

Tesis de Posgrado

Glicolípidos en Neurospora Crassa

Maggese, María Cristina Irene

1981

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

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

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

Cita tipo APA:

Maggese, María Cristina Irene. (1981). Glicolípidos en Neurospora Crassa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1670_Maggese.pdf

Cita tipo Chicago:

Maggese, María Cristina Irene. "Glicolípidos en Neurospora Crassa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1670_Maggese.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

GLICOLIPIDOS EN NEUROSPORA CRASSA

Autor: Lic. María Cristina Irene Maggese

Director: Prof. Dr. Héctor N. Torres

Tesis presentada para optar por el título de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

-1981-

1670
L 2
~

A mi madre y a mi hermana

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

- Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro contribuyeron a la realización de esta tesis.
- Al Dr. Héctor N. Torres por haber aceptado dirigir este trabajo y por su constante guía y apoyo a lo largo de estos años.
- Al Dr. Luis F. Leloir y a los miembros del Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación "Campomar", por haberme permitido llevar a cabo este trabajo en el Instituto.
- A la Dirección del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme autorizado a hacer este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.
- Al Dr. Eduardo G. Gros y su equipo de colaboradores en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haber realizado los análisis de algunas muestras en cromatografía gaseosa y espectrometría de masa y por haberme ayudado a interpretar los resultados.
- Al Dr. Luis A. Quesada por haberme iniciado en los secretos de la metodología de lípidos.

- Al Dr. José D. Fontana por su colaboración en algunas etapas de este trabajo.
- A los Dres. Susana Passeron, Enrique Belocopitow, María Teresa Tellez de Iñón y Mirtha M. Flawiá, quienes me alentaron permanentemente con sus consejos y amistad.
- A mis amigos en el Instituto y en la Facultad por su constante apoyo y afecto.
- A la Lic. María Delia Bertoni por el asesoramiento brindado y a la Lic. Beatriz Dimant por la ayuda en la compaginación y ordenamiento del manuscrito.
- Al Sr. Norberto Malarini por las láminas y las figuras, y a la Sra. María Ibáñez por haber mecanografiado el texto.
- A todo el personal administrativo y técnico del Instituto por la gentil ayuda prestada en todo momento.

INTRODUCCION

	Pg.
I.- <u>GENERALIDADES</u>	
I.1.Estructuras y clasificación.	2
I.1.1.Glicoglicerolípidos.	2
I.1.2.Esterilglicósidos y esterilglicósidos acilados en plantas.	12
I.1.3.Glicósidos de hidroxiaácidos grasos.	14
I.1.4.Azúcares esterificados a ácidos grasos.	18
I.1.5.Poliprenilfosfoazúcares.	19
I.1.6.Glicoesfingolípidos.	24
I.1.7.Otros glicolípidos.	33
II.- <u>GLICOESFINGOLIPIDOS</u>	
II.1.Función de los glicoesfingolípidos.	41
II.2.Biosíntesis de los glicoesfingolípidos.	62
II.2.1.Galactosilceramidas.	63
II.2.2.Sulfátidos.	66
II.2.3.Glucosilceramidas.	67
II.2.4.Gangliósidos.	69
II.3.Glicoesfingolípidos en hongos.	74
III.- <u>NEUROSPORA CRASSA</u>	
III.1.Características.	82

MATERIALES Y METODOS

I. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLOGICO

I.1.Organismo utilizado.	88
I.2.Curva de crecimiento.	89
I.3.Incorporación de precursores radiactivos.	90
I.3.1.C ¹⁴ -Glucosa.	90
I.3.2.Sulfato de sodio radiactivo.	91

II. OBTENCION DEL EXTRACTO LIPIDICO

III. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO LIPIDICO

III.1.Cromatografía en columnas de ácido silícico.	92
III.2.Cromatografía en columnas de intercambio iónico.	93
III.3.Cromatografía en columnas de ácido silícico eluidas con gradiente lineal de metanol en cloroformo.	94

IV. DEGRADACION QUIMICA

IV.1.Tratamiento con ácido.	95
IV.1.1.Hidrólisis suave.	95
IV.1.2.Hidrólisis enérgica.	96
IV.1.3.Metanólisis.	98
IV.2.Tratamientos con álcali.	99

