferiores procedentes de células T47D-c11 incubadas con  $^{35}\text{S}$ -Met (ver Figura 61, carriles 4 a 6).

Una cromatografía similar de las muestras reunidas mostró un cromatograma semejante (Figura 70, carril 2).

Se realizó una cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa (II.9.3.) del material presente en la fase inferior con el objeto de determinar la existencia o no de lípidos cargados. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura 69.

Aunque la mayor parte del material no es retenido por la columna se observa en las tres muestras la aparición de picos radiactivos eluidos con C/M/A 10:10:3 y con 5, 25 y 200 mM de acetato de amonio en el mismo solvente. Esto es concordante con lo acontecido para ensayos similares con células T47D-c11

(ver Figura 63). A diferencia del ensayo mencionado, en las células T47D-X aparece en el control un pico de elución correspondiente al solvente C (C/M/A 10:10:3).



**FIGURA 69:** Cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa de la fase inferior proveniente de incubaciones de células T47D-X con  $^{35}\text{S}$ -Met.

Se reunieron los duplicados y se sembró aproximadamente la mitad del material proveniente del experimento descrito en la Tabla 55, en columnas de DEAE-celulosa. Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM. Cultivos controles (o) o tratados con  $\text{E}_2$  (●) o Tam (■).

En la Tabla 57 se muestra la distribución porcentual de radiactividad en las distintas fracciones de elución.

Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	30.880	95,4	24.850	95,1	36.790	93,8
B	0	0,0	80	0,3	60	0,2
C	780	2,4	470	1,8	660	1,7
D	440	1,4	510	2,0	580	1,5
E	60	0,2	140	0,5	790	2,0
F	190	0,6	70	0,3	340	0,9

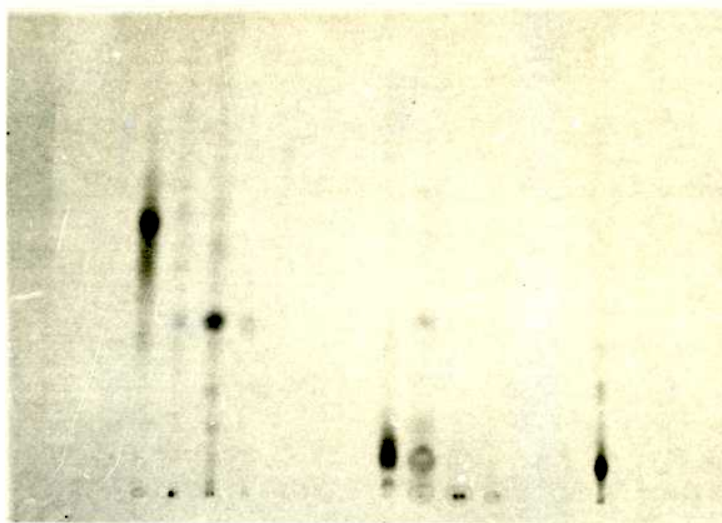
TABLA 57: Distribución de la radiactividad en las diferentes fracciones de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 69.

Fracciones: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: 25 mM idem; F: 200 mM idem.

Analizando la Figura 69 y la Tabla 57 no se aprecian diferencias apreciables entre las muestras, a excepción de una mayor proporción de sustancias eluidas con solvente E en las células tratadas con Tam.

En forma paralela a lo acontecido para células T47D-X en incubaciones con  $^{14}\text{C}$ -Glc (Tabla 50), es mayor la proporción de lípidos neutros con respecto a iguales incubaciones con células T47D-cll (ver Tablas 42 y 48).

Se efectuó una cromatografía sobre placa delgada de las distintas fracciones eluidas de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 69. La autorradiografía correspondiente se presenta en la Figura 70.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

FIGURA 70: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de diferentes fracciones correspondientes a incubaciones de células T47D-X con  $^{35}\text{S}$ -Met.

Se realizó una cromatografía en solvente G durante 2 h a  $25^{\circ}\text{C}$ . El frente recorrió 14,4 cm. La autorradiografía corresponde a 30 días de exposición. Carriles: 1: Dol-P- $^{14}\text{C}$ -Glc de hígado de rata; 2: III (1/100 del total); 3 a 7: fracciones procedentes de la columna descrita en la Figura 69: 3: A; 4: C; 5: D; 6: E; 7: F; 8: I control (1/2000 del total); 9: II (1/40 del total); 10: IV (1/100 del total); 11: V (1/200 del total); 12: VI (1/100 del total); 13: VII (1/100 del total); 14:  $^{35}\text{S}$ -Met. En los carriles 2 a 13 (excepto el 8) se reunieron las muestras control y tratadas con  $\text{E}_2$  y Tam)

En la fracción no retenida por la columna se observa la aparición de compuestos de  $R_f = 0,07; 0,13; 0,20; 0,34$  (el más importante);  $0,49; 0,57; 0,61$  y  $0,87$ . En la fracción C las

manchas de  $R_f = 0,06$ ;  $0,32$  y  $0,34$  podrían ser remanentes del material correspondiente a la fracción A. Con el solvente D e luyen dos sustancias de  $R_f = 0,68$  y  $0,85$ , exclusivas de esta fracción. Con la máxima concentración de acetato de amonio (F) aparece un compuesto de  $R_f = 0,27$  no detectado en las otras fracciones.

III.B.1.12.2.d.  
Lavados con fase  
superior teórica  
con (IV) o sin (V)  
4 mM MgCl<sub>2</sub> y con  
metanol (VI)

Se sembraron en la cromatoplaqa descrita en la Figura 70 alícuotas correspondientes a los lavados con fase superior teórica 4 mM MgCl<sub>2</sub> (carril 10), con fase superior teórica (carril 11) y con metanol (carril 12).

En los lavados con 4 mM MgCl<sub>2</sub> en fase superior teórica a parecen sustancias de  $R_f = 0,07$  y  $0,35$ , coincidentes con las más intensas detectadas en la fase superior (carril 9). En el lavado posterior con fase superior teórica sin agregado salino, se observa un remanente de la sustancia que permanecía en el origen, en idéntica forma que lo ocurrido para los lavados con metanol.

III.B.2. ESTUDIOS SOBRE LA LINEA CELULAR MCF-7III.B.2.1. INCORPORACION DE  $^3\text{H}$ -GLCN A  
FRACCIONES LIPIDICAS Y GLI-  
COPROTEINAS. EFECTO DE  $\text{E}_2$   
Y TAM

Se incubaron células MCF-7 con  $^3\text{H}$ -GlcN. Se analizó la incorporación a fracciones lipídicas y proteicas y la influencia del  $\text{E}_2$  y el Tam sobre dicha incorporación.

En la Tabla 58 se aprecia el efecto de distintas concentraciones del estrógeno.

Condiciones	Radiactividad (cpm)*	
	Fase inferior	Insoluble TCA $\emptyset$
Control	1.049 $\pm$ 107	1.454 $\pm$ 169
$\text{E}_2$ $10^{-10}$ M	1.064 $\pm$ 32	1.554 $\pm$ 186
$\text{E}_2$ $10^{-9}$ M	1.110 $\pm$ 39	1.485 $\pm$ 127
$\text{E}_2$ $10^{-7}$ M	1.009 $\pm$ 288	1.494 $\pm$ 96
$\text{E}_2$ $10^{-6}$ M	690 $\pm$ 40	972 $\pm$ 20

TABLA 58: Efecto de la concentración de  $\text{E}_2$  sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -GlcN a lípido-azúcares y glicoproteínas.

Se plaquearon las células en 1ml de medio A en cápsulas de Petri de 35mm. Luego de 4 días de ayuno se colocaron en MEM + 1mg/ml de albúmina sérica bovina + 0,1mg/ml de Glc por 1h, momento en el cual se añade el  $\text{E}_2$ . Luego de 2h se añaden 7  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -GlcN y la incubación se continúa por 5h.

\*: Media  $\pm$  ES (n=2).



En otro ensayo se estudió el efecto sobre los parámetros mencionados del antiestrógeno Tam. En la Tabla 59 se muestran los resultados alcanzados. Puede comprobarse que el antiestrógeno inhibe la incorporación del azúcar radiactivo a glicolípidos y glicoproteínas en un 41 y 31 % respectivamente.

Condiciones	Radiactividad (cpm)*	
	Fase inferior	Insoluble TCA Ø
Control	13.010 ± 2.780	4.018 ± 436
Tamoxifeno	7.670 ± 520	2.757 ± 220

TABLA 59: Efecto del Tam sobre la transferencia de  $^3\text{H}$  GlcN a glicoproteínas y lípido-azúcares.

Las células se plaquearon en macrowells en medio A. Tres días después el medio se reemplazó por medio definido I donde se las cultivó durante 3 días. El ensayo se realizó según lo descrito en la Tabla 58, añadiendo 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -GlcN y continuando la incubación por 3h. \*: Media  $\pm$  ES (n=2).

### III.B.2.2. ANALISIS DE LOS PRODUCTOS

#### RADIOMARCADOS PROVENIENTES

#### DE INCUBACIONES CON $^{14}\text{C}$ -GLC.

#### EFFECTO DE $\text{E}_2$ Y TAM

El objetivo de los trabajos que se expondrán a continuación ha sido tratar de detectar la presencia de intermediarios lipídicos en la síntesis de glicoproteínas en células MCF-7.

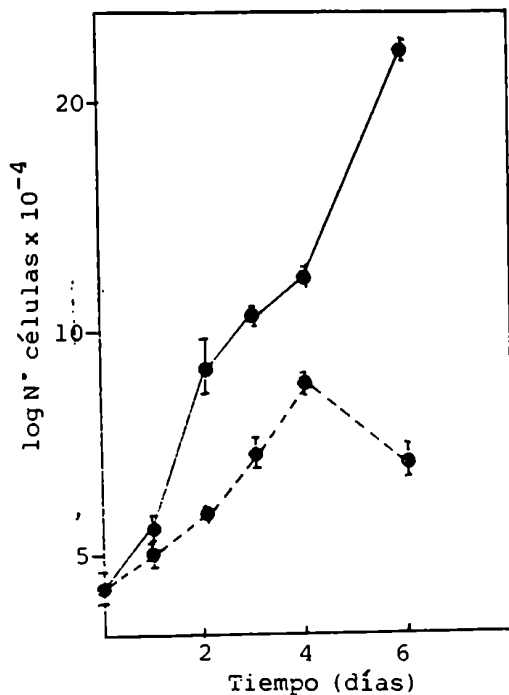
En forma similar a la descrita para células T47D se emprendió la caracterización de los distintos productos radio-marcados originados por incubación de las células con  $^{14}\text{C}$ -Glc, analizándose la posible influencia del  $\text{E}_2$  y el Tam sobre los procesos metabólicos en cuestión.

Debido a la falta de respuesta estrogénica observada en las células T47D y preliminarmente en las MCF-7, se decidió incubar las células en un medio definido libre de suero, para descartar el posible efecto del  $\text{E}_2$  remanente en el suero luego del tratamiento del mismo con carbón (348).

Como base del medio definido V se utiliza el medio DMEM (351,352). En dicho medio se incluyó insulina, ya que es ta demostrado que la hormona estimula el crecimiento de células MCF-7 cultivadas en ausencia de suero (303,353), lo que es consistente con su conocido efecto mitogénico (354).

Las células que crecen en un medio libre de suero tienen dificultad para adherirse al vidrio. En el proceso de adhesión están involucradas las proteínas, por lo que el medio a ensayar se suplementó con 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (300).

Para conocer el efecto del nuevo medio sobre los cultivos celulares se realizaron curvas de crecimiento en medio de finido o suplementado con suero de acuerdo a lo descrito en II.2.B.2. Las curvas correspondientes se presentan en la Figura 71.



**FIGURA 71:** Curva de crecimiento de células MCF-7 cultivadas en medio definido o suplementado con suero.

Se plaquearon 40.000 células en cajas de Petri de 35mm en medio B. A las 24h se cambió el medio por medio B (—) o medio B sin suero + 1 mg/ml de albúmina sérica bovina (---). Se procede según II.2.B.3.

Observando la Figura 71 se aprecia que las células mantenidas con medio definido V crecen durante cuatro días aunque a menor velocidad que las células cultivadas en presencia de suero. Luego del cuarto día se produce una brusca interrupción del crecimiento celular.

En consecuencia, los experimentos deben realizarse con no más de 3-4 días de privatización de suero.

Las células se incubaron con <sup>14</sup>C-Glc como se describe en II.2.B.5.b., determinándose la radiactividad presente en cada fracción lo que se muestra en la Tabla 60.

La transferencia del azúcar a la fase inferior disminuye en presencia de E<sub>2</sub> y Tam en un 21 y 30 %, respectivamente.

Con respecto a la fracción resistente al tratamiento con TCA caliente, las diferencias entre los duplicados no permiten extraer demasiadas conclusiones. Lo que sí resulta aparente es la menor incorporación a dicha fracción proteica en células tratadas con el estrógeno.

Fracción	Radiactividad (cpm)*		
	Control	Estradiol	Tamoxifeno
I	25.320.600 ± 379.400	27.210.600 ± 906.600	26.450.600 ± 92.600
II	443.850 ± 10.950	367.375 ± 1.925	321.300 ± 31.800
III	167.160 ± 11.480	131.880 ± 9.240	116.900 ± 13.860
IV+V	142.820 ± 31.200	130.940 ± 6.840	69.330 ± 21.410
VI	15.240 ± 2.480	13.330 ± 10	14.745 ± 585
VII	6.830 ± 300	4.800 ± 60	4.750 ± 590
VIII	258 ± 82	120 ± 60	225 ± 90
IX	13.985 ± 4.695	8.600 ± 3.090	10.400 ± 1.100
X	177.290 ± 24.630	139.950 ± 910	115.860 ± 800
XI	113.860 ± 16.300	65.660 ± 1.960	100.130 ± 29.990

TABLA 60: Incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a diferentes fracciones de células MCF-7.

Se plaquearon 40.000 células en cápsulas de Petri de 35 mm de diámetro en medio B. Luego de incubar las células durante 3 días en medio definido V se procede según II.2.B.4.b. En el momento de realizar el experimento se determinó el número de células ( $550.625 \pm 17.25$ ;  $n=2$ ) y la cantidad de proteínas (572  $\mu\text{g}$ ) por cápsula de Petri. Las células se incubaron con 10  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -Glc durante 3 h. Fracciones (según II.2.B.5.b.): I: medio de cultivo; II: fase superior; III: fase inferior; IV y V: lavados con fase superior teórica; VI: metanol 1; VII: C/M/A 10:10:3; VIII: metanol 2; IX: soluble TCA frío; X: soluble TCA caliente; XI: insoluble TCA.

Se emprendió el análisis de los productos radiomarcados asociados a las distintas fracciones previamente detalladas (ver II.2.B.5.b.)

III.B.2.2.1. Medio de cultivo (I)

Se efectuó una cromatografía sobre placa delgada (II.9.2.) del material presente en el medio de cultivo. En la misma placa se sembraron patrones de GlcN, ácido glucurónico, Gal, Glc, Sac y Man, cuyos  $R_f$  fueron de 0,02; 0,34; 0,40; 0,42; 0,44 y 0,44 respectivamente.

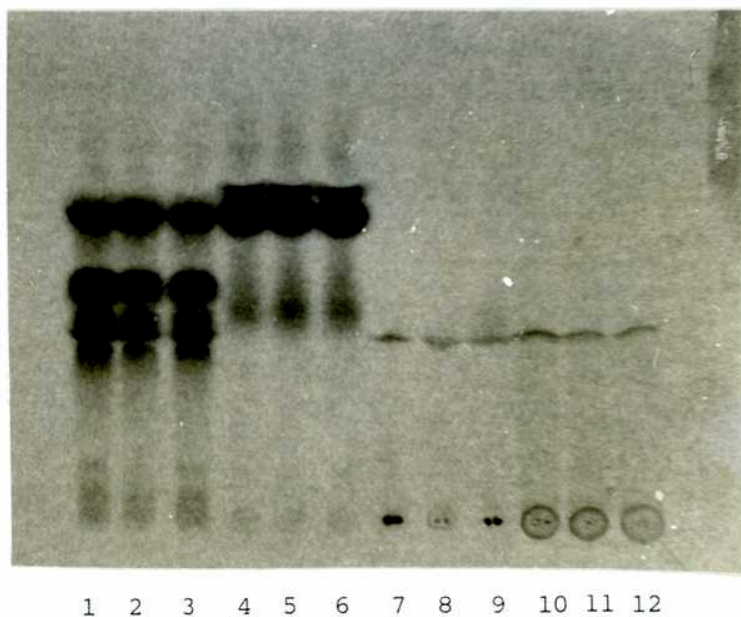


FIGURA 72: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de las fracciones hidrosolubles provenientes de incubaciones de células MCF-7 con  $^{14}\text{C}$ -Glc.

Se realizó una cromatografía en solvente H durante 2 h a  $25^{\circ}\text{C}$ . El frente recorrió 14,3 cm. La autorradiografía corresponde a 7 días de exposición. Carriles: 1,2,3: II (1/10 del total); 4,5,6: I (1/500 del total); 7,8,9: IX (total); 10,11,12: X (total). Corresponden a cultivos controles: 1,4,7 y 10; a tratados con  $\text{E}_2$ : 2,5,8 y 11; y a tratados con Tam: 3,6,9 y 12. Se muestra la posición de migración de patrones de GlcN, ácido glucurónico, Gal, Glc, Sac y Man.

En la Figura 72, carriles 4 a 6 se observa la presencia de sustancias con  $R_f = 0,06; 0,29; 0,42; 0,47; 0,52$  y  $0,57$ . La mancha más importante es la de  $R_f = 0,42$  que es coincidente con la posición de migración de Glc, azúcar con que se realizó el ensayo de marcación. A pesar de que hubo activa metabolización hacia otras sustancias, este proceso fue menos activo que para células T47D-cl1 (ver Figura 54, carriles 1 a 3), en donde la mayor parte de la radiactividad se concentró en un compuesto de  $R_f = 0,29-0,31$  y sólo una pequeña parte correspondió a Glc.

No se encontraron diferencias entre las tres muestras ensayadas.

#### III.B.2.2.2. Fase superior (II)

En la Figura 72, carriles 1 a 3 se presenta la cromatografía sobre capa delgada del material asociado a la fase superior de la partición de Folch.

Las tres muestras presentan un perfil cromatográfico similar, observándose sustancias de  $R_f = 0,03; 0,08; 0,24; 0,26; 0,29; 0,33; 0,42; 0,49$  y  $0,52$ . A diferencia de lo que ocurre en el medio de cultivo la sustancia que se presenta en mayor concentración es una de  $R_f = 0,33$ , no presente en dicho medio.

El resultado es coincidente con el observado para células T47D-cl1 (figura 54, carriles 4 a 6) aunque para dichas

células la Glc remanente está en mayor proporción, como ocurre también en el medio de cultivo.

III.B.2.2.3. Fase inferior  
(III)

Se realizó una

cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa (II.9.3.) de las fases inferiores procedentes de células MCF-7 controles o tratadas con  $E_2$  o Tam.

En la Figura 73, D, puede apreciarse que la mayor parte de la radiactividad no es retenida por la columna o es eluída de la misma con 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3, solvente en el que eluye un patrón de Dol-P- $^{14}C$ -Glc (ver Figura 55, D). En tal sentido, las tres muestras presentan igual conducta.

Cuando se grafica variando la escala (Paneles A, B y C) se aprecian picos de radiactividad menores que eluyen con los solventes B, C y E.

De la Tabla 61 puede deducirse que la distribución de la radiactividad es similar para las tres muestras analizadas.

Sin embargo, el pequeño incremento en la fracción eluída con C/M/A 10:10:3 (C) en células tratadas con  $E_2$  y con solvente E en cultivos en presencia de Tam, sería coincidente con lo observado para células T47D-cll (Tabla 42). Comparando con dichos experimentos, en células MCF-7 es mucho menor la proporción de radiactividad asociada a lípidos cargados.

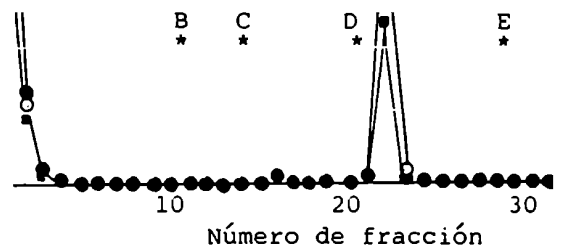


FIGURA 73: Cromatografía de intercambio iónico de la fase inferior procedente de incubaciones de células MCF-7 con  $^{14}\text{C}$ -Glc.

Se reunieron los duplicados de la fracción III (ver Tabla 60) y la mitad del volumen obtenido se sembró en columnas de DEAE-celulosa. Paneles: A: muestra control; B: células tratadas con  $\text{E}_2$ ; C: tratadas con Tam; D: células control (●) y tratadas con  $\text{E}_2$  (○) o Tam (■). Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.



Fracción	Control		Estradiol		Tamoxifeno	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
A	141.960	79,0	124.160	76,8	102.240	78,3
B	210	0,11	60	0,04	200	0,15
C	1.460	0,8	1.950	1,2	1.140	0,9
D	35.490	19,7	34.800	21,5	26.300	20,1
E	400	0,22	630	0,38	670	0,51
F	0	0,0	130	0,08	0	0,0

TABLA 60: Distribución de la radiactividad en las distintas fracciones de la columna de DEAE-celulosa descrita en la Figura 73.

Pasos de elución: A: C/M 3:2; B: C/M 1:1; C: C/M/A 10:10:3; D: 4 mM acetato de amonio en C/M/A 10:10:3; E: idem 25 mM; F: idem 200 mM.

Se reunieron las fracciones eluidas con cada solvente y se eliminaron las sales por partición de Folch (II.2.B.5.). Se sembraron disueltas en C/M 3:2 en una placa delgada de Sílica gel (II.9.2.). Esta se cromatografió con solvente G y en la Figura 74 se presenta la autorradiografía obtenida.

En la Tabla 62 se muestran los  $R_f$  de las sustancias radiactivas presentes en cada fracción.

Puede apreciarse que en la fracción A la sustancia que migra con  $R_f = 0,32$  está en mayor proporción en los cultivos sujetos a tratamiento hormonal que en el control.

En la fracción C hay una evidente diferencia en la distribución de la radiactividad: la mancha de  $R_f = 0,25$  es más intensa en el control que en las otras dos muestras, mientras que la de  $R_f = 0,49$  es menor en la muestra tratada con Tam que en las otras dos.

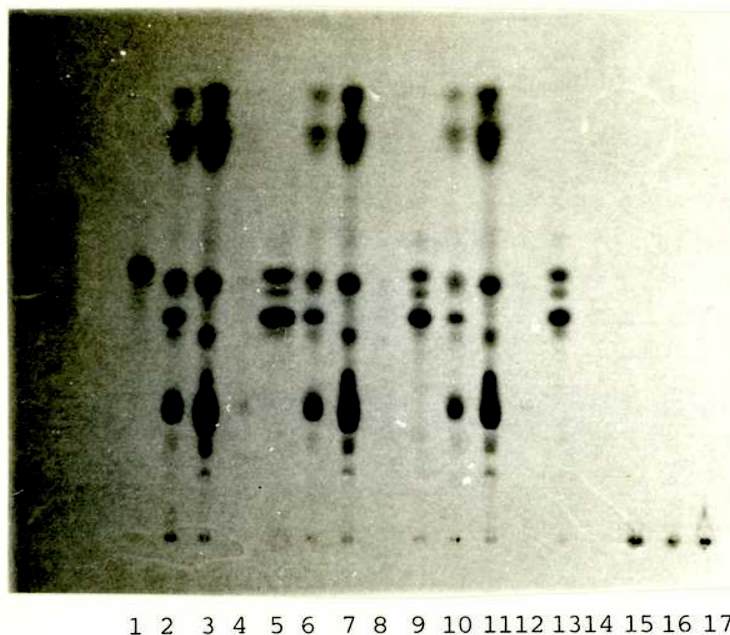


FIGURA 74: Autorradiografía de la cromatografía sobre placa delgada de los lípido-azúcares eluidos de la columna de DEAE descrita en la Figura 73.

La cromatografía se desarrolló durante 2 h a 25°C con solvente G. El frente recorrió 14,6 cm. La autorradiografía corresponde a 30 días de exposición. Carriles: 1: Dol-P-<sup>14</sup>C-Glc de hígado de rata; 2 a 5: células control; 6 a 9: tratadas con E<sub>2</sub>; 10 a 13: con Tam; 2,6,10: fase inferior (1/4 del total); 3,7,11: A; 4,8,12: C; 5,9,13: D; 14: fracciones E reunidas; 15,16,17: extractos C/M/A 10:10:3 (1/2 del total) de control, E<sub>2</sub> y Tam respectivamente.

No puede descartarse que ambas sustancias, así como la de  $R_f = 0,77$  representen remanentes de la fracción A, a pesar de que entre ambas fracciones se eluyó con solvente B, fracción en la cual casi no se detectó radiactividad.

Fracción	R <sub>f</sub>	Fracción	R <sub>f</sub>	Fracción	R <sub>f</sub>
Dol-P-Glc	0,51	A	0,12	D	0,19
			0,17		0,36
Fase inferior	0,03		0,24		0,39
	0,12		0,32		0,42
	0,19		0,39		0,48
	0,25		0,49		0,51
	0,39		0,58		0,58
	0,42		0,74		0,62
	0,49		0,77		
	0,58		0,85	E	0,44
	0,74				0,50
	0,77	C	0,25		
	0,85		0,37		
			0,49		
			0,61		
			0,77		

TABLA 62: Datos de movilidad de las sustancias evidenciadas en la autorradiografía presentada en la Figura 74.

En todas las muestras se observa en la fracción D la presencia de un compuesto de idéntico R<sub>f</sub> (0,51) que el patrón de Dol-P-<sup>14</sup>C-Glc.

Con respecto a los resultados obtenidos en la fracción D para las tres líneas celulares estudiadas (MCF-7: Figura 74; T47D-cl1: Figura 56 y T47D-X: Figura 66), en las células T47D-X y MCF-7, el compuesto que se presenta en mayor proporción es el de R<sub>f</sub> = 0,41-0,43, mientras que para las T47D-cl1 estaría en segundo lugar. En cuanto al compuesto que migra con R<sub>Dol-P-Glc</sub> 0,99-1, es predominante en las células T47D-cl1 y el segundo en orden de importancia en las otras dos.

En las células MCF-7 se observa una sustancia (tercera

en importancia) de  $R_{Dol-P-Glc} = 0,93$  no presente en las otras líneas. Un compuesto de  $R_f = 0,76-0,77$  se evidencia en células MCF-7 (cuarto lugar) y en T47D-cl1 (tercer lugar).

III.B.2.2.4. Extracto C/M/A  
10:10:3 (VII)

Se cromatografió sobre capa delgada en solvente G, el material asociado a extracto C/M/A 10:10:3. La autorradiografía se presenta en la Figura 74, carriles 15, 16 y 17, para muestras control y tratadas con  $E_2$  y Tam, respectivamente.

En las tres muestras la mayor parte de la radiactividad permaneció en el origen. Se detectan en menor proporción sustancias de  $R_f = 0,03; 0,06; 0,12; 0,30$  y  $0,44$ .

Estos resultados permiten suponer que en esta fracción se encuentran poliprenil-PP-oligosacáridos.

III.B.2.2.5. Lavados con TCA  
(IX y X)

Se eliminó el TCA de las fracciones IX y X correspondientes al experimento descrito en la Tabla 60 por reiterados lavados con éter. La fase acuosa se evaporó y se sembró, disuelta en agua, en una placa delgada de Sílica gel que se cromatografió con solvente H. En la Figura 72 se muestra el perfil de migración de la

fracción soluble en TCA frío (carriles 7 a 9) o en caliente (carriles 10 a 12).

Para los lavados con TCA frío se observa una sola sustancia que migra con  $R_f = 0,25$ . Cuando las extracciones se efectuaron con el ácido en caliente, se evidencian, además de dicha sustancia, compuestos en menor proporción de  $R_f = 0,31$ ;  $0,36$ ;  $0,40$  y  $0,44$ .

Los resultados serían compatibles, aunque menos evidentes, con los observados para células T47D-cl1 (ver Figura 54).

#### IV. DISCUSION

Los estudios realizados en el transcurso de la presente Tesis tomaron como punto de partida los trabajos efectuados en tumores mamarios por Quesada y Baldi (355), que demuestran transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Man desde  $\text{GDP-}^{14}\text{C}$ -Man a un lípido-azúcar con características compatibles con las de  $\text{Dol-P-}^{14}\text{C}$ -Man.

Dichas evidencias resultaron interesantes ya que en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (356) se había comprobado la existencia de diferencias entre las glicoproteínas presentes en tumores mamarios humanos malignos y benignos.

Muchos laboratorios han centrado su interés en la búsqueda de glicoproteínas como posibles marcadores biológicos del cáncer mamario (357-359). En la actualidad, con el desarrollo de anticuerpos monoclonales, se ha demostrado la existencia de antígenos característicos de dicha patología mamaria. Recientemente Iacobelli y col. (360) han desarrollado el anticuerpo monoclonal SP-2 que inmunoreacciona con una proteína liberada por células CG-5, una variante de la línea MCF-7 supersensible a los estrógenos (361). El antígeno no está restringido a líneas en cultivo ya que se ha encontrado en tejido y suero de pacientes con cáncer mamario. Sin embargo, el antígeno no es específico de neoplasias mamarias si bien no ha sido detectado en tejidos normales. Resta determinar si di

cho antígeno está <sup>4</sup>relacionado con la proteína de 95 K descrita en cáncer mamario por Thompson y col. (362). En tal sentido ha demostrado ser diferente de la proteína de 90 K reportada por Colcher y col. (363,364). Otros dos laboratorios han comunicado, utilizando anticuerpos monoclonales, la existencia de elevados niveles de antígenos tumorales en el suero de pacientes con cáncer mamario (365,366). Por otro lado, Kufe y col. (367) demostraron la existencia de un antígeno de 90 K en la superficie de células de cáncer mamario en cultivo. Dicho antígeno no es detectable en una variedad de líneas celulares normales, de melanoma, sarcoma o linfoides, aunque el anticuerpo generado contra él (B6:2) reacciona con leucocitos polimorfonucleares circulantes (368). Recientemente, Hayes y col. (369) han reportado reacción del anticuerpo B6:2 en pacientes con cáncer mamario metastático.

Sobre la base del conjunto de evidencias mencionadas, emprendimos el estudio de la ruta metabólica de glicosilación de proteínas que involucra intermediarios lipídicos con el objeto de detectar posibles anormalidades de dicha síntesis en tejidos mamaríos malignos que pudieran ser responsables de los cambios observados en el producto final.

Los primeros ensayos se realizaron incubando cortes de tejido tumoral mamario humano con <sup>14</sup>C-Glc (III.A.1.). Si bien los resultados fueron alentadores con respecto a la formación de lípido-azúcares por el tejido mamario, en los experimentos

realizados no se obtuvo suficiente material radiomarcado como para caracterizarlo correctamente. Por añadidura, la metodología de trabajo fue sumamente engorrosa, ya que los explantes de tejido mamario resultan muy difíciles de manipular. Como consecuencia se decidió continuar los estudios utilizando sistemas libres de células (III.A.2.). Para ello se prepararon fracciones ricas en microsomas a partir de tumores humanos mamarios benignos y malignos.

Luego de incubar los microsomas con GDP-<sup>14</sup>C-Man o UDP-<sup>14</sup>C-Glc se analizó el material radiactivo encontrado en la fase inferior de la partición de Folch. Los lípido-azúcares mostraron similares características fisicoquímicas y conducta cromatográfica que patrones de Dol-P-Man y Dol-P-Glc de hígado de rata.