IV.2.1.Saponificación.	99
IV.2.2.Hidrólisis alcalina intermedia.	99
IV.2.3.Hidrólisis alcalina fuerte.	100
V. <u>METODOS ANALITICOS</u>	
V.1.Azúcares totales.	100
V.2.Cromatografía en capa fina.	101
V.2.1.Preparación de placas de sílice.	101
V.2.2.Elución de los lípidos de las placas de sílice.	102
V.2.3.Solventes para cromatografía en capa fina.	103
V.2.4.Revelado de los lípidos.	104
V.2.5.Autoradiografía.	106
V.3.Cromatografía en papel.	107
V.3.1.Solvente.	107
V.3.2.Revelado de los monosacáridos.	107
V.4.Cromatografía gaseosa. Espectrometría de masa.	107
V.4.1.Análisis del componente azúcar.	108
V.4.2.Análisis del componente ácido graso.	109
V.4.3.Análisis del componente, esfingosina.	111
VI. <u>REACTIVOS</u>	113

RESULTADOS Y DISCUSION

I. <u>CURVA DE CRECIMIENTO</u>	115
II. <u>DISTRIBUCION DE LOS LIPIDOS EN LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL EXTRACTO LIPIDICO.</u>	115
II.1.Fase superior.	117
II.2.Fase inferior.	119
II.2.1.Cromatografía en ácido silícico.	119
II.2.2.Cromatografía en DEAE celulosa.	123
III. <u>PURIFICACION DE LAS FRACCIONES QUE CONTIENEN GLICOLIPIDOS.</u>	
III.1.Cromatografía en ácido silícico.	125
III.2.Cromatografía preparativa en capa fina.	127
IV. <u>CEREBROSIDOS</u>	
IV.1.Cromatografía en capa fina en distintos solventes.	129
IV.2.Hidrólisis alcalina.	132
IV.3.Metanólisis e hidrólisis ácida.	132
IV.3.1.Caracterización de la fracción glicosídica de los cerebrósidos A y B.	132
IV.3.1.1.Identificación del monosacárido por cromatografía en papel.	134
IV.3.1.2.Identificación de los azúcares por cromatografía gaseosa.	134

IV.3.2.Caracterización de la fracción lipídica de los cerebrósidos A y B.	137
IV.3.2.1. Identificación de los ácidos grasos por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa.	138
IV.3.2.2. Identificación por cromatografía en capa fina de las bases aminadas de cadena larga.	157
IV.3.2.3. Identificación por cromatografía gaseosa - espectrometría de masa de las bases aminadas de cadena larga.	157
V. <u>GLICOESFINGOLIPIDOS DE MAS DE UN AZUCAR.</u>	182
V.1. Cromatografía en capa fina.	185
VI. <u>ESTERILGLICOSIDOS.</u>	187
VI.1. Cromatografía en capa fina.	188
VII. <u>SULFOLIPIDOS</u>	191
VII.1. Biosíntesis de sulfolípidos con S ³⁵ .	193
VII.2. Detección directa en cromatografía antes y después de la hidrólisis alcalina fuerte.	197
VIII. <u>BIOSINTESIS DE GLICOLIPIDOS CON C¹⁴ GLUCOSA.</u>	198
<u>CONCLUSIONES.</u>	201
<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	204

I N T R O D U C C I O N

I. GENERALIDADES

Los lípidos comprenden un amplio grupo de compuestos cuyas características comunes principales son la porción hidrofóbica relativamente grande de su molécula y por ende su mayor solubilidad en solventes orgánicos. Se incluyen así dentro de este grupo, hidrocarburos de cadena larga, alcoholes, aldehídos, ácidos grasos, ésteres, aminas y sustancias derivadas tales como glicéridos, ésteres de cera, fosfolípidos, glicolípidos, esteroides y carotenoides. Los glicolípidos reúnen las características de los lípidos pero tienen además en su molécula una fracción de carbohidratos. Si bien están ampliamente distribuidos, son componentes menores de la mezcla de lípidos aunque, día a día, aumenta el conocimiento sobre la diversidad de funciones que ellos cumplen dentro de la célula o en los seres vivos. Los glicolípidos vegetales, de hongos y microorganismos, presentan gran diversidad estructural mientras que los provenientes de animales son en su mayoría glicoglicerolípidos o glicoesfingolípidos.

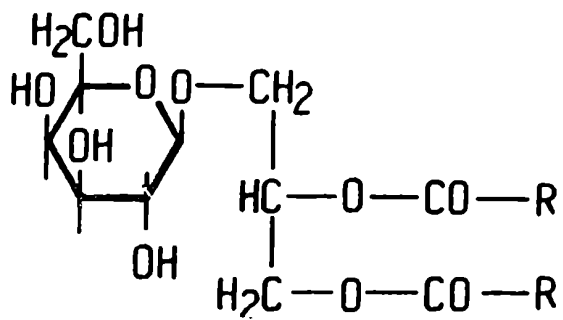
I. 1. ESTRUCTURAS Y CLASIFICACION

Los glicolípidos pueden dividirse en seis grandes grupos según cual sea la fracción lipídica que los constituye.

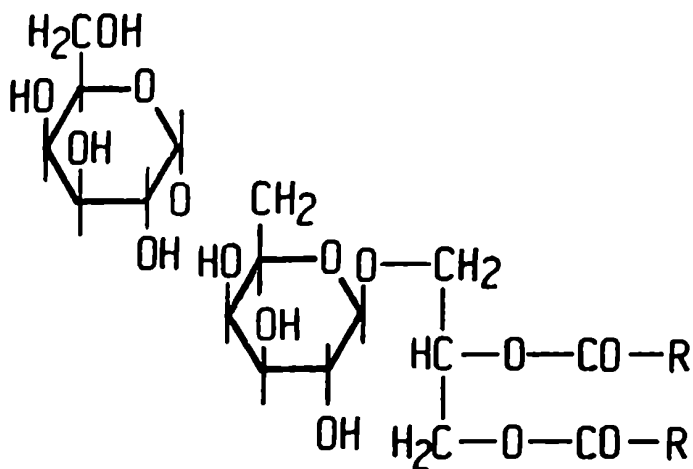
- I.1.1. Glicoglicerolípidos.
- I.1.2. Esteril-glicósidos.
- I.1.3. Glicósidos de hidroxí-ácidos grasos.
- I.1.4. Azúcares esterificados a ácidos grasos.
- I.1.5. Poliprenilfosfoazúcares.
- I.1.6. Glicoesfingolípidos.
- I.1.7. Otros glicolípidos.

I. 1.1. GLICOGLICEROLIPIDOS

Carter y col. (1) aislaron de un extracto bencénico de harina de trigo dos fracciones de glicolípidos que contenían D-Galactosa y glicerol. Los análisis posteriores tales como hidrólisis, degradación enzimática y oxidación con periodato demostraron que se trataba de mono y digalactosas unidas glicosídicamente al grupo OH^- de un glicerol, a los que se llamó mono y digalactosildiglicéridos (MGD y DGD respectivamente), cuyas fórmulas se ven en la figura 1.



A



B

Figura 1: A) 3-O-(β-D-galactopiranosil-sn-1,2-diacil-glicerol. Monogalactosil diglicérido (MGD).
 B) 3-O-[-α-D-galactopiranosil-(1'→6)-O-β-D-galactopiranosil]-sn-1,2-diacil glicerol. Digalactosil diglicérido (DGD).(52).

Posteriormente fueron aislados de numerosas plantas y también se los encontró en bacterias, hongos y mamíferos.

Entre las bacterias, especialmente Gram positivas se aislaron otros glicosil-diglicéridos, (ver Tabla 1).

En los hongos no está claramente definida la existencia de los glicosil-diglicéridos. El trabajo de Baraud y col. (1970), (2) menciona la existencia de un monogalactosildiglicérido en levaduras, pero no hay una adecuada caracterización del mismo. En zoosporas de Blastocladiella emersonii, Mills y Cantino (3), identificaron por cromatografía en capa delgada, dos compuestos con movilidades equivalentes a mono y digalactosildiglicéridos. Estos compuestos constituyen una fracción mayoritaria de los lípidos de este hongo acuático. Por otro lado, una investigación exhaustiva, en *Saccharomyces*, de los glicolípidos lábiles al álcali, más abundantes, con movilidad en las cromatografías en capa delgada de digalactosildiglicérido pareció indicar que se tratan simplemente de azúcares acilados (4). Brennan, (5) aisló pequeñas cantidades de un compuesto álcali lábil de Aspergillus niger que él identificó como una mezcla de diglucosil y digalactosil diglicérido. Aparentemente esta sería la primera evidencia concreta sobre la existencia de diglicosildiglicéridos en hongos, basada en una incuestionable caracterización. Lamentablemente, las cantidades encontradas de este compuesto resultaron tan pe-