En tal sentido, los derivados manosilados y glucosilados coeluyeron con Dol-P-Man usado como patrón en columnas de DEAE-celulosa (figuras 11 y 29) y comigraron con los patrones en cromatografías sobre capa delgada realizadas con solventes ácidos (Figura 30).

Cuando se sometió a dichos compuestos a hidrólisis ácida suave, la mayor parte de la radiactividad se liberó a la fase acuosa, sensibilidad al tratamiento característica de los poliprenil-fosfato-azúcares (321-324). Cuando se analizó a través de cromatografía sobre papel los azúcares unidos al poliprenil-P no se observó interconversión a otros monosacáridos,



siendo Glc o Man los únicos azúcares liberados por la hidrólisis ácida (Figuras 13 y 31). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (322).

Speake y White (370) incubando explantes de mama de conejo con  $^{14}\text{C}$  encuentran gran interconversión de la marca a GlcN, GalN y Man, coincidiendo con nuestros hallazgos al incubar con el azúcar explantes de tumores mamarios (III.A.1.). Similares resultados obtienen Spiro y col. (291) usando cortes de tiroides bovina incubados con Glc radiactiva.

Una posible explicación de estas observaciones es que las fracciones microsomales carecen de habilidad para interconvertir monosacáridos a otros isómeros o inducir N-acetilaciones, ya que estas reacciones tienen lugar en el espacio extramicrosomal.

La síntesis del lípido manosilado catalizada por los microsomas mamarios se lleva a cabo durante los primeros minutos y luego decae lentamente (Figura 26). La transferencia de la Man radiactiva del poliprenil-P-monosacárido al presunto poliprenil-PP-oligosacárido presente en el extracto C/M/A 10:10:3, muestra un perfil similar aunque sólo el 5% de la radiactividad fue transferida. Concomitantemente, la incorporación de radiactividad a la fracción proteica se incrementa durante el curso de la reacción, sugiriendo que el poliprenil-PP-oligosacárido actúa como donador de la cadena sacarídica al receptor final.

Speake y White (370) han demostrado la capacidad de ex-plantas y microsomas provenientes de glándulas mamarias de conejas para catalizar reacciones similares a las recientemente descritas. Estos autores muestran diferentes perfiles cinéticos cuando la fracción microsomal fue preparada en buffer sacarosa o fosfato. No está claro, sin embargo, si los efectos se deben a la pérdida de otros componentes presentes en el buffer fosfato. Estas consideraciones pueden extenderse a la estabilidad observada en las enzimas envueltas en el ciclo del Dol (371). Sin embargo, en nuestro caso, no hemos hallado ningún cambio en la actividad enzimática luego de guardar las preparaciones microsomales a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante al menos seis meses en presencia del medio descrito en II.2.A.2. Similar estabilidad es descrita para la Dol-Man-transferasa presente en extractos microsomales de insectos (313). En cambio, la GlcNAc-transferasa de los mismos extractos se inactivó en menos de una semana. Parecería que la manosil transferasa fuera menos sensible a la acción de las proteasas, bien por su estructura, bien por su ubicación en la membrana (313).

La síntesis de poliprenil-P-Man y poliprenil-P-Glc se estimuló por adición al medio de incubación de Dol-P (III.A.2.1.2.a. y III.A.2.2.2.a.). Un efecto similar ha sido encontrado en numerosos sistemas (50,59,372) y puede implicar que las membranas contienen normalmente cantidades subsaturantes de Dol-P, sugiriendo que los niveles de Dol-P pueden ser un fac-

tor limitante en las reacciones de glicosilación in vitro e in vivo (46,373-375).

El Dol existe como varias especies en los tejidos (321), incluyendo la forma acilada y el alcohol libre. Es poco lo que se sabe acerca del metabolismo del Dol y sus derivados. En consecuencia, es imposible determinar si los cambios en la concentración de Dol-P están regulados por cambios en la velo ci dad de síntesis o de degradación de la unidad isoprénica o por el grado de interconversión entre formas inactivas como el alcohol acilado y activas como el Dol-P (376). La concentración limitante de Dol-P sugiere la posibilidad de regulación del ciclo del Dol a través de la modulación de sus niveles.

Se otorgó especial consideración a optimizar las condiciones para obtener máxima formación de derivados poliprenóli co s y su transferencia a aceptores proteicos. Intentamos correlacionar la concentración proteica microsomal y la cantidad de detergente añadida al sistema (Figura 24 y 36). Coinci di en do con lo reportado por otros autores (326) esto resultó ser una tarea complicada.

Los efectos del detergente añadido a la reacción en presencia de cantidades variables de proteína microsomal no deben ser solamente atribuidos a la solubilización del sistema multi en zim át ico involucrado en la síntesis de poliprenil-azúcares

(377), ya que los detergentes interactúan con las proteínas de membrana así como con el ambiente lipofílico que rodea a las enzimas (326). Esta podría ser la interpretación de lo que ocurre con la manosil-transferasa II, cruda o purificada, que muestra una actividad óptima a 0,1 y 0,0225 % de Nonidet P-40, respectivamente (378).

También se estudió la dependencia del pH (III.A.2.1.2.f.) y con bastante detalle la de la temperatura, obteniéndose diferentes resultados para las manosil (III.A.2.1.2.g.) y glucosil transferasas (III.A.2.2.2.b.). Fue inesperado el máximo grado de transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Glc al acceptor proteico a 15°C, interpretándose que a esta temperatura hay un equilibrio entre la actividad de las glucosidasas y la de la enzima que transfiere el oligosacárido.

La suma de las evidencias presentadas resultó de utilidad para determinar las condiciones más apropiadas para sintetizar los diferentes poliprenil-fosfato-azúcares derivados.

Por otro lado, hemos intentado cuantificar el tamaño del oligosacárido liberado por hidrólisis ácida de los extractos C/M/A 10:10:3 provenientes de los experimentos de transferencia de Man y Glc. Datos preliminares indican que el número de monosacáridos sería de 13-14 de acuerdo a los valores calculados para sus  $R_{\text{Man}}$  (Figura 17). Unidades de menor número de monosacáridos se obtuvieron en incubaciones realizadas durante

períodos de tiempo más breves (Figura 14).

Evidencias sobre el tamaño de los oligosacáridos de mama de coneja indican que cuando provienen de incubaciones con microsoomas contienen 6-7 unidades (379,380), mientras que cuando se utilizan explantes poseen 10-12 unidades (370). Se ha señalado (327) que el Dol-PP-oligosacárido presente en células mamarias de ratón normales o tumorales tiene el mismo tamaño, está compuesto por residuos monosacarídicos idénticos, posee similares propiedades cromatográficas y el mismo número de residuos susceptibles a la degradación con  $\alpha$ -manosidasa. Sin embargo, han sido descriptas por varios grupos variaciones de tamaño de los oligosacáridos. Trowbridge y Hyman (60) y Chapman y col (381) demostraron que el Dol-PP-oligosacárido sintetizado en una línea celular de un linfoma mutante de ratón, mostraba una composición deficiente con dos GlcNAc, cinco Man y tres Glc. Bajo condiciones no permisivas estas células sintetizaban un oligosacárido normal, pero se reducía su transferencia a un aceptor proteico endógeno.

En nuestros primeros estudios (III.A.2.4.1.) el procedimiento utilizado para determinar la glicosilación de proteínas se basó en la transferencia de Man o Glc a fracciones proteicas endógenas a partir de GDP-<sup>14</sup>C-Man o UDP-<sup>14</sup>C-Glc. En dichos estudios la temperatura óptima para la formación de glucoproteínas resultó ser de 15°C.

Basándonos en estas observaciones y con el objeto de pro

bar en nuestro sistema la participación de intermediarios lipídicos en la síntesis de glicoproteínas, incubamos microsomas provenientes de tejido mamario, a 15°C, con Dol-PP-oligosacárido preparado a partir de oviducto de gallina o de tiroides bovina (III.A.2.4.2.).

De los resultados presentados en las Tablas 14, 15, 16, 17, 20 y 21 puede concluirse que las posibilidades de estudiar con éxito la transferencia del oligosacárido a proteínas están íntimamente ligadas a las condiciones de ensayo utilizadas, especialmente en lo que se refiere al tiempo de incubación. Parecería ser que al aumentarse el mismo, se incrementa concomitantemente la posibilidad de degradación del oligosacárido por acción de las glucosidasas (342). La inclusión en el medio de incubación del disacárido kojibiosa, un inhibidor de las glucosidasas I (I.1.4.5.), provoca un incremento cercano a las 40 veces en la transferencia del oligosacárido (Tabla 17). En contraposición, se observa una disminución en la radiactividad presente en las fases inferior y superior de la partición de Folch, derivada de la ruptura del oligosacárido probablemente después de su transferencia a proteínas. Esta parece ser la secuencia ya que el porcentaje del compuesto presente en el extracto C/M/A 10:10:3 es similar en ambas reacciones. Esta hipótesis se ve reforzada por los trabajos que demuestran que la kojibiosa no afecta la desaparición de Dol-PP-derivados a concentraciones de detergente de 1-4 %

(342). La relación proteína/detergente (ver Figura 25) usada en nuestro estudio es similar a pesar de que los ensayos se realizaron en presencia de 0,2% de Triton X-100.

Cuando se realizaron ensayos similares empleando microsomas "lavados" (ver II.2.A.2.b.) se observó que, inesperadamente, la kojibiosa no afectaba el grado de transferencia del oligosacárido. Esto podría deberse a que en el proceso de preparación de la fracción microsomal se hubiera perdido parte de la actividad de glucosidasas.

Lucas y col. (211) demuestran que las membranas "lavadas" o "no lavadas" tienen características semejantes, excepto que en las primeras la actividad específica de las glicosil transferasas es mayor y el recambio de Dol-P-Man menor.

Debe recalarse que en ningún experimento se pudo lograr transferencia total del oligosacárido al aceptor proteico. Podemos especular que en las condiciones experimentales empleadas la cantidad de aceptor endógeno y/o de enzima transferente no fue suficiente. Se intentó aumentar el grado de transferencia agregando al sistema 5-carboximetil-lactalbúmina como aceptor proteico exógeno (III.A.2.4.2.a.), pero en dichos experimentos se obtuvo muy escasa incorporación de radiactividad a la fracción proteica, lo que no permite sacar conclusiones al respecto.

En cuanto a las observaciones efectuadas con tejido mamario normal o con tumores malignos y benignos, hemos encontra-

do algunas diferencias entre ellos.

La transferencia de Man desde GDP-Man y la de Glc desde UDP-Glc a Dol-P-monosacáridos, Dol-PP-oligosacáridos y glicoproteínas resultó, en todos los casos estudiados, mayor en tejido maligno que en normal o benigno. Estas diferencias se hicieron manifiestas en el sistema endógeno y cuando se estimuló el mismo con Dol-P y detergente (Figuras 13, 14 y 16; Tabla 11). En las incubaciones con UDP-<sup>14</sup>C-Glc pudo observarse que aunque la transferencia alcanzada en el sistema endógeno es mucho mayor para el tejido maligno que para el benigno, este último sistema resulta más sensible a la estimulación con Dol-P y Triton X-100, lo que sugiere la existencia de un menor pool endógeno de Dol-P en los tumores benignos (Tabla 11).

La mayor actividad del tejido maligno también se hizo evidente en la actividad transferente del oligosacárido a proteínas aceptoras endógenas (Tablas 16, 20 y 21).

En las incubaciones de cortes de tejido mamario con <sup>14</sup>C-GlcN nuevamente se alcanzó mayor incorporación de radiactividad a lípido-azúcares y glicoproteínas en el tejido maligno (Figura 8). Estas diferencias cuantitativas junto con el distinto perfil electroforético de las glicoproteínas marcadas a partir de UDP-<sup>14</sup>C-Glc (Figura 37) sugieren que la síntesis primaria de la porción sacarídica de las glicoproteínas de tejido mamario humano maligno difiere de la observada en su contraparte normal o en tumores benignos.



Podría postularse, entonces, que la elucidación sobre las etapas enzimáticas responsables de las diferencias descritas constituye un campo promisorio para futuras investigaciones.

Una vez establecida la participación de intermediarios lipídicos en la glicosilación de proteínas mamarias humanas, decidimos enfocar nuestra atención hacia los mecanismos de regulación de esta vía metabólica, tema acerca del cual es poca la información disponible.

En el curso de los trabajos descritos en esta Tesis hemos tratado de determinar el efecto de moléculas reguladoras del metabolismo celular, como son las hormonas esteroideas, sobre el ciclo del Dol en el cáncer de mama.

El análisis de la dependencia hormonal del cáncer mamario humano se ha facilitado mediante el desarrollo de sistemas in vitro a través de los cuales puede estudiarse el efecto de una hormona individual sobre tejidos neoplásicos, independizándose de la acción de los órganos endócrinos.

Si bien el cultivo de tejidos proporciona un modelo estructuralmente más similar a los existentes in vivo, resulta difícil cultivar tumores humanos. Generalmente se necesita un largo período "lag" antes de que se produzca la fase de proliferación activa de las células tumorales, y los fibroblastos tienden a sobrecrecer los cultivos en las primeras etapas. Este período "lag" sugiere firmemente que está ocurriendo una

selección para un tipo de variante celular y que la población celular final no es representativa de la población original de células tumorales (450). Esto limita severamente este tipo de cultivos.

En consecuencia elegimos como modelo de trabajo las líneas celulares T47D y MCF-7, derivadas de cáncer mamario humano. Esto nos permitió estudiar los efectos hormonales sobre una población celular homogénea, uniformemente expuesta a la hormona y sujeta a condiciones nutricionales previamente fijadas a través de la composición del medio de cultivo.

Las líneas celulares en cuestión poseen receptores intracelulares para hormonas esteroideas como  $E_2$ , P y  $1,25(OH)_2D_3$  y receptores a nivel de membrana para hormonas polipeptídicas como insulina, hormona de crecimiento, calcitonina, etc (270).

El primer paso fue demostrar la participación del ciclo del Dol en la línea celular T47D, tema aún no abordado en la literatura.

Con el objeto de generar una incorporación suficiente de  $^{14}C$ -Glc a las fracciones lipídicas, se subcultivaron las células en un medio libre de Glc. Se logró incorporación del azúcar radiactivo a la fase inferior de la partición de Folch, determinándose por cromatografía de intercambio iónico que más del 60 % de los lípidos presentes en esa fase eran cargados. Estudiando dichos lípidos retenidos por la columna en cromatografía sobre placa delgada, se observó que la mayor

parte del material mostraba la conducta esperada para un poliprenil monofosfato monosacárido, involucrándose por primera vez al ciclo del Dol en esta línea celular. Al mismo tiempo se observó, aunque en mucha menor proporción, la presencia en dicha fase inferior de compuestos con conducta cromatográfica compatible con la de poliprenil pirofosfato oligosacáridos de cadena sacarídica corta. El estudio preliminar del material presente en el extracto C/M/A 10:10:3 sugiere la existencia de un poliprenil-PP-oligosacárido de mayor tamaño.

Al mismo tiempo, se decidió completar los estudios, analizando los productos radiomarcados de carácter hidrosoluble que se formaban al incubar las células con el azúcar radiactivo, con el objeto de posibilitar una visión más general de los complejos pasos metabólicos que conducen a la formación de glicoproteínas.

Se pudo observar que el sistema celular elegido es sumamente activo. Analizando el medio de cultivo se comprueba interconversión de significativa parte de la  $^{14}\text{C}$ -Glc a otros azúcares y la aparición de otros productos. En la fase superior de la partición de Folch, que representaría a los productos hidrosolubles presentes en las células, la mayor parte de la radiactividad ya no se encuentra como Glc, apareciendo diversos compuestos de mayor y menor movilidad cromatográfica que el azúcar en cuestión y cuya caracterización requiere estudios específicos.

Paralelamente se estudió el efecto de  $E_2$ , P y antiestrógenos sobre esta ruta metabólica.

La decisión de incluir antiestrógenos en nuestros ensayos está basada en su utilización en la terapéutica del cáncer mamario, aunque el mecanismo a través del cual disminuyen el crecimiento tumoral no está bien determinado (382).

Los antiestrógenos pueden actuar como agonistas o antagonistas estrogénicos (383,384) de acuerdo a la dosis utilizada (385), al régimen de inyección (386) y a la presencia o ausencia de otras hormonas (387).

Horwitz y col. (388) demuestran que a dosis intermedias ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M) el Tam es un potente inductor del receptor para P en células MCF-7. Esta propiedad estrogénica se enmascara a altas dosis ( $10^{-6}$  M) a las cuales inhibe el crecimiento celular. Otro antiestrógeno, la Naf, tiene, en contraste, poco efecto sobre el receptor para P en un amplio rango de concentraciones. El hecho de que la inhibición que ejercen ambos antiestrógenos sobre el crecimiento celular pueda revertirse por medio de la adición de  $E_2$  sugiere que dicho efecto es mediado por el receptor estrogénico.

En células MCF-7 los antiestrógenos se unen al receptor estrogénico citoplasmático y lo traslocan al núcleo, actuando en este aspecto como el  $E_2$ . Sin embargo, el posterior procesamiento del complejo hormona o antihormona-receptor es diferente. Dicho procesamiento disminuye o no se produce en presen-

cia de Tam o Naf respectivamente (388), siendo necesario para iniciar la respuesta biológica.

Por otra parte, se ha propuesto que los antiestrógenos podrían actuar vía un receptor específico, independiente del estrogénico de localización microsomal (389).

Los trabajos de Sonneschein y col. (390) proponen la existencia de sustancias llamadas estrocolinas que se unen a receptores de membrana específicos, previniendo la proliferación celular. El  $E_2$  se une a las estrocolinas, impidiendo su unión al receptor, permitiendo que las células entren en ciclo proliferativo. El Tam se uniría a las estrocolinas reduciendo su unión al receptor, lo que resultaría en una proliferación celular submáxima.

En las condiciones utilizadas en nuestros experimentos, el  $E_2$  no induce cambios en la formación de lípido-azúcares.

El resultado no fue el esperado ya que la línea celular T47D-cl1 posee receptores específicos para tal hormona (282) y requiere  $E_2$  para su crecimiento.

Evidencias previas en nuestro (391) y otros laboratorios han establecido que el  $E_2$  induce la síntesis de nuevos polipéptidos.

El grupo de McGuire (392-394) ha demostrado que el  $E_2$  provoca la síntesis de una proteína de 24 kDal y otra de 54 kDal. El grupo de Rochefort (395,396), utilizando la línea celular MCF-7, logró establecer el efecto inductor del  $E_2$  sobre

la síntesis y secreción de una proteína de 46 kDal, postulando su estructura glicoproteica debido al hecho de que este compuesto incorpora fucosa tritiada y es digerido por neuraminidasas. Más aún, dicha glicoproteína resulta sensible a la tunicamicina (397), lo que implica que podría ser glicosilada a través de lípidos intermediarios (398). El grupo de García y col. (399) reporta en células MCF-7 una glicoproteína de peso molecular 52.000 regulada por estrógenos.

Sin embargo, otros investigadores no lograron demostrar efectos estrogénicos sobre el crecimiento celular in vitro en células con estricto requerimiento de estrógenos para el crecimiento tumoral in vivo (303,400), sugiriendo que los estrógenos actuarían indirectamente, vía la liberación de factores de crecimiento (estromedinas) por otros tejidos (401).

Más aún, la respuesta puede depender de los parámetros elegidos para la estimación de la acción hormonal. Es así que Butler y col. (402) encuentran que el  $E_2$  estimula la producción del activador del plasminógeno en iguales condiciones en que no se afecta la división celular. Jozan y col. (403) informan que el  $E_2$  estimula la incorporación de nucleósidos en células MCF-7 sin afectar la división celular.

A pesar de la falta de respuesta al  $E_2$ , la adición de Naf o Tam al medio de cultivo fue capaz de provocar una marcada inhibición en la formación de Dol-P-monosacáridos, su producto de elongación, y en la transferencia de éste a acepto-

res proteicos finales.

El Tam resultó ser un inhibidor más efectivo que la Naf. El efecto inhibitorio de esta última parece ser dependiente del período de ayuno al que se somete a las células antes del ensayo, ya que la disminución en la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a la fase inferior fue del 30% con 12 h de ayuno, y de 35, 40 y 45% con 3,5, 5 y 6 días de ayuno, respectivamente. Este efecto sería compatible con la progresiva disminución del  $\text{E}_2$  endógeno al prolongarse el período en el cual las células permanecen en medio libre de esteroides.

Al mismo tiempo, se observan ciertas diferencias en los perfiles cromatográficos de células cultivadas en presencia de Tam con respecto a las controles que merecen mayor estudio.

La concentración de  $\text{E}_2$  usada en nuestros ensayos ( $10^{-9}$  M) se basa en la constante de disociación para la unión específica de  $\text{E}_2$  calculada en estas células (269). Además, a esta concentración el  $\text{E}_2$  aumentó la fosforilación proteica en células idénticas incubadas bajo iguales condiciones que las aquí mencionadas, excepto que se omitió del medio el fósforo y se mantuvo la Glc (404).

Se ha comprobado que cantidades superiores ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M) disminuyen la síntesis de poliprenil-azúcares (ver III.B.1.3.)

Chalbos y col. (346) muestran un efecto bifásico del  $\text{E}_2$  sobre la proliferación celular. La tasa de crecimiento de células T47D es estimulada por concentraciones de  $\text{E}_2$  menores

que  $10^{-8}$  M y luego progresivamente inhibida por dosis mayores. Este efecto bifásico también se observa sobre la incorporación de timidina tritiada. El efecto inhibitorio podría deberse a una regulación negativa de los receptores estrogénicos o de su procesamiento (405).

Podría especularse que este fenómeno podría ser la contraparte de la inhibición in vivo del crecimiento de tumores mamarios por altas dosis de estrógenos (406).

Otros autores encuentran a altas concentraciones de  $E_2$  que las células tienen tendencia a redondearse y desprenderse, y sugieren que este efecto es no específico (348,407).

Con respecto a la incorporación de radiactividad al extracto C/M/A 10:10:3, en la mayor parte de los casos examinados se obtuvo una disminución de la misma en presencia de ambos antiestrógenos, y no se modificó por acción estrogénica.

En cuanto al efecto del  $E_2$  sobre la incorporación del azúcar a la fracción glicoproteica insoluble en TCA caliente, los resultados fueron variables.

Es conveniente tener en cuenta que la radiactividad transferida a proteínas endógenas no está estrictamente relacionada con los intermediarios lipídicos, ya que las proteínas también pueden ser glicosiladas a través de un mecanismo que sólo involucra nucleótido-azúcares (1).

En tal sentido, se iniciaron estudios utilizando tunica-



micina, un antibiótico que inhibe la glicosilación proteica a través de lípidos intermediarios bloqueando el primer paso en la síntesis de la cadena oligosacáridica unida a restos de asparagina: la transferencia de GlcNAc-1-P desde UDP-GlcNAc al Dol-P (232) (ver I.1.4.7.).

Se ha utilizado tunicamicina para tratar de dilucidar el rol de los carbohidratos en la síntesis, procesamiento, secreción y actividad biológica de las glicoproteínas en virus, hongos y bacterias (30).

Es de particular interés el efecto de la tunicamicina sobre células transformadas. Estas parecen ser más sensibles a la acción del antibiótico que las células normales (239,242, 244,252). El mecanismo de citotoxicidad específica de la tunicamicina contra las células transformadas no está completamente determinado. Podría deberse a diferencias en la composición de la membrana celular, de las glicosiltransferasas afectadas por la droga o en la penetración del antibiótico al RER (252).

La tunicamicina es una mezcla de 16 homólogos, cada uno de los cuales difiere en su habilidad de inhibir la glicosilación sin afectar la síntesis proteica (246,247).

En células T47D-cl1 se determinó que la tunicamicina (Sigma) inhibe el crecimiento celular (Figura 50) sin afectar la síntesis proteica (Tabla 37). El antibiótico proveniente de Lilly, en contraste, disminuye la incorporación de <sup>35</sup>S-Met

a proteínas (Tabla 37). La discrepancia entre ambas drogas podría deberse a una proporción relativa de los homólogos diferente.

Con respecto al efecto sobre la incorporación de azúcares radiactivos a glicoproteínas, los resultados son inesperados. En un primer experimento (Tabla 38), en el que el antibiótico actuó durante 15 horas, la tunicamicina de Sigma redujo la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc y, a altas dosis, la de  $^{14}\text{C}$ -Man. En contraste, la incorporación de este último azúcar a la fracción proteica resultó estimulada por bajas dosis del antibiótico. Por otro lado, la tunicamicina proveniente de Lilly inhibió, aunque en baja extensión, la incorporación de ambos azúcares, a todas las dosis ensayadas.

Cuando se realizó un segundo experimento (Tabla 39) incrementando el período de contacto con la droga a 21 horas, los resultados obtenidos fueron diferentes. En estas condiciones la tunicamicina de Sigma redujo a altas dosis la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a la fracción TCA precipitable; dosis menores incrementaron dicha incorporación. Mas aún, la transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Man a dicha fracción se elevó a más del doble en presencia del antibiótico.

Estos resultados podrían indicar la existencia de proteínas O-glicosiladas, cuya glicosilación no involucra intermediarios lipídicos. Al inhibirse con tunicamicina la síntesis de uniones N-glicosídicas, las primeras cobrarían mayor impor

tancia. De Rosa y Lucas (344) encuentran que la glicosilación de una proteína de peso molecular 36.000 es poco sensible a la tunicamicina y presumen que dicha proteína puede aceptar restos GlcNAc directamente del nucleótido-azúcar, en posiciones externas de cadenas oligosacarídicas ya presentes.

El efecto de la tunicamicina sobre células T47D-cl1 en nuestras condiciones de ensayo evidencia ser muy complejo y requiere un estudio más profundo para poder arribar a conclusiones valederas.

A pesar de la falta de respuesta ante los estrógenos, la dependencia de hormonas esteroideas de las células T47D-cl1 u utilizadas en los ensayos descriptos se comprobó cuando estas células se cultivaron con suero libre de esteroides por tratamiento del mismo con carbón (Tabla 30). La incorporación de Glc, Man y GlcN a poliprenil fosfato azúcares y glicoproteínas se redujo notablemente comparando con células cultivadas con suero completo. Ensayos similares empleando células T47D-c8, que carecen de receptores para estrógenos, andrógenos y P (346) no mostraron cambios significativos en la incorporación de precursores radicativos a lípidos intermediarios. Cuando se incubaron células T47D-c8 en presencia de estrógenos a antiestrógenos, no se observó efecto estimulatorio del E<sub>2</sub>, pero tampoco inhibitorio de la Naf o el Tam (Tabla 33).

No puede excluirse que las dificultades para demostrar

un efecto del  $E_2$  sobre la formación de lípidos intermediarios en nuestras células, pueda deberse a la presencia de pequeñas cantidades de estrógenos en el suero tratado con carbón. Está bien demostrado que dicho tratamiento, que es sumamente efectivo para adsorber los esteroides no conjugados (348,408), es ineficaz para deprivar al suero de los sulfatos de estrógenos (348). En tal sentido, Slaunwhite y col. (409) informan que los conjugados estrogénicos representan el 90 % de los estrógenos séricos. Así, las células cultivadas con SFB al 10 % tratado con carbón estarían expuestas a una concentración de sulfatos de estrógenos de 3 nM, principalmente estrona-sulfato (410). Vignon y col (410) demuestran que en la línea MCF-7 la estrona-sulfato penetra a las células donde se metaboliza dando estrona y  $E_2$  libres, que pueden, finalmente, unirse al receptor estrogénico.

Por otro lado, Strobl y Lippman (411,412) demuestran una prolongada retención de  $E_2$  y de actividad estrogénica en células MCF-7 en cultivo. Sugieren que la relativa insolubilidad del  $E_2$  y sus metabolitos en el medio de cultivo con respecto al compartimento intracelular, es importante en el mantenimiento del  $E_2$  dentro de las células a pesar del gradiente de concentración favorable desde las células al medio.

Estas observaciones sugieren que el período en que las células permanecen en medio libre de hormonas es a menudo subestimado. Dicho período debe fijarse precisamente porque los

estrógenos incompletamente removidos pueden enmascarar la respuesta a una posterior adición de  $E_2$ . El añadido de Tam ( $10^{-6}$  M) a los medios de lavado reduce específicamente el  $E_2$  unido compitiendo con éste por el receptor (411)

Dada la ineficiencia de nuestro diseño experimental para demostrar efectos del  $E_2$  sobre los mecanismos de glicosilación estudiados, se decidió preincubar las células con Naf o Tam, con el objeto de anular el posible  $E_2$  endógeno. El esquema de trabajo se basó en protocolos propuestos por el grupo de McGuire (413,414) en los cuales células MCF-7 se pretrataron con Naf con el propósito de anular la proliferación celular y luego se sometieron a  $E_2$  para liberar este bloqueo y estimular la síntesis de DNA y la división celular. En estas condiciones el  $E_2$  incrementa directamente la síntesis de proteínas específicas (p24 y p36). El "rescate" de la inhibición producida por el antiestrógeno es, además, la única condición en que logran una estimulación reproducible del crecimiento celular por acción estrogénica.

Se utilizó el protocolo de "rescate" descrito en III.B. 1.4.

La aparente discrepancia entre los datos presentados en la Tabla 28 con respecto al efecto inhibitorio de la Naf y el Tam descrito en las Tablas 23, 24 y 25, puede explicarse teniendo en cuenta que en los experimentos de "rescate" los an-

antiestrógenos son removidos del medio luego de una hora, mientras que en los primeros ensayos la Naf y el Tam permanecieron en el medio a lo largo del período de marcación.

Con respecto al resultado del protocolo de "rescate" hay una clara diferencia entre ambos antiestrógenos. La adición de  $E_2$  a células pretratadas con Naf revierte, en parte, el efecto inhibitorio del antiestrógeno en las tres fracciones estudiadas. Cuando el pretratamiento se realizó con Tam, el añadido de  $E_2$  produjo una evidente disminución en la síntesis de lípido-azúcares y glicoproteínas.

El análisis de los resultados obtenidos con el pretratamiento con Naf indica un posible efecto estimulador del estrógeno en las condiciones utilizadas, sugiriendo que el  $E_2$  y la Naf compiten por el receptor estrogénico.

Briand y col. (348) demostraron que a concentraciones de Tam menores a  $10^{-6}$  M el efecto inhibitorio del antiestrógeno sobre el crecimiento celular puede ser revertido por medio de la adición de  $E_2$ . Sin embargo, a concentraciones mayores la inhibición del crecimiento se debe a un efecto citotóxico inespecífico y no competitivo por el  $E_2$ .

En el mismo sentido, Horwitz y col. (388) demuestran que la propiedad del Tam  $10^{-6}$  M de inhibir el crecimiento celular puede ser parcialmente revertida por adición de  $E_2$   $10^{-9}$  M y en forma completa por dosis mayores. Del mismo modo, aunque el Tam previene la inducción del receptor para P por dosis de

$E_2$  fisiológicas ( $10^{-10}$  M), cantidades mayores del estrógeno revierten esta inhibición. El  $E_2$  es efectivo para desplazar al Tam del receptor estrogénico a dosis cien veces menores que las del antiestrógeno, debido a su mayor afinidad por dicho receptor.

Debemos considerar un trabajo de Miller y Katzenellenbogen (389) acerca de la presencia de sitios de unión para antiestrógenos distintos del receptor estrogénico. Dichos receptores antiestrogénicos se encuentran en similar concentración en las líneas MCF-7, T47D y MDA-MB 231 que tienen, respectivamente, niveles altos, bajos y no detectables de receptores para estrógenos. Estos sitios antiestrogénicos podrían influir en la distribución de los antiestrógenos y, en consecuencia, en su disponibilidad para unirse al receptor estrogénico. Quizás podrían mediar mecanismos bioquímicos del antiestrógeno que no involucren su antagonismo estrogénico. Se demostró que dichos sitios de unión están asociados a membranas microsomales. Esto es importante ya que las enzimas que participan del ciclo del Dol también tienen localización microsomal (79). Teniendo en cuenta la presencia de dichos receptores antiestrogénicos, los efectos observados con el pretratamiento con Tam podrían no deberse a su antagonismo antiestrogénico.