TABLA 1

Algunos sn-3-O-glicósil diglicéridos bacterianos (52)

<u>Nombre</u>	<u>Estructura de fracción glicosídica</u>	<u>Bacteria</u>
Monoglucosil diglicérido	α -D-glucopiranosido	<u>Pneumococcus Mycoplasma</u>
Digluosil diglicérido	β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D- β -D-glucopiranosido	<u>Staphylococcus</u>
Digluosil diglicérido	α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D- α -D-glucopiranosido	<u>Mycoplasma Streptococcus</u>
Dimanosil diglicérido	α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-D- α -D-manopiranosido	<u>Micrococcus lysodeikticus</u>
Galactofuranosil diglicérido	β -D-galactofuranosido	<u>Mycoplasma Bacteroides</u>
Galactosilglucosil diglicérido	α -D-galactopiranosil(1 \rightarrow 2)-D- α -D-glucopiranosido	<u>Lactobacillus</u>
Glucosilgalactosil glucosil diglicérido	α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D- α -D-glucopiranosido	<u>Lactobacillus</u>

queñas que pese a todo esto, se pone en duda el resultado de estas observaciones.

En los mamíferos, la presencia de galactoglicerolípidos en tejidos cerebrales ha sido descrita por distintos grupos (6), (7), (8). Cuatro glicolípidos menores se purificaron de un extracto lipídico de la sustancia blanca de cerebro bovino (7), uno de los componentes que representa más o menos el 0,2% de toda la materia blanca, se identificó como una mezcla de galactopiranosil diacilglicerol y galactopiranosil mono alquilmonoacil glicerol.

Las estructuras de estos compuestos fueron caracterizadas como 1,2-di-O-acil-3-O-(β -D-galactopiranosil)-sn-glicerol y 1-O-alkil-2-O-acil-3-O-(β -D-galactopiranosil)-sn-glicerol, (7), (9), (10). El alquil éter de estos galactoglicerolípidos es predominantemente un residuo hexadecil que también se encontró entre los glicolípidos de cerebro de bovino, cerdo y oveja, pero no fue detectado en la fracción monogalactosil diglicérido del cerebro de rata (11). La estructura del monogalactosil diglicérido es idéntica a la de las plantas, pero la composición de ácidos grasos es distinta. En los animales, el 1,2-di-O-acil-3-O- β -D-galactopiranosil-sn-glicerol (monogalactosil diglicérido) aparece en el sistema nervioso central y periférico. Este compuesto constituye más o menos

el 0,5% del total de los lípidos del sistema nervioso, existiendo evidencias sobre la implicancia del mismo en el proceso de mielinación. Aparece casi exclusivamente en tejido nervioso mielinado y su biosíntesis es mayor cuando coincide con el período de máxima mielinación. La disminución en la concentración del lípido después de la mielinación indica que hay un metabolismo (turnover) activo.

Otra evidencia de la asociación del monogalactosil diglicérido con el proceso de mielinación se ha obtenido de estudios con la cepa de ratones "jimpy" (12). Estos ratones son mutantes deficientes en mielina y presentan poca o ninguna capacidad de sintetizar o acumular monogalactosil diglicérido (13). Casi todo el monogalactosil diglicérido de los homogenados de cerebro de ratón "jimpy" está en la fracción microsomal (17,1 nmoles/g de peso húmedo) en lugar de la fracción mielina (2,7 nmoles/g peso húmedo), mientras que en los homogenados de cerebro de ratón normal hay 168 nmoles/g en los microsomas y 155 nmoles/g en la mielina. La baja concentración de monogalactosil diglicérido en los "jimpy" no puede atribuirse a la alta actividad de las enzimas catabólicas, porque los niveles de α y β galactosidasas y galactolipidolipasas son normales (13). Deshmukh, (1974) (14) demostró que las células de la oligodendria son los sitios primarios de síntesis del monogalactosil diglicérido en la mielina.

Sobre esta base, puede considerarse al monogalactosil diglicérido como un buen marcador para la mielinación en el diagnóstico de enfermedades neurológicas.

Sulfolípidos

Existen derivados sulfatados de los glicoglicerolípidos y el primero que se aisló, en el alga *Chlorella*, fue el sulfoglicosil diglicérido, (Fig. 2) (15), (16).

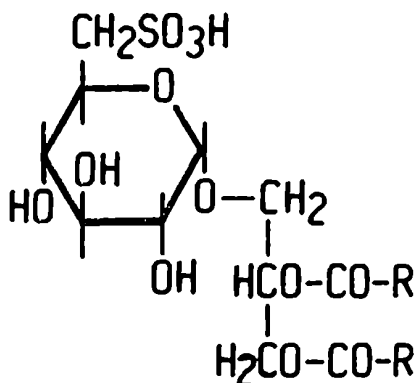
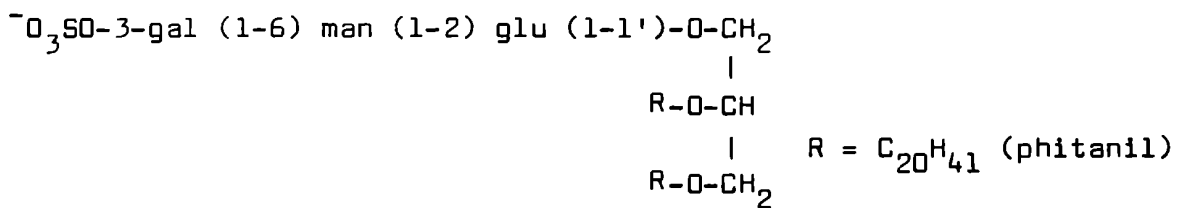


Figura 2: 6-sulfo- α -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 3')-1',2'-diacyl-sn-glicerol. Sulfoglicosil diglicérido.(17).

Este sulfolípidos (17) contiene un grupo ácido sulfónico ($\text{R-SO}_3\text{H}$) y no un grupo éster ($\text{R-O-SO}_3\text{H}$) como los sulfátidos de animales que en su mayoría son sulfoglicosil diglicéridos (122).

Este compuesto que parece estar concentrado aunque no localizado exclusivamente en las membranas lamelares de los cloroplastos (18), (19), (20), (21), se encontró también en todas las plantas fotosintéticas y algas donde se lo buscó. (20).

En bacterias muy halofílicas, se halló por otro lado un éster sulfato con la siguiente estructura (22), (23):



En Mycobacterium tuberculosis, además existe otro glicolípido sulfato, el 2,3,6,6' - tetra-acetil- α - α' -trehalosa-2'-sulfato. (24).

En los eucariotes superiores, por su parte, se han caracterizado varios sulfogalactoglicerolípidos. El monoalquil-monoacil-gliceril-monogalactósido-sulfátido fue aislado por Kornblatt y col. (25) en el testículo de la rata. Independientemente, Ishizuka y col. (26) aislaron y caracterizaron otro sulfoglicolípido en los testículos y espermatozoides del cerdo. Es prácticamente idéntico al de la rata, con conformación β -anomérica para la porción galactosil y el grupo O-acil está unido al C-2 del glicerol. Los estudios de metilación sugirieron que el grupo sulfato está unido a la porción 3' de la galactosa.

Ishizuka lo llamó "seminolípido" y lo identificó como 1-O-alkil-2-O-acyl-3-(β -3'sulfogalactosil)-glicerol. En los testículos de cobayo aislaron otro compuesto de estructura similar.

Murray y col. (27) estudiaron la presencia de estos sulfogalactoglicerolípidos en testículos de otros cordados para intentar establecer una correlación filogenética con respecto a estos compuestos. Investigando en aves y peces Levine y col. (1974) (28) encontraron que los testículos de los patos y las lechuzas contenían dos glicolípidos principales pero estos eran sulfogalactosilceramida y galactosilceramida. Los testículos del salmón y la trucha maduros también contenían dos glicolípidos principales, pero en este caso eran sulfogalactosilglucosil ceramida y galgluceramida. En consecuencia, parece que los testículos de aves y peces carecen del sulfogalactosilglicerolípido.