Con respecto a la información disponible sobre la acción de hormonas esteroideas sobre el ciclo del Dol, se ha demos-

trado que la síntesis de Dol-P-man está estimulada en glándula tiroides por tirotrófina (415) y en células HeLa por acción de los glucocorticoides (416).

Por otro lado, está bien documentado que varios pasos en el ciclo del Dol son afectados por estrógenos, usando diferentes sistemas biológicos y diseños experimentales. Lucas y Levin (211) demostraron que no hubo transferencia de Man desde GDP-<sup>14</sup>C-Man a proteínas endógenas o lípido-oligosacáridos en preparaciones de pollos sin tratamiento estrogénico. Pocos días después de iniciada la administración de estrógenos las reacciones mencionadas se produjeron en igual extensión que en preparaciones de gallinas adultas. Hayes y col. (417) demuestran que el tratamiento con dietilestilbestrol aumenta tres veces la conversión de Dol-PP-GlcNac<sub>2</sub> a oligosacáridos superiores. Estos autores sugieren que la regulación del ciclo del Dol-P por medio de estrógenos ocurre según dos mecanismos alternativos. El primero sería un incremento de la actividad de glicosiltransferasas individuales involucradas en la N-glicosilación. Un ejemplo de esto es el incremento de la proteína-oligosacárido transferasa (343) y el aumento de la síntesis de lípido-oligosacáridos (417). El segundo mecanismo involucraría el incremento de los niveles de Dol-P. Singh y col. (343), usando membranas de oviducto, demostraron que la actividad de la enzima transferente del oligosacárido se incrementa de 3 a 4 veces administrando estrógenos a pollos. Esto está de acuerdo con



las observaciones del grupo de Lucas (211,376,418) acerca de la modulación por acción hormonal de la doliquil-kinasa.

La Dol-kinasa es una enzima microsomal (44,45,419) que cataliza la síntesis de Dol-P a partir de Dol y CTP, regulando los niveles celulares de Dol-P en acción conjunta con la Dol-PP-fosfatasa y la Dol-P-fosfatasa (420,421).

Las propiedades básicas de la Dol-kinasa se han estudiado en una variedad de tejidos, incluyendo hígado de rata (44,419), oviducto de gallina (422), cerebro de mamíferos (45,210,422), embrión de erizo de mar (423) y Tetrahymena pyriformis (424).

Estudios preliminares descritos en III.B.1.10. demuestran la actividad de dicha enzima en microsomas aislados de células T47D-cl1. Estos ensayos se han encarado teniendo en cuenta la posible actividad regulatoria de la enzima mencionada.

Aunque está bien demostrado que las Dol-kinasas requieren un catión divalente para su activación, el catión específico más activo difiere según los tejidos estudiados:  $Mg^{2+}$  para hígado de rata (44,419),  $Mn^{2+}$  para oviducto de gallina (422) y  $Ca^{2+}$  para cerebro bovino (45), erizo de mar (423) y Tetrahymena (424).

En nuestro sistema, el  $Mn^{2+}$  resultó más efectivo que el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  (Tabla 39).

Se ha sugerido que la Dol-kinasa de cerebro de rata está regulada por un sistema  $Ca^{2+}$ -calmodulina (425). Recientemente, se ha demostrado que de diez cationes ensayados el  $Zn^{2+}$  resul-

tó el más efectivo en la activación de la Dol-kinasa de cerebro bovino y de rata y de células de la glia en cultivo, no encontrándose interacción del sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Se ha sugerido que el CTP forma un complejo con los cationes divalentes y que este complejo puede ser la forma biológicamente activa del dinucleótido (44).

En otro sentido, los trabajos de Horwitz y col. (426) han demostrado la presencia de receptores para P en distintas líneas celulares derivadas de cáncer de mama. Con respecto a las de nuestro interés, el nivel de receptores para P es de 1.221 y 330 fmol/mg proteína citosólica, para células T47D y MCF-7 respectivamente. En células MCF-7 el tratamiento con  $\text{E}_2$  por cuatro o cinco días incrementa de 3 a 6 veces el nivel de receptores para P y la respuesta es dosis dependiente (405). Butler y col (427) encontraron que la actividad del plasminógeno en células MCF-7 es sensible a la presencia de P, pero solamente a dosis suprafisiológicas ( $10^{-6}$  M). La P  $10^{-8}$  M sólo produce efecto en presencia de  $\text{E}_2$ . Chalbos y Rochefort describen la estimulación por progestínicos de una proteína intracelular de peso molecular 250.000 en células T47D y MCF-7 y de una de 48.000 liberada al medio de cultivo de células T47D (429). Hagley y Moore (430) reportan el efecto de progestínicos sobre la lactato dehidrogenasa en células T47D y Judge y col. (288) la acción estimuladora de la hormona sobre la síntesis de tri

glicéridos en la misma línea. Murphy y col. (431) demuestran que concentraciones fisiológicas de P aumentan la expresión del receptor para EGF en células T47D y, en menor grado, en MCF-7.

Con respecto a la acción de la P sobre el camino del Dol, se ha demostrado (376) que la pérdida de peso observada en oviducto de gallina secundaria a la remoción del tratamiento con dietilestilbestrol se ve limitada mediante la administración de P y es totalmente revertida por medio del tratamiento combinado con P y estrógenos.

Resultó interesante, por lo tanto, tratar de determinar si la P posee capacidad de modificar los distintos intermediarios lípidicos involucrados en la glicosilación proteica en la línea T47D, que posee mayores niveles de receptores para la hormona.

En nuestra experiencia, los datos reunidos hasta el momento en células T47D-cll (Tabla 34) evidencian que la P es capaz de estimular la incorporación de azúcares radiactivos a lípido-azúcares y glicoproteínas, mostrando un efecto dosis-respuesta que es máximo cuando los niveles de P en el medio de incubación se ajustan a  $10^{-7}$  M.

En paralelo con las incubaciones con  $^{14}\text{C}$ -Glc se efectuaron marcaciones de las células T47D con  $^{35}\text{S}$ -Met, con el objeto de determinar si las variaciones en la incorporación de Glc a

a la fracción proteica por acción hormonal se correspondían con aumentos o disminuciones en la incorporación del aminoácido. Con el propósito de conocer el sistema más íntimamente se analizaron diversas fracciones provenientes de incubaciones de las células T47D-cll con el aminoácido radiactivo.

Se observó que, sorprendentemente, había incorporación de radiactividad a compuestos de naturaleza lipofílica y que en general las células mostraban una activísima metabolización del aminoácido que conducía a la aparición de numerosas sustancias cuya cantidad relativa difería en los cultivos controles o tratados con  $E_2$  y Tam. No puede descartarse que el  $^{35}S$  correspondiera a grupos sulfato, a pesar de que este anión estuvo presente en el medio de cultivo.

En tal sentido, se ha demostrado una variedad de glicoproteínas de membrana y secretorias que contienen restos sulfatos en sus oligosacáridos unidos a Asn (192-194, 432-440). El sulfato puede estar unido a restos Man o GlcNAc (441).

La caracterización de los compuestos radiomarcados a partir del aminoácido puede, en consecuencia, tener interesantes derivaciones.

Se realizaron estudios similares a los descritos con células T47D-X, provenientes del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Louisville (ver III.B.1.12.). Incubando las células con  $^{14}C$ -Glc pudo demostrarse la formación de poliprenil-P-azúcares, si bien la proporción de estos con respecto a

a los lípidos totales que en células T47D-cl1. Cuando se analizó la influencia del agregado al medio de cultivo de estrógenos o antiestrógenos, no pudo observarse efecto de ninguno de estos agentes. En las marcaciones a partir de <sup>35</sup>S-Met se evidenciaron resultados similares a los observados con células T47D-cl1 aunque las diferencias vistas en presencia de las hormonas son mucho menores.

Estos resultados alertan sobre la necesidad de identificar correctamente la línea celular en estudio y sobre la cautela con que deben considerarse los resultados obtenidos en cada laboratorio.

En tal sentido, son convincentes los trabajos de Horwitz y col. (282) que analizando el nivel de receptores para esteroides de líneas celulares mamarias procedentes de diferente origen, demuestran entre ellas notables diferencias.

Chalbos y col. (346) sostienen que la respuesta frente a las hormonas de las líneas T47D y MCF-7 varía marcadamente con el número de pasajes. Las células pueden evolucionar in vitro en forma similar a lo que sucede in vivo durante la progresión tumoral, en la cual se pierde la dependencia hormonal. Estos autores afirman que las líneas celulares son a menudo multiclonales por lo cual contienen una mezcla de clones sensibles y no sensibles a las hormonas.

Son numerosos los trabajos que describen sublíneas celula

res que poseen propiedades completamente diferentes que las de la línea de la cual derivan. Por ejemplo, Keydar y col. (442) obtienen los clones 11 y 8 de la línea T47D, el primero de los cuales posee receptores para hormonas esteroideas y el otro no. Los trabajos del grupo de Lippman (443,444) describen una variante ( $R_{27}$ ) de células MCF-7 que posee receptores para  $E_2$  y P pero cuyo crecimiento no es inhibido por Tam, y otra sublínea independiente de  $E_2$  (443,445,446). Natoli y col. (361) informan sobre dos nuevas variantes de la línea MCF-7, supersensibles a los estrógenos. Horwitz y col. (447) reportan sobre la existencia de la variante T47D<sub>CO</sub>, insensible a estrógenos. El mismo laboratorio (426) informa sobre otra variante de la misma línea celular con altos niveles de receptores para P a pesar de su resistencia a estrógenos y antiestrógenos. Singh y col. informan sobre clones de la línea MCF-7 sensibles y resistentes a estrógenos y antiestrógenos (448). Miller y col. (449) reportan variantes derivadas de la línea MCF-7 sensibles a estrógenos pero resistentes a antiestrógenos.

Con respecto a los estudios iniciados en células MCF-7 crecidas en SFB libre de esteroides, los resultados son coincidentes con los hallados en células T47D-cl1. El  $E_2$  a dosis bajas no afecta la transferencia de  $^3H$ -GlcN a lípido-azúcares y glicoproteínas mientras que dicha transferencia es disminuída por dosis mayores del estrógeno (Tabla 58) o por la inclusión

de Tam (Tabla 59) en el medio de cultivo.

Debido a los inconvenientes encontrados para demostrar efectos estrogénicos en células cultivadas en presencia de suero, decidimos encarar el cultivo de las mismas en un medio definido libre de suero.

El principal papel del suero añadido al medio es proveer complejos de hormonas (349) además de factores de crecimiento y factores de adhesión (450). El suero es un medio pobre para suplir las necesidades de las células. Es tóxico para las células a una concentración 100 % v/v y es normalmente diluído a una concentración 10 % v/v (450). El suero contiene muchas sustancias que no abandonan el espacio vascular para entrar en contacto directo con las células. Es razonable suponer que muchas de ellas sean potencialmente citotóxicas. Más aún, la indefinida y compleja naturaleza del suero complica la interpretación de los experimentos destinados a esclarecer la interacción de hormonas o drogas con el epitelio mamario. El laboratorio de Sato (347) demostró que es posible reemplazar los requerimientos de suero por mezclas de hormonas y factores séricos purificados, en diversas líneas celulares. Un trabajo de Barnes y col. (299) evidencia que las células MCF-7 pueden crecer en un medio libre de suero suplementado con niveles fisiológicos de insulina, transferrina, EGF, prostaglandina  $F_2 - \alpha$  y  $CI_g$  (cold-insoluble globulin).

Basados en estos protocolos diseñamos los medios definidos descritos en II.2.B.1.

En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos al comparar la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -Glc a células T47D incubadas en medio definido I o en medio con suero. Estos son alentadores porque aunque el crecimiento es más lento en medio definido, las células cultivadas en éste muestran una mayor actividad transferente del azúcar, al referirse la misma al número de células o a la cantidad de proteína.

Con respecto al objetivo último de la utilización del medio definido, éste parece ser el pretendido, ya que en células T47D-cll el efecto estimulador de la P resultó mayor en células cultivadas en medio definido II que en medio suplementado con suero fetal libre de esteroides (III.B.1.8.). En cuanto a la línea MCF-7, se logró un mayor efecto inhibitorio del Tam en células crecidas en medio definido III que en medio con suero deprivado (III.B.2.1.). Esto sería consistente con los hallazgos de que la sensibilidad de las células MCF-7 a la inhibición por Tam es mayor a baja concentración sérica (348) y de que el efecto estimulador del  $\text{E}_2$  sobre células T47D aumenta al disminuir la concentración del suero bovino (346), lo que sugiere que en el suero hay otros mitógenos que pueden enmascarar el efecto hormonal.

Sobre la base de estas observaciones se decidió continuar los estudios sobre células MCF-7 cultivando éstas en un medio



definido (III.B.2.2.).

Los ensayos se realizaron en forma similar a los descriptos para células T47D y, utilizándose los mismos criterios antes enunciados, se pudo caracterizar primariamente a poliprenil fosfato azúcares en esta línea celular, sobre lo que no había evidencias en la literatura.

Al referir la radiactividad incorporada a cada fracción al número de células con las que se realizaron los ensayos, pudo comprobarse que estas células resultaron más activas que las T47D-cll en cuanto a la formación de poliprenil-PP-oligosacáridos y glicoproteínas (Tabla 60). Sin embargo, la incorporación a fase inferior fue menor y, además de ello, sólo el 20 % de la radiactividad incorporada en esta fracción lipídica correspondió a lípidos cargados (Tabla 61). Al analizar los mismos sobre placa delgada, el compuesto de  $R_{Dol-P-Glc}$  0,99-1 demostró estar en menor proporción que en células T47D (Figura 74).

Con respecto a los resultados obtenidos al observar la incorporación de radiactividad al medio de cultivo y a la fase superior de la partición de Folch, es evidente una franca conversión de la Glc a diversos compuestos hidrosolubles (Figura 70).

El efecto del Tam sobre las células MCF-7 fue similar al descrito para las células T47D-cll: una reducción de alrededor del 30 % en la formación de lípidos intermediarios y glicol

proteínas. Sin embargo, en las condiciones empleadas, se observó una disminución en la incorporación del azúcar radiactivo en las fracciones estudiadas en presencia de  $E_2$  (Tabla 60).

El hecho de que a la concentración utilizada el  $E_2$  no haya afectado a las células T47D e inhibido a las MCF-7 podría tal vez deberse a que estas últimas tienen mayor nivel de receptores para  $E_2$  (282). Será de interés reproducir los ensayos utilizando dosis menores del estrógeno.

Otro hecho a tenerse en cuenta es que los ensayos con células MCF-7 no se llevaron a cabo en presencia de SFB tratado con carbón sino en medio definido libre de suero.

Debido a la inclusión de insulina en los medios de cultivo resultan de interés los trabajos de Chabos y col. (346) que demuestran que dicha hormona disminuye la sensibilidad de las células a los estrógenos. Esto es consistente con la disminución de los receptores para estrógenos en células MCF-7 provocadas por la insulina (451,452). No pueden determinar si el efecto de la hormona se debe a su acción mitogénica o metabólica.

Por último, es importante considerar un reciente trabajo (453) en el cual se comprueba que el rojo fenol, añadido como indicador más habitual del medio de cultivo, posee débiles propiedades estrogénicas.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que no pueden sacarse conclusiones generales con respecto a la respuesta hormonal en las líneas celulares estudiadas. Esta premisa se basa en lo ex puesto por Aitken y Lippman (454) que refiriéndose a sus propios hallazgos en células MCF-7, a veces contradictorios, sugieren que las condiciones de cultivo son críticas para evaluar los efectos hormonales.

## V. CONCLUSIONES

1. Se demostró la transferencia de  $^{14}\text{C}$ -Man desde  $\text{GDP-}^{14}\text{C-Man}$  a lípido-azúcares con comportamiento comparable con el de  $\text{Dol-P-}^{14}\text{C-Man}$ , catalizada por fracciones microsomales aisladas de tumores mamarios.