Por otro lado, Ishizuka y Yamakawa (1974), (26) han caracterizado parcialmente los glicolípidos de testículos humanos adultos. Los glicolípidos principales resultaron ser el sulfogalactosil-glicerolípido y sus compuestos no sulfatados; pero también se detectó la presencia de sulfogalactosilceramida y otros glicoesfingolípidos.

En la Tabla 2 se resume la distribución específica de sulfolípidos en los testículos de varios organismos.

TABLA 2

Distribución específica de sulfolípidos en testículos de varios organismos.

Especie	Sulfogalactosil glicerolípido	Sulfogalactosil ceramida	Sulfogalactosil glucosil ceramida
cobayo			
humana			+
ratón			-
cerdo			-
rata			
pato		+	
lechuza		+	
salmón		trazas	
trucha			

Además en cerebro de rata se han descrito dos compuestos de este tipo. Uno de ellos parece ser el 5'-sulfogalactoglicerolípido aún cuando su contenido acilo y alquilo es más heterogéneo que el del sulfogalactoglicerolípido del testículo de rata (30).

En los hongos, hasta el momento al menos, no se habían detectado este tipo de compuestos. Sin embargo, en este trabajo de tesis se presentan algunos resultados que demostrarían la existencia de este tipo de compuestos en Neurospora crassa.

I. 1.2. ESTERILGLICOSIDOS Y ESTERIL GLICOSIDOS ACILADOS EN PLANTAS.

Los esteroides y sus derivados son componentes comunes de las células vegetales y han sido aislados e identificados en numerosas plantas y algunos hongos (31), (32), (2) y (4).

Se han identificado cuatro clases de lípidos basados en esteroides: esteroides libres, ésteres de esteroles, esterilglicósidos y esterilglicósidos acilados. Sus funciones no se conocen bien, pero se cree que son componentes de membrana y dado que la conformación y solubilidad de los esteroides tanto como su interacción con otros componentes de membrana pueden ser afectados por la glicosilación y acilación se ha sugerido que pueden jugar un importante papel en regular la permeabilidad de la membrana.

Los esterilglicósidos fueron descritos por primera vez en 1913 por Power y Salway (33), mientras que los esterilglicósidos acilados han sido aislados por Le Page (34). Desde entonces se aislaron numerosos compuestos de este tipo (35), (36), (37), variando notablemente de una planta a otra (38), (39), (40), (41) y también dentro de la misma planta en distintas etapas del desarrollo (41), (42), (43). El componente azúcar es generalmente glucosa, pero también se ha encontrado manosa (44) y galactosa (45). Entre los esteroides que se glicosilan los más frecuente-

mente encontrados son el β -sitosterol y el estigmasterol y las cantidades relativas de ambos varían según los tejidos en que se los encuentre. (Fig. 3)

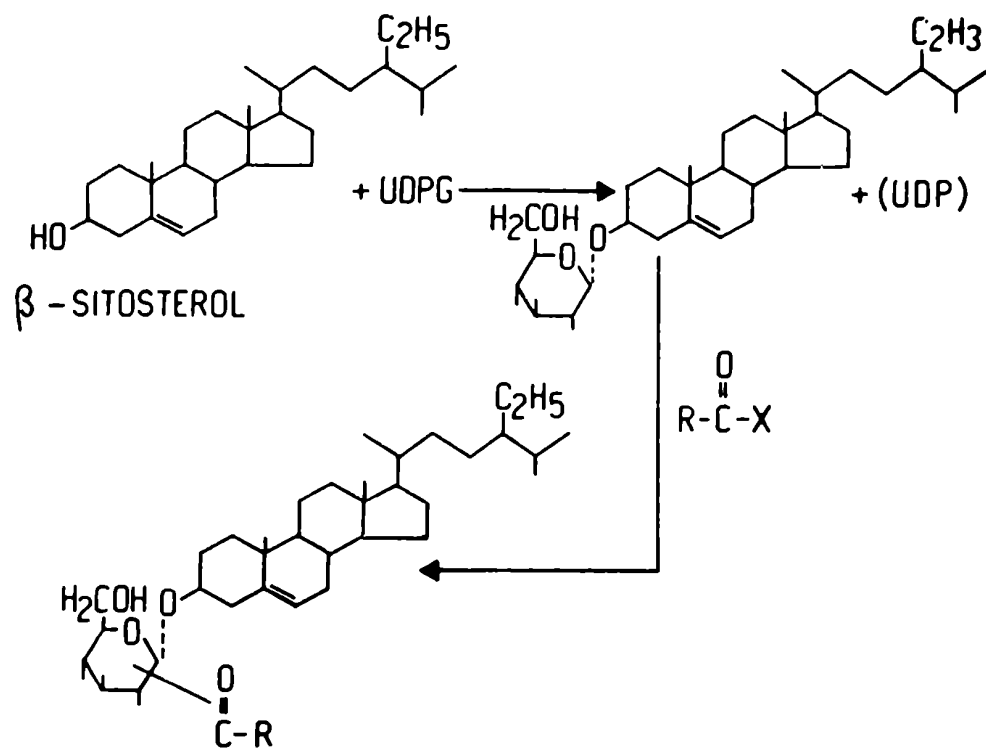


Figura 3: Reacciones involucradas en la glicosilación y acilación de los esteroides para formar esterilglicósidos y esterilglicósidos acilados.(155).

En los hongos, Esders y Light, (31) demostraron la existencia de estos compuestos en Candida bogoriensis observando la incorporación de ^{14}C -UDPG a un aceptor que resultó ser el ergosterol, aunque el colesterol también era activo. El producto

aparentaba estar en cantidades apreciables pero no se pudo aislar por su inestabilidad. Por cromatografía en capa delgada, Baraud y col. (1970), (2) encuentran esteril glicósidos como componentes de las membranas citoplasmáticas de Saccharomyces cerevisiae y en 1974 Työrinoja, Nurminan y Suomalainen (4) los encuentran como componentes de la pared celular de la misma levadura. Parodi (1976), (32) los biosintetizó a partir de una fracción particulada de la misma levadura.

Las primeras evidencias de la existencia de estos compuestos en Neurospora crassa se presentan en esta tesis.

I. 1.3. GLICOSIDOS DE HIDROXIACIDOS GRASOS

Los ejemplos más comunes son los ramnolípidos presentes en Pseudomonas aeruginosa. (Fig. 4)

Se forma en grandes cantidades cuando la bacteria se cultiva en un medio rico en glicerol, pues éste es utilizado para la biosíntesis tanto de la ramnosa como del ácido graso. A diferencia de los ácidos ustilágicos estos parecen ser homogéneos ya que por hidrólisis dan cantidades equimoleculares de L-ramnosa y del ácido graso. El ramnolípidos tiene acción bacteriostática hacia Mycobacterium tuberculosis, cepa H₃₇R_v y es tóxica para los ratones.

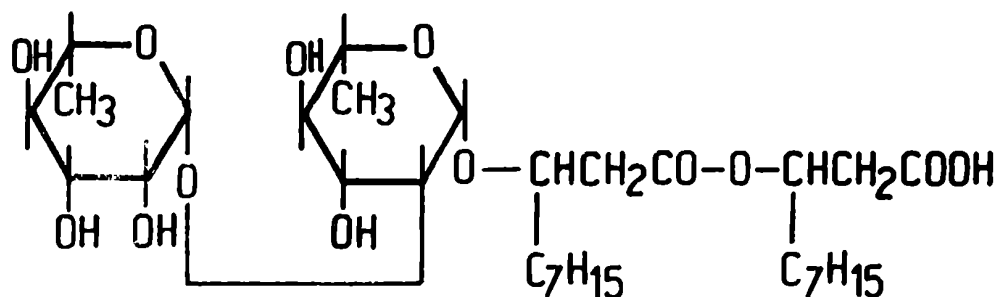
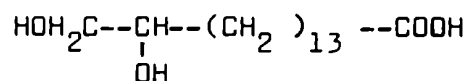


Figura 4: 2-O- α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil-D-3-hydroxidecanoil-D-3-ácido hidroxidecanoico. Ramnolípido.