2. Se caracterizó parcialmente la manosil transferasa.

3. La actividad de manosil transferasa resultó mayor en tumores malignos que en benignos.

4. Se detectó, por primera vez, en fracciones microsomales de tumores mamarios, actividad transferente de  $^{14}\text{C-Glc}$  desde  $\text{UDP-}^{14}\text{C-Glc}$  a lípido-azúcares que por los criterios utilizados resultó indistinguible de  $\text{Dol-P-}^{14}\text{C-Glc}$ .

Se caracterizó primariamente la glucosil transferasa.

6. La actividad de glucosil transferasa resultó mayor en tumores malignos que en benignos.

7. Se evidenció transferencia de radiactividad a partir de los nucleótido-azúcares a compuestos con propiedades compatibles con las de  $\text{Dol-PP-oligosacáridos}$ .

8. A partir de la incubación de microsomas de tumores mamarios con  $\text{UDP-}^{14}\text{C-Glc}$  se obtuvo formación de glucoproteínas mar ca da s, que presentaron diferencias entre tumores benignos y ma li gn os.

9. Se demostró transferencia del oligosacárido desde Dol-PP-<sup>14</sup>C-oligosacárido a proteínas aceptoras endógenas de tumores mamarios.

10. Dicha transferencia se vio incrementada por medio del agregado de kojibiosa.

11. Los tumores malignos presentaron mayor actividad transferente del oligosacárido que los tumores benignos o el tejido mamario normal.

12. Incubando células T47D-cl1 con <sup>14</sup>C-Glc se demostró por primera vez la formación de compuestos caracterizados como poliprenil-fosfato-azúcares.

13. El E<sub>2</sub> a dosis bajas no afectó la formación de Dol-P-derivados y la inhibió a dosis altas.

14. Dos antiestrógenos (Naf y Tam) inhibieron la síntesis de lípido-azúcares y glicoproteínas.

15. En células pretratadas con Naf el E<sub>2</sub> produjo una leve estimulación en la formación de lípido-azúcares y glicoproteínas.

16. En células pretratadas con Tam el E<sub>2</sub> disminuyó la formación de lípido-azúcares y glicoproteínas.

17. La P estimuló la formación de poliprenil derivados y glicoproteínas en células T47D-cl1, siendo sus efectos máximos a una concentración de 10<sup>-7</sup> M.

18. Se demostró por primera vez actividad de doliquil kina-  
sa en células T47D-cll.

19. Se analizó el efecto de tunicamicina sobre células T47D  
cll.

20. Incubando células T47D-cll con  $^{35}\text{S}$ -Met se detectó la  
formación de sustancias lipídicas radiomarcadas.

21. Incubando células MCF-7 con  $^{14}\text{C}$ -Glc se describió, por  
primera vez, la formación de poliprenil-fosfato-azúcares.

22. El  $\text{E}_2$   $10^{-9}$  M no afectó o inhibió ligeramente la forma-  
ción de lípido-azúcares y glicoproteínas.

23. El Tam inhibió la formación de los productos menciona-  
dos.

VI. REFERENCIAS

1. Sharon N., Lis H. (1981) C & EN March: 21.
2. Carlson D.M. (1968) J. Biol. Chem. 243: 616.
3. Baenziger J, Kornfeld S. (1974) J. Biol. Chem. 249: 7270.
4. Bahl O. P. (1969) J. Biol. Chem. 244: 575.
5. Newman R. A., Glockner W. M., Uhlenbruck G. (1976) Eur. J. Biochem. 64: 373.
6. Bhavanandan V. P., Umemoto J., Banks J. R., Davidson E. A. (1977) Biochemistry 16: 4426.
7. Endo Y., Yamashita K., Han Y. N., Iwanaga S., Kobata A. (1977) J. Biochem. Tokyo 82: 545.
8. Feizi T., Kabat E. A., Vicari, G., Anderson B., Marsh W. L. (1971) J. Immunol. 106: 1578.
9. Nakajima T., Ballou C. E. (1974) J. Biol. Chem. 249: 7679.
10. Rosenthal A. L., Nordin J. H. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5295.
11. Pazur J. H., Knull H. R., Cepure A. (1971) Carbohydr. Res. 20: 83.
12. Muir L., Lee Y. C. (1969) J. Biol. Chem. 244: 2343.
13. Hallgren P., Lundblad A., Svensson S. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5312.
14. Butler W. T., Cunningham L. W. (1966) J. Biol. Chem. 241: 3882.
15. Spiro R. G. (1967) J. Biol. Chem. 242: 4813.
16. Lamport D. T. A. (1969) Biochemistry 8: 1155.
17. Heath M. F., Northcote D. H. (1971) Biochem. J. 125: 952.
18. Kornfeld R., Kornfeld S. (1980) En: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Lennarz W. J. ed. Plenum Press, New York. pp 1-34.
19. Arima T., Spiro R. G. (1972) J. Biol. Chem. 247: 1836.

20. Shimizu A., Putnam F. W., Paul C., Clamp J. R., Johnson I. L. (1971) *Nature (London), New Biol.* 231: 73.
21. Spiro R. G. (1973) *Adv. Protein Chem.* 27: 349.
22. Kornfeld R., Kornfeld S. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 2536.
23. Schachter H. (1986) *Biochem. Cell. Biol.* 64: 163.
24. Ito S., Yamashita K., Spiro R. G., Kobata A. (1977) *J. Biochem. Tokyo* 81: 1621.
25. Mizuochi T., Yamashita K., Fujikawa K., Kisiel W., Kowata A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 6419.
26. Tai T., Yamashita K., Ito S., Kobata A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 6687.
27. Liang C. J., Yamashita K., Muellenberg C. G., Shichi H., Kobata A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 6414.
28. Hubbard S. C., Ivatt R. I. (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555.
29. Elbein A. D. (1979) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 30: 239.
30. Struck D. K., Lennarz W. J. (1980) *En: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Lennarz, J. ed. Plenum Press, New York. pp 35-83.
31. Kornfeld S., Gregory W., Chapman A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 11649.
32. Hunt L. A. (1980) *Cell* 21: 407.
33. Pennock J. F., Hemming F. W., Morton R. A. (1960) *Nature* 186: 470.
34. Gough D. P., Hemming F. W. (1970) *Biochem. J.* 118: 163.
35. Butterworth P. H., Hemming F. W. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 128: 503.
36. Martin H. G., Thorne K. J. I. (1974) *Biochem. J.* 138: 277.
37. Czichi U., Lennarz W. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 7901.
38. Ericson M. C., Gafford J. T., Elbein A. D. (1978) *Plant Physiol.* 61: 274.
39. Kerr A. K. A., Hemming F. W. (1978) *Eur. J. Biochem.* 83: 581.



40. Godelaine D., Beaufay H., Wibo M. (1979) *Eur. J. Biochem.* 96: 27.
41. Daleo G. R., Hopp H. E., Romero P. A., Pont Lezica R. (1977) *FEBS Lett.* 81: 411.
42. Grange D. K., Adair W. L. Jr. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79: 734.
43. Allen C. M., Kalin J. R., Sack J., Verizzo D. (1978) *Biochemistry* 17: 5020.
44. Rip J. W., Carroll K. K. (1980) *Can. J. Biochem.* 58: 1051.
45. Burton W. A., Scher M. G., Waechter C. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 7129.
46. Quesada Allue L. A. (1979) *FEBS Lett.* 97: 225.
47. Idoyaga-Vargas V., Belocopitow E., Mentaberry A., Carminatti, H. (1980) *FEBS Lett.* 112: 63.
48. Wedgwood J. F., Strominger J. L. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 1120.
49. Struck D. K., Lennarz W. J. (1980) *En: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Lennarz, W. J. ed. Plenum Press, New York. pp 35-83.
50. Parodi A. J., Leloir L. F. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559: 1.
51. Herscovics A., Warren C. D., Bugge B., Jeanloz R. W. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 160.
52. Heifetz A., Elbein A. D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 20.
53. Chambers J., Forsee W. T., Elbein A. D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2498.
54. Forsee W. T., Griffin J. A., Schutzbach J. S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75: 799.
55. Kang M. S., Spencer J. P., Elbein A. D. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 568.
56. Kang M. S., Spencer J. P., Elbein A. D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 8860.
57. Schutzbach J. S., Springfield J. D., Jensen J. W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4170.
58. Spencer J. P., Elbein A. D. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2524.

59. Behrens N. H., Leloir L. F. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66: 153.
60. Trowbridge I. S., Hyman R. (1979) Cell 17: 503.
61. Chapman A., Li E., Kornfeld S. (1979) J. Biol. Chem. 254: 10243.
62. Hubbard S. C., Robbins P. W. (1980) J. Biol. Chem. 255: 11782.
63. Katz F. W., Rothman J. E., Lingappa V. R., Blobel, G., Lodish H. F. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3278.
64. Bergman L. W., Kuehl W. M. (1978) Biochemistry 17: 5174.
65. Lingappa V. R., Lingappa J. R., Prasad R., Ebner K. E., Blobel G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2338.
66. Roberts J. L., Phillips M., Rosa P. A., Herbert E. (1978) Biochemistry 17: 3609.
67. Hanover J. A., Lennarz W. J. (1980) J. Biol. Chem. 255: 3600.
68. Ronnett G. O., Lane M. D. (1981) J. Biol. Chem. 256: 4704.
69. Carey D. J., Sommers L. W., Hirschberg C. B. (1980) Cell 19: 597.
70. Hanover J. A., Lennarz W. J. (1982) J. Biol. Chem. 257: 1982.
71. Snider M. D., Robbins P. W. (1982) J. Biol. Chem. 257: 6796.
72. Snider M. D., Rogers O. C. (1984) Cell 36: 753.
73. McCloskey M. A., Troy F. A. (1980) Biochemistry 19: 2061.
74. Haselbeck A., Tanner W. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1520.
75. Bergman A., Dallner G. (1978) Biochem. Biophys. Acta 512: 123.
76. Nilsson O. S., DeTomas M. E., Peterson E., Bergman A., Dallner G., Hemming F. W. (1978) Eur. J. Biochem. 89: 619.
77. Eggens I., Dallner G. (1980) FEBS Lett. 122: 247.
78. Snider M. D., Sultzman L. A., Robbins, P. W. (1980) Cell 21: 385.
79. Staneloni R. J., Leloir L. F. (1982) CRC Critical Reviews in Biochemistry 12: 289.

80. Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* (1985) 54: 631.
81. Turco S. J., Stetson B., Robbins P. W (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4411.
82. Spiro M. J., Spiro R. G., Bhoyroo V. D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 7668.
83. Staneloni R., Ugalde R., Leloir L. F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105: 275.
84. Trimble R. B., Byrd J. C., Maley F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 11892.
85. Murphy L. A., Spiro R. G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 7487.
86. Sharma C. B., Lehle L., Tanner W. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116: 101.
87. Staneloni R. J., Tolmasky M. E., Petriella C., Leloir L. F. (1981) *Plant Physiol.* 68: 1175.
88. Lehle L., Bause E. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 799: 246.
89. Parodi A. J., Quesada Allue, L. A., Cazzulo J. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6201.
90. Parodi A. J., Cazzulo J. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 7641.
91. Parodi A. J., Quesada Allue L. A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 7637.
92. Parodi A. J., Lederkremer G. Z., Mendelzon D. H. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 5589.
93. Katial A., Prakash C., Vijay I. K. (1984) *Eur. J. Biochem.* 141: 521.
94. Parodi A. J., Martin-Barrientos J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 1.
95. Hoflack B., Cacan R., Verbert A. L. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117: 285.
96. Chen W. W., Lennarz W. J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 7802.
97. Chen W. W., Lennarz W. J. (1977). *J. Biol. Chem.* 252: 3472.
98. Nakayama K., Araki Y., Ito E. (1976) *FEBS Lett.* 72: 287.
99. Reuvers F., Habets-Willems C., Reinking A., Boer P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 486: 541.

100. Khalkhali Z., Marshall, R. D. (1975) *Biochem. J.* 146: 299.
101. Khalkhali Z., Marshall, R. D. (1976) *Carbohydr. Res.* 49: 455.
102. Marshall R. D. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41: 673.
103. Marshall R. D. (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 40: 17.
104. Stenflo J., Fernlund P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 12180.
105. Chou P. Y., Fasman G. D. (1974) *Biochemistry* 13: 211.
106. Aubert J. P., Biserte G., Loucheux-LeFebvre M. H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 410.
107. Bause E., Legler G. (1981) *Biochem. J.* 195: 639.
108. Bause E. (1983) *Biochem. J.* 209: 331.
109. Struck D. K., Lennarz W. J., Brew K. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 5786.
110. Hart G. W., Brew K., Grant G. A., Bradshaw R. A., Lennarz W. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 9747.
111. Aubert J. P., Helbecque N., Loucheux-LeFebvre M. H. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 208: 20.
112. Ronin A., Aubert J. P. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 909.
113. Palade G. (1975) *Science* 189: 347.
114. Rothman J. E., Lenard J. (1977) *Science* 195: 743.
115. Davis B. D., Tai P. C. (1980) *Nature* 283: 433.
116. Blobel G., Dobberstein B. (1975) *J. Cell. Biol.* 67: 835.
117. Blobel G., Walter P., Chang C., Goldman B., Erickson A., Lingappa V. R. (1979) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 33: 9.
118. Inouye M., Halegoua S. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 7: 339.
119. Palmiter R. D., Gagnon J., Walsh K. A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 94.
120. Bonatti S., Blobel G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 12261.

121. Schechter I., Burstein Y., Zemell R., Ziv E., Kantor F., Papermaster D. S. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2654.
122. Jackson R., Blobel G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5598.
123. Walter P., Jackson R. C., Marcus M. M., Lingappa V. R., Blobel G. L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1795.
124. Garoff H., Söderlund H. (1978) J. Mol. Biol. 124: 535.
125. Tomita M., Furthmayr H., Marchesi V. T. (1978) Biochemistry 17: 4756.
126. Chatis P. A., Morrison T. G. (1979) J. Virol. (1979) 29: 957.
127. Katz F. N., Lodish H. F. (1979) J. Cell Biol. 80: 416.
128. Kaufman J. F., Strominger J. L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6304.
129. Porter A. G., Barber C., Carey N. H., Hallewekk R. A., Threlfall G., Emtage J. S. (1979) Nature 282: 471.
130. Rose J. K., Welch W. J., Sefton B. M., Esch F. S., Ling N. C. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3884.
131. Bergman L. W., Kuehl W. M. (1979) J. Supramol. Struct. 11: 9.
132. Kiely M. L., Mc Knight G. S., Schimke R. T. (1976) J. Biol. Chem. 251: 5490.
133. Bergman L. W., Kuehl W. M. (1977) Biochemistry 16: 4490.
134. Rothman J. E., Lodish H. F. (1977) Nature 269: 775.
135. Rothman J. E., Katz F. N., Lodish H. F. (1978) Cell 15: 1447.
136. Jamieson J. C. (1977) Can. J. Biochem. 55: 408.
137. Bélanger L., Fleischer B., Fleischer S., Guillouzo A., Lemonnier M., Chiu J. F. (1979) Biochemistry 10: 1962.
138. Bielinska M., Rogers G., Rucinsky T., Eoime I. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 6152.
139. Idoyaga-Vargas V., Perelmuter M., Burrone O., Carminatti H. (1979) Mol. Cell. Biochem. 26: 123.

140. Parodi A. J., Martin-Barrientos J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 500: 80.
141. Schachter H. (1974) *Biochem. Soc. Symp.* 40: 57.
142. Schachter H. (1978) En: *The Glycoconjugates*. Horowitz M., Pigman E. eds. Academic Press, New York. Vol II, pp 87-189.
143. Morr e D. J., Kartenbeck J., Franke W. W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 599: 71.
144. Carey D. J., Hirschberg C. B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4348.
145. Kornfeld S., Li E., Tabas I. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 7771.
146. Hubbard S. G., Robbins P. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 4568.
147. Chen W. W., Lennarz W. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 5780.
148. Ugalde R. A., Staneloni R. J., Leloir L. F. (1978) *FEBS Lett.* 91: 209.
149. Grinna L. S., Robbins P. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 8814.
150. Scher M. G., Waechter C. J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 2630.
151. Spiro R. G., Spiro M. J., Bhoyroo V. D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 7659.
152. Turco S. J., Robbins P. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 4560.
153. Ugalde R. A., Staneloni R. J., Leloir L. F. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1174.
154. Elting J. J., Chen W. W., Lennarz W. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 2325.
155. Grinna L. S., Robbins P. W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 2255.
156. Lehle L. (1980) *Eur. J. Biochem.* 109: 589.
157. Michael J. M., Kornfeld S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 249.
158. Burns D. M., Touster O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 9991.
159. Brada D., Dubach U. (1984) *Eur. J. Biochem.* 141: 149.
160. Hunt L. A. (1979) *J. Supramol. Struct.* 12: 209.
161. Koide N., Muramatsu T., Kobata A. (1979) *J. Biochem. Tokyo* 85: 149.

162. Muramatsu T., Gachelin G., Jacob F. (1980) *J. Biochem. Tokyo* 88: 685.
163. Rosner M. R., Grinna L. S., Robbins P. W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 67.
164. Sefton B. M., Keegstra K. (1974) *J. Virol.* 14: 522.
165. Tai T., Yamashita K., Ogata-Arakawa M., Koide N., Muramatsu T., Iwashita S., Inoue Y., Kobata A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 8569.
166. Trimble R. B., Tarentino A. L., Plummer T. H. Jr., Maley F. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 4508.
167. Liu T., Stetson B., Turco S. J., Hubbard S. C., Robbins P. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 4554.
168. Hakimi J., Atkinson P. H. (1980) *Biochemistry* 19: 519.
169. Bischoff J., Kornfeld R. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 7907.
170. Shoup V. A., Touster O. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 3845.
171. Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54: 631.
172. Tsai P. K., Frevert J., Ballou C. E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 3805.
173. Tabas I., Kornfeld S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 11655.
174. Tulsiani D. R. P., Hubbard S. C., Robbins P. W., Touster O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 3660.
175. Bergmann J. E., Singer S. J. (1983) *J. Cell. Biol.* 97: 1777.
176. Rothman J. E., Miller R. L., Urbani L. J. (1984) *J. Cell. Biol.* 99: 260.
177. Rothman J. E., Urbani L. J., Brands R. (1984) *J. Cell. Biol.* 99: 248.
178. Chapman A., Kornfeld R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 816.
179. Chapman A., Kornfeld R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 824.
180. Cohen R. E., Ballou C. E. (1980) *Biochemistry* 19: 4345.
181. Harpaz N., Schachter H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4885.
182. Oppenheimer C. L., Hill R. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 799.
183. Tabas I., Kornfeld S. (1983) *J. Biol. Chem.* 253: 7779.

184. Harpaz N., Schachter H. (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 4894.
185. Tulsiani D. R. P., Touster O. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 7578.
186. Mendicino J., Chandrasekaran E. V., Anumula K. R., Davila M. (1981) *Biochemistry* 20: 967.
187. Oppenheimer C. L., Eckhardt A. E., Hill R. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 11477.
188. Wilson J. R., Williams D., Schachter H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 909.
189. Beyer T. A., Sadler J. E., Rearick J. I., Paulson J. C., Hill R. L. (1981) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 52: 23.
190. van den Eijnden D. H., Joziase D. H., Dorland L., van Halbeek H., Vliegthart J. F. G., Schmid K. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92: 839.
191. Creek K. E., Sly W. S. (1984) En: *Lysosomes in Biology and Pathology*. Dingle J. T., Dean R. T., Sly W. S. eds. Elsevier, New York. pp 63-82.
192. Freeze H. H., Yeh R., Miller A. L., Kornfeld S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14874.
193. Edge A. S., Spiro R. G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 4710.
194. Prehm P., Scheid A., Choppin P. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 9669.
195. Takasaki S., Yamashita K., Suzuki K., Iwanaga S., Kobata A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 8548.
196. Takasaki S., Yamashita K., Suzuki K., Kobata A. (1980) *J. Biochem.* 88: 1587.
197. Mizuochi T., Fujii J., Kisiel W., Kobata A. (1981) *J. Biochem.* 90: 1023.
198. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 8476.
199. Fukuda M., Levery S. B., Hakomori S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 6856.
200. Mizuochi T., Nishimura R., Derappe C., Taniguchi H. et al (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14126.



201. Yamashita K., Hitoi A., Tateishi N., Higashi T., Sakamoto Y., Kobata A. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 225: 993,
202. Spiro R. G., Bhojroo V. D. (1984) J. Biol. Chem. 259: 9858.
203. Zhu B. C. R., Fisher S. F., Pande H., Calaycay J., Shively J. E., Laine R. H. (1984) J. Biol. Chem. 259: 3962.
204. Anderson D. R., Grimes W. J. (1982) J. Biol. Chem. 257: 14858.
205. Liscum L., Cummings R. D., Anderson R. G. W., DeMartino G. N., Goldstein J. L., Brown M. S. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7165.
206. Green M. (1982) J. Biol. Chem. 257: 9039.
207. Pollack L., Atkinson P. H. (1983) J. Cell. Biol. 97: 293.
208. Krag S. S., Cifone M., Robbins P. W., Baker R. M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 3561.
209. Harford J. B., Waechter C. J., Earl F. L. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 1036.
210. Scher M. G., Sumbilla C. M., Waechter C. H. (1986) J. Biol. Chem. 260: 13742.
211. Lucas J. J., Levin E. (1977) J. Biol. Chem. 252: 4330.
212. Martin-Barrientos J., Parodi A. J. (1977) Mol. Cell. Biochem. 16: 111.
213. Lucas J. J., Nevar C. (1978) Biochim. Biophys. Acta 528: 475.
214. Farkas V., Svoboda A., Bauer S. (1970) Biochem. J. 118: 755.
215. Melchers F. (1970) Biochem. J. 119: 765.
216. Liras P., Gascon S. (1971) Eur. J. Biochem. 23: 160.
217. Kuo S. C., Lampen J. O. (1972) J. Bacteriol. 111: 419.
218. Struck D. K., Lennarz W. J. (1976) J. Biol. Chem. 251: 25111.
219. Eagon P. K., Heath E. C. (1977) J. Biol. Chem. 252: 2372.
220. Havell E. A., Yamazaki S., Vilcek J. (1977) J. Biol. Chem. 252: 4425.
221. Kratky Z., Biely P., Bauer S. (1975) Eur. J. Biochem. 54: 459.

222. Bessell E. M., Courtenay V. D., Foster A. B., Jones M., Westwood J. H. (1973) *Eur. J. Cancer* 9: 463.
223. Biely P., Kovarik J., Bauer S. (1973) *J. Bacteriol* 115: 1108.
224. Schmidt M. F. C., Schwarz R. T., Ludwing H. (1976) *J. Virol* 18: 819.
225. Siewert G., Strominger J. L. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 767.
226. Stone K. J., Strominger J. L. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 3223.
227. Storm D. R., Strominger J. L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 3940.
228. Stone K. J., Strominger J. L. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1287.
229. Herscovics A., Bugge B., Jeanloz R. W. (1977) *FEBS Lett.* 82: 215.
230. Reuvers F., Boer P., Steyn-Parve E. P. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82: 800.
231. Takatsuki A., Arima K., Tamura G. (1971) *J. Antibiot.* 24: 215.
232. Heifetz A., Keenan R. W., Elbein A. D. (1970) *Biochemistry* 18: 2186.
233. Tkacz J. S., Lampen J. O. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 248.
234. Kuo S. C., Lampen J. O. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 287.
235. Kuo S. C., Lampen J. O., (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 574.
236. Lehle L., Tanner W. (1976) *FEBS Lett.* 71: 167.
237. Struck D. K., Lennarz W. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 1007.
238. Waechter C. J., Harford J. B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 181: 185.
239. Duksin D., Bornstein P. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3433.
240. Takatsuki A., Munekata M., Nishimura M., Kohno K., Onodera K., Tamuga G. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 1831.
241. Duksin D., Holbrook K., Williams K., Bornstein P. (1978) *Exp. Cell. Res.* 116: 153.
242. Damsky C. H., Levy-Benshimol A., Buck C. A., Warren L. (1979) *Exp. Cell. Res.* 119: 1.

243. Kohno K., Hiragun A., Mitsui H., Takatsuki A., Tamura G. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43: 1553.
244. Olden K., Pratt R. M., Yamada K. M. (1979) *Int. J. Cancer* 24: 60.
245. Takatsuki A., Kawamura K., Okina M., Kodama Y., Ito T., Tamura G. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 2307.
246. Takatsuki A., Kawamura K., Kodama Y., Ito T., Tamura G. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43: 761.
247. Ito T., Takatsuki A., Kawamura K., Sato K., Tamura G. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44: 695.
248. Mahoney W. C., Duksin D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 6572.
249. Mahoney W. C., Duksin D. (1980) *Chrom.* 13: 507.
250. Duksin D., Mahoney W. C. (1981) *Biochem. Inter.* 3: 19.
251. Duksin D., Mahoney W. C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 3105.
252. Seiberg M., Duksin D. (1983) *Cancer Res.* 43: 845.
253. Takatsuki A., Fukui Y., Tamura G. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 425.
254. Elbein A. D., Solf R., Dorling P. R., Vosbeck K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7393.
255. Tartakoff A. M. (1983) *Cell* 32: 1026.
256. Alonso-Caplen F. V., Compans R. W. (1983) *J. Biol. Chem.* 97: 659.
257. Ledger P. W., Nishimoto S. K., Hayashi S., Tanzer M. L. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 547.
258. Aragona C., Friesen H. G. (1981) En: *Endocrinología. De Groot L. J. Panamericana, Buenos Aires.* pp 2161-2182.
259. Kon S. K., Cowie A. T. (1961) En: *Milk, The Mammary Gland and Its Secretions.* Academic Press, New York.
260. Gros R. J. (1967) En: *Control of Cellular Growth in Adult Organism.* Teir H., Rytoma T. eds. Academic Press, New York. pp 3-27.

261. Alvarez C. A. (1981) *Bol. Clin. Endocrinol. Metab.* 17: 9.
262. Marx J. L. (1982) *Science* 215: 275.
263. A. M. A. Committee on Research (1960) *J. Am. Med. Assoc.* 172: 1271.
264. Stoll B. A. (1972) En: *Endocrine Therapy in Malignant Disease*. Stoll B. A. ed. W. B. Saunders, Co., London. pp 111-234.
265. Jull J. W. (1977) En: *Chemical Carcinogens*. Searle C. E. ed. Washington D. C.
266. Pasteels J. L., Heuson-Stiennon J., Legros N., Leclercq G., Heuson J. C. (1976) En: *Breast Cancer: Trends in Research and Treatment*. Henson J. C. ed. Raven Press, New York. pp 141-150.
267. Strobl J. S., Lippman M. E. (1978) En: *Hormones, Receptors and Breast Cancer*. McGuire W. L. ed. Raven Press, New York. pp 85-106.
268. Soule H. D., Vázquez J., Long A., Albert S., Brennan M. (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409.
269. Keydar I., Chen L., Karby S., Weiss F. R., Delarea J., Radu M., Chaitcik S., Brenner H. J. (1979) *Eur. J. Cancer* 15: 659.
270. Engel L. W., Young N. A., Tralka T. S., Lippman M. E., O'Brien S. J., Joyce M. J. (1978) *Cancer Res.* 38: 3352.
271. Cailleau R., Young R., Olive M., Reeves W. J. (1974) *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 661.
272. Polanowski F. P., Gaffney E. V., Burke R. E. (1976) *In Vitro (Rockville)* 12: 328.
273. Brooks S. C., Locke E. R., Soule H. D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 6251.
274. McGuire W. L., DeLaGarza M. (1973) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 548.
275. Chamness G. C., Huff K., McGuire W. L. (1974) *Fed. Proc.* 33: 1511.
276. Horwitz K. B., Costlow M. E., McGuire W. L. (1975) *Steroids* 26: 785.
277. Lippman M. E., Bolan G., Huff K. (1976) *Cancer Res.* 36: 4595.
278. Lippman M., Bolan G., Huff K. (1976) *Cancer Res.* 36: 4602.

279. Lippman M., Bolan G., Huff K. (1976) *Cancer Res.* 36: 4610.
280. Lippman M., Huff K., Bolan G. (1977) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 286: 101.
281. Lippman M. E., Osborne C. K., Knazek R., Young N. (1977) *N. Engl. J. Med.* 296: 154.
282. Horwitz K. B., Zava D. T., Thilagar A. K., Jensen E. M., McGuire W. L. (1978) *Cancer Res.* 38: 2434.
283. Burke R. E., Zava D. T., McGuire W. L. (1977) *Clin. Res.* 25: 461.
284. Rose H. N., Mc Grath C. M. (1975) *Science* 190: 673.
285. Schultz G. S., Ebner K. E. (1977) *Cancer Res.* 37: 4489.
286. Monaco M. E., Lippman M. E. (1977) *Endocrinology* 101: 1238.
287. Monaco M. E., Osborne C. K., Lippman M. E. (1977) *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1591.
288. Judge S. M., Chatterton R. T. Jr. (1983) *Cancer Res.* 43: 4407.
289. Monaco M. E., Bronzert D. A., Tormey D. C., Waalkes P., Lippman M. E. (1977) *Cancer Res.* 37: 749.
290. Wright A., Robbins P. W. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 104: 594.
291. Spiro M. J., Spiro R. G., Bhojroo V. D. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 6400.
292. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226: 497.
293. Quesada Allue L. A., Belocopitow E. (1978) *Eur. J. Biochem.* 88: 529.
294. Behrens N. H., Parodi A. J., Leloir L. F. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2857.
295. Parodi A. J., Behrens N. H., Lelcir L. F., Carminatti H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 3268.
296. Parodi A. J., Behrens N. H., Leloir L. F., Dankert M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 270: 529.
297. Fedoroff S. (1967) *Exp. Cell Res.* 46: 642.
298. Lusting E. S., Nebel A. E. (1981) En: *Cultivo de Tejidos. Talleres gráficos de "Medicina Alemana"*. pp 1-59.

299. Barnes D., Sato G. (1979) *Nature* 281: 388.
300. Ng W. K., Livesey S. A., Larkins R. G., Martin J. T. (1983) *Cancer Res.* 43: 794.
301. Brett C. T. (1981) En: *Techniques in Carbohydrate Metabolism B* 305. Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd. pp 1-14.
302. Brew K., Castellino F. J., Vanaman T. C., Hill R. L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 4570.
303. Shafie S., Brooks S. C. (1977) *Cancer Res.* 37: 792.
304. Brett C. T. (1981) En: *Techniques in Carbohydrate Metabolism B* 306. Elsevier/North-Holland Scientific Publishers Ltd. pp 1-8.
305. García R. G., Recondo E., Dankert M. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43: 93.
306. Jeanes A., Wise D. S., Dimler R. J. (1951) *Anal. Chem.* 23: 415.
307. Aminoff D., Morgan W. T., Watkins W. M. (1952) *Biochem. J.* 51: 379.
308. Mes J., Kamm L. (1968) *J. Chrom.* 38: 120.
309. Trevelyan W. V., Procter D. P., Harrison J. S. (1950) *Nature* 166: 444.
310. De Ferrari J. O., Muchnik de L. R., Matsuhira B., Sproviero J. F. (1962) *J. Chromatog.* 9: 283.
311. Keenan R. W., Kruczek M. (1975) *Analytical Biochemistry* 69: 504.
312. Lederkremer G. Z., Parodi A. J. (1983) *J. Chrom.* 262: 299.
313. Quesada Allue L. A. (1979) *Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.*
314. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. (1967) En: *Lipid chromatographic analysis.* Marinetti Ed. (M. Dekker) New York. pp 99-162.
315. Laemmli U. K. (1970) *Nature* 227: 680.
316. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) *Biochemistry* 10: 606.
317. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265.

318. Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* 72: 248.
319. Peterson G. L. (1977) *Anal. Biochem.* 83: 346.
320. Bray G. A. (1960) *Anal. Biochem.* 1: 279.
321. Henning F. W. (1973) En: *Biochemistry, Ser. 1, Vol. 4: Biochemistry of Lipids* Goodwin T. W. ed. University Press, Baltimore. pp 39-97.
322. Behrens N. H. (1974) En: *Biology and Chemistry of Eucaryotic Cells Surfaces, Vol. 7.* Lee E., Smith E. eds. Academic Press, New York pp 159-178.
323. Lennarz W. J. (1975) *Science (Wash., D. C.)* 188: 986.
324. Parodi A. J., Leloir L. F. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1: 58.
325. Pont-Lezica R., Brett C. T., Romero P., Dankert M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 980.
326. Belocopitow E., Marechal L. R., Quesada Allue L. A. (1977) *Mol. Cell. Biochem.* 16: 127.
327. Parodi A. J., Blank E. W., Peterson J. A., Ceriani R. L. (1982) *Breast Cancer Research and Treatment* 2: 227.
328. Schwarz R. T., Datema R. (1980) *Trends Biochem. Sci.* March: 65.
329. Baynes J. W., Hsu A. F., Heah E. C. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 5693.
330. Tkacz J. H., Herscovics A., Wanen C., Jeanloz R. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6372.
331. Waechter C. J., Lucas J. J., Lennarz J. W. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 7570.
332. Martin H. G., Thorn K. J. (1974) *Biochem. J.* 138: 281.
333. Vessey D. A., Zakim D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 53: 499.
334. Vessey D. A., Lysenko N., Zakim D. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 428: 138.
335. Adamany A. M., Spiro R. G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 2835.

336. Butler N., Wolf G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68: 704.
337. Herscovics A., Warren C. D., Jeanloz R. W., Wedgwood J. F., Liu I. Y., Strominger J. L. (1974) *FEBS Lett.* 45: 312.
338. Wedgwood J. F., Strominger J. L., Warren C. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 6316.
339. Tanner W. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 144.
340. Hassid W. Z. (1972) En: *Biochemistry of the glycosidic linkage*. Piras R., Pontis H. eds. Academic Press, New York. pp 315-335.
341. Ugalde R. (1981) Tesis Doctoral. Universidad de Buencs Aires.
342. Ugalde R. A., Staneloni R. J., Leloir L. F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 113: 97.
343. Singh B. N., Lucas J. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 12018.
344. De Rosa P. A., Lucas J. J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 1017.
345. Staneloni R. J., Leloir L. F. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1162.
346. Chalbos D., Vignon F., Keydar I., Rochefort H. (1982) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 276.
347. Hayashi I., Sato G. H. (1976) *Nature* 259: 132.
348. Briand P., Lykkesfeldt A. E. (1984) *Cancer Res.* 44: 1114.
349. Bottenstein J., Hayashi I., Hutchings S., Masui H., Mather J., McClure D. B., Omasa S., Rizzino A., Sato G., Serrero G., Wolke R., Wu R. (1979) *Methods Enzymol.* 58: 94.
350. Hemming F. W. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5: 1223.
351. Eagle H. (1955) *Science* 122: 501.
352. Smith J. D., Freeman G., Vogt M., Dulbecco R. (1960) *Virology* 12: 185.
353. Osborne C. K., Bolan G., Monaco M. E., Lippman M. E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 4536.
354. King G. L., Kahn C. R. (1981) *Nature* 292: 644.



355. Quesada Allue L. A., Baldi A. (1981) IRCS Medical Science 9: 974.
356. Baldi A., Thierbach L. I., Martiarena J. L. (1980) Revta. Soc. Argent. Biol. 56: 64.
357. Mesa-Tejada R., Keydar I., Ramanarayanan M., Ohno T., Fenoglio C., Spiegelman S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1529.
358. Leung J. P., Edgington T. S. (1980) Cancer Res. 40: 316.
359. Leung J. P., Edgington T. S. (1980) Cancer Res. 40: 662.
360. Iacobelli S., Arno E., D'Orazio A., Coletti G. (1986) Cancer Res. 46: 3005.
361. Natoli C., Sica G., Natoli V., Sena A., Iacobelli S. (1983) Breast. Cancer Res. Treat. 3: 23.
362. Thompson C. H., Jones S. L., Whitehead R. H., McKenzie I. F. (1983) J. Natl. Cancer Inst. 70: 409.
363. Colcher D., Hand P., Nuti M., Schlom J. A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3199.
364. Colcher D., Hand P., Wunderlick D., Nuti M., Teramoto Y., Kufe D., Schlom J. (1983) En: Monoclonal antibodies and Cancer. Wright G. T. Jr. ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
365. Burchell J., Wang D., Taylor-Papadimitriou J. (1984) Inst. J. Cancer 34: 763.
366. Papsidero L. D., Nemoto T., Croghan G. A., Mingchu T. (1984) Cancer Res. 44: 4653.
367. Kufe D. W., Nadler L., Sargent L., Shapiro H., Hand P., Austin F., Colcher D., Schlom J. (1983) Cancer Res. 43: 851.
368. Schlom J., Greirer J., Horan-Hand P., Colcher D., Inyhirami G., Weeks M., Pestka S., Fisher P. B., Nogudri P., Kufe D. W. (1985) En: Monoclonal antibodies in Cancer. Seel S., Reisfeld R. eds. Human Press, Inc., New York. pp 247-277.

369. Hayes D. F., Zalutsky M. R., Kaplan W., Noska M., Thor A., Colcher D., Kufe D. W. (1986) *Cancer Res.* 46: 3157.
370. Speake B. K., White D. A. (1978) *Biochem. J.* 176: 993.
371. White D. A., Waechter C. J. (1975) *Biochem. J.* 146: 645.
372. Richards J. B., Evans P. J., Hemming F. W. (1971) *Biochem. J.* 124: 957.
373. Carson D. D., Lennarz W. J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5709.
374. Burton W., Scher M., Waechter C. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 208: 409.
375. Carson D. D., Earles B. J., Lennarz W. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 1152.
376. Lucas J. J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 572: 153.
377. Ivatt R. J. (1981) *Proc. Natl. Acad. sci. USA* 78: 4021.
378. Jensen J. W., Schutzbach J. S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 12899.
379. Speake B. K., White D. A. (1978) *Biochem. J.* 170: 273.
380. White D. A. (1978) *Biochem. J.* 170: 479.
381. Chapman A., Trowbridge R. H., Kornfeld S. (1979) *Cell* 17: 509.
382. Sawka C. A., Pritchard K. I., Paterson A. H. G., Sutherland D. J. A., Thomson D. B., Shelley W. E., Myers R. E., Mobbs B. G., Malkin A., Meakin W. (1986) *Cancer Res.* 46: 3152.
383. Clark J. H., Peck E. J. Jr., Anderson J. N. (1974) *Nature* 251: 446.
384. Katzenellenbogen B. S., Ferguson E. R. (1975) *Endocrinology* 97: 1.
385. Terenius L. (1971) *Acta Endocrinol.* 66: 431.
386. Bulger W. H., Kupfer D. (1976) *Endocrinol. Res. Commun.* 3: 209.
387. Terenius L., Ljungkuist I. (1972) *Gynecol. Invest.* 3: 96.
388. Horwitz K. B., McGuire W. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 8185.
389. Miller M. A., Katzenellenbogen B. S. (1983) *Cancer Res.* 43: 3094.
390. Soto A. M., Sonnenschein C. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 1097.

391. Martínez H. L., Medrano E., Baldi A. (1982) XVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas, Resumen N 42.
392. Edwards D. P., Adams D. J., Savage N., McGuire W. L. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 804.
393. Edwards D. P., Adams D. J., McGuire W. L. (1981) Breast Cancer Res. Treat. 1: 209.
394. Ciocca D. R., Adams D. J., Edwards D. P., Bjercke R. J., McGuire W. L. (1983) Cancer Res. 43: 1204.
395. Rochefort H., Coezy E., Joly E., Westley B., Vignon F. (1980) En: Hormones and Cancer. Iacobelli S. ed. Raven Press, New York. pp 21-29.
396. Westley B., Rochefort H. (1980) Cell 20: 353.
397. Rochefort H. (1983) Conferencia en el Simposio Internacional "Hormonas y Cáncer", Buenos Aires.
398. Elbein A. (1981) Trends Biochem. Sci. 6: 219.
399. García M., Capony F., Derocq D., Simon D., Pau B., Rochefort H. (1985) Cancer Res. 45: 709.
400. Sirbasku D. A. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3786.
401. Sirbasku D. A., Benson R. M. (1979) En: Hormones and Cell Culture, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation . Sato G. H., Ross R. eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Vol 6: 477.
402. Butler W. B., Kirkland W. L., Jorgensen T. L. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 1328.
403. Jozan S., Moure C., Gillois M., Bayard F. (1979) J. Steroid Biochem. 10: 341.
404. Baldi A., Rosemblyt N., Santa Cruz A. R., Martínez H. L., Ivanier S. E., Kacowicz J. R. (1983) En: Evaluación de los aportes de la biología molecular al diagnóstico del cáncer mamario humano, Premio "Academia Nacional de Medicina".

405. Horwitz K. B., McGuire W. L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 2223.
406. Haddow A., Watkinson J. M., Patterson E. (1944) *Br. Med. J.* 2: 393.
407. Lippman M. E., Strobl J., Allegra J. C. (1980) En: *Cell Biology of Breast Cancer*. McGrath C., Brennan M. J., Rich M. A. eds. Academic Press Inc., New York. pp 265-275.
408. Vic P., Vignon F., Derocq D., Rochefort H. (1982) *Cancer Res.* 42: 667.
409. Slaunwhite W. R. Jr., Kirdani R. Y., Sandberg A. A. (1974) En: *Handbook of Physiology*, vol. 1., sect. 7., part 1. Greep R. O., Astwood E. B. eds. American Physiological Society, Washington, D. C. pp 485.
410. Vignon F., Terqui M., Westley B., Derocq D., Rochefort H. (1980) *Endocrinology* 106: 1079.
411. Strobl J. L., Lippman M. E. (1979) *Cancer Res.* 39: 3319.
412. Strobl J. S., Monaco M. E., Lippman M. E. (1980) *Endocrinology* 107: 450.
413. Zava D. T., McGuire W. L. (1978) *Endocrinology* 103: 624.
414. Adams D. J., Edwards D. P., McGuire W. L. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1354.
415. Spiro M. J. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 202: 35.
416. Ramachandran C. K., Gray S. L., Melnykovych G. (1982) *Biochem. J.* 208: 47.
417. Hayes G. R., Lucas J. J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 15095.
418. Burton W. A., Lucas J. J., Waechter C. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 632.
419. Keller R. K., Rottler G. P., Cafmeyer N., Adair W. L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 719: 118.
420. Rossignol D. P., Scher M., Waechter C. J., Lennarz W. J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 9122.
421. Scher M. G., Waechter C. J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 14580.
422. Sakakihara Y., Volpe J. J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 15413.
423. Carson D. D., Lennarz W. J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 4679.

424. Gandhi C. R., Keenan R. W. (1983) *Biochem. J.* 216: 317.
425. Gandhi C. R., Keenan R. W. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 7639.
426. Horwitz K. B., Mockus M. B., Lessey B. A. (1982) *Cell* 28: 633.
427. Butler W. B., Kirkland W. L., Gargala T. L., Goran N., Kelsey W. H., Berlinski P. J. (1983) *Cancer Res.* 43: 1637.
428. Chabos D., Rochefort H. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 421.
429. Chabos D., Rochefort H. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 1231.
430. Hagley R. D., Moore M. R. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 520.
431. Murphy L. J., Sutherland R. L., Stead B., Murphy L. C., Lazarus L. (1986) *Cancer Res.* 46: 728.
432. Nakamura K., Compans R. W. (1978) *Virology* 84: 303.
433. Heifetz A., Kinsey W. H., Lennarz W. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4528.
434. Parsons T. F., Pierce J. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7089.
435. Bedi G. S., French W. C., Bahl O. P. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 4345.
436. Heifetz A., Watson C., Johnson A. R., Roberts M. K. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 13581.
437. Hsu C. H., Kingsbury D. W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 9035.
438. Anumula K. R., Bahl O. P. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 645.
439. Cummings R. D., Kornfeld S., Schneider W. J., Hobgood K. K., Tolleshaug H. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 15261.
440. Yamashita K., Veda I., Kobata A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 14144.
441. Freeze H. H., Mierendorf R. C., Wunderlich R., Dimond R. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 10641.
442. Keydar I., Harenvini M., Weiss F. R., Karby S., Delarea Y., Ohno T., Sweet R., Wayak R., Mesa-Tejada R., Ramanarayan M., Spiegelman S. (1980) 12<sup>th</sup> Meeting on Mammary Cancer in Experimental Animals and Man. Maastricht Netherlands.

443. Nawata H., Bronzert D., Lippman M. E. (1981) J. Biol. Chem. 256: 5016.
444. Vignon F., Lippman M. E., Nawata H., Derocq D., Rochefort H. (1984) Cancer Res. 44: 2084.
445. Nawata H., Chong M. J., Bronzert D., Lippman M. E. (1981) J. Biol. Chem. 256: 6895.
446. Davidson N. E., Bronzert D. A., Chambon P., Gelmann E. P., Lippman M. E. (1986) Cancer Res. 46: 1904.
447. Horwitz K. B. (1985) Endocrinology 116: 2236.
448. Singh R. K., Ruh M. F., Butler W. B., Ruh T. S. (1986) Endocrinology 118: 1087.
449. Miller M. A., Lippman M. E., Katzenellenbogen B. S. (1984) Cancer Res. 44: 5038.
450. Sato G., Gordon H. (1980) En: Hormones and Cancer. Iacobelli S. et al. eds. Raven Press, New York. pp 281-285.
451. Butler W. B., Kelsey W. H., Goran N. (1981) Cancer Res. 41: 82.
452. Moore M. R. (1981) J. Biol. Chem. 256: 3637.
453. Berthois Y., Katzenellenbogen J. A., Katzenellenbogen B. S. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2496.
454. Aitken S. C., Lippman M. E. (1982) Cancer Res. 42: 1727.

V. ABREVIATURAS

Ala	alanina
Asn	asparragina
ATP	5' adenosina trifosfato
C/M	cloroformo/metanol
C/M/A	cloroformo/metanol/agua
ConA	concanavalina "A"
CTP	5' citidina trifosfato
Cys	cisteína
DEAE	dietil-aminoetil
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
Dol	dolicol
Dol-P	doliquil fosfato
Dol-P-	doliquil fosfato derivado
Dol-PP	doliquil pirofosfato
Dol-PP-	doliquil pirofosfato derivado
E <sub>2</sub>	estradiol
EDTA	etilen diamino tetraacetato
EGF	epidermal growth factor
Fuc	fucosa
Gal	galactosa
GalNac	N-acetil-galactosamina
GDP	5' guanosina difosfato
GDP-	5' guanosina difosfato derivado
Glc	glucosa
GlcN	glucosamina
GlcNac	N-acetil-glucosamina
GP	glicoproteína
Man	manosa
MEM	Eagle's Minimal Essential Medium
Met	metionina
Naf	nafoxidina
NANA	ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico)
P	progesterona
PBS	buffer fosfato de sodio (cantidades equimoleculares de fosfato de Na mono y dibásico, pH 6,7).

R <sub>f</sub>	relación de movilidad de la sustancia con el frente del solvente.
R <sub>Glc</sub>	idem con respecto a la movilidad de la Glc
RE	retículo endoplasmático
REL	retículo endoplasmático liso
RER	retículo endoplasmático rugoso
SDS	dodecil (lauril) sulfato de Na
Ser	serina
SFB	suero fetal bovino
Tam	tamoxifeno
TCA	ácido tricloroacético
Thr	treonina
Tris	2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propandiol
UDP	5' uridina difosfato
UDP-	5' uridina difosfato derivado
UMP	5' uridina monofosfato
UV	luz ultravioleta