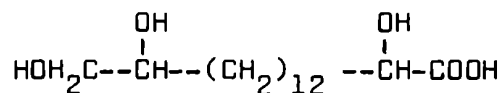
Otros glicósidos son los ácidos ustilágicos, éstos son productos extracelulares de cultivos aireados de Ustilago maydis el hongo que ennegrece los granos de cereales (corn-smut fungus). Estos ácidos son insolubles en agua y son los responsables de la actividad antibiótica de los cultivos de Ustilago.

Haskins y col. (1955), (46) y Boothroyd y col. (1956), (47) caracterizaron parcialmente de un aceite de Ustilago maydis un disacárido acilado que contenía eritritol y manosa. Fluharty y O'Brien (1969), (48) reexaminaron el hongo y encontraron un glicolípido con idéntica estructura pero asociado a la célula y no como producto extracelular.

El ácido glucostílico A es el residuo β de celobiosa acilado unido glicosídicamente al ácido ustílico A:



y el ácido glucostílico B es lo mismo pero unido glicosídicamente al ácido ustílico B.



Soforósidos

Estos glicósidos son abundantes en levaduras, mohos y algunos basidiomicetes. Los soforósidos de Candida bogoriensis y Torulopsis apícola no se aislaron de la célula, son todos productos extracelulares, aunque en *Candida* se detecta intracelularmente varios días antes de que la excreción comience, (49). (Fig. 5)

Laine y col. (1972), (50) describieron un lípido que está en gran cantidad en Aspergillus niger, el ácido monoglucosilooctadecenoico y que parece estar asociado a las células pues no se lo encuentra en el medio de cultivo. Se le asigna un papel en la membrana (51) dado que si el hongo se cultiva en un medio deficiente de fosfatos produce este ácido como lípido polar dominante ya que en estas condiciones, la síntesis de fosfolípidos en el micelio es deficiente. Por el contrario, si

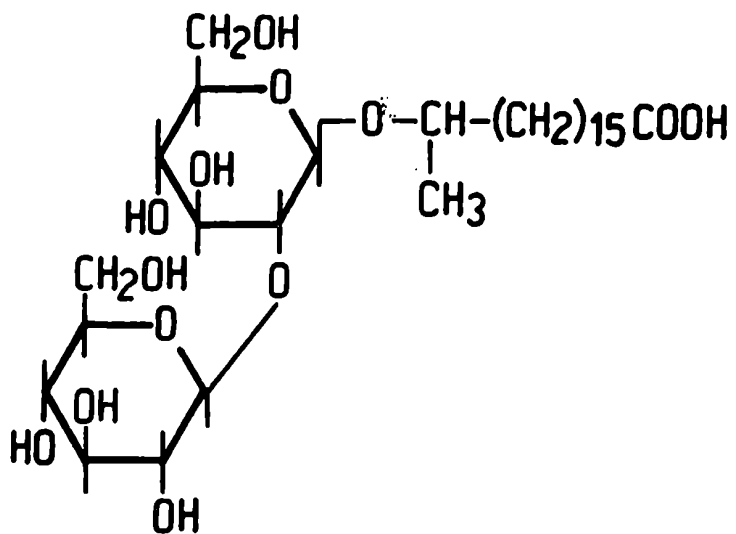


Figura 5: 2-O-(β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosil
-L-17-hidroxiocetadecanoato. Soforolípido.

el micelio crece en altas concentraciones de fosfatos, los fosfoglicéridos son los lípidos predominantes. La idea es que el glicolípido es retenido en la membrana en condiciones donde los fosfoglicéridos fueron degradados o no se sintetizan. No se observaron diferencias microscópicas entre micelios ricos y pobres en fosfolípidos, por lo tanto el glicolípido ocuparía el lugar del fosfolípido como componente estructural de la membrana. Estas interpretaciones son compatibles con el punto de vista de que los glicolípidos y los fosfolípidos tienen funciones complementarias y de soporte en la bicapa lipídica de las membranas biológicas.

I. 1.4. AZUCARES ESTERIFICADOS A ACIDOS GRASOS (52)

Entre los azúcares esterificados más comunes podemos citar la triacilglucosa de Mycoplasma y la diacil trehalosa, también llamado factor de coordinación de Mycobacterias (Fig. 6)

Este factor puede extraerse de los organismos con solventes no polares y se piensa que es el responsable, de alguna manera, de la morfología de los cultivos que se ven en cepas virulentas del microorganismo. Es una sustancia extremadamente tóxica.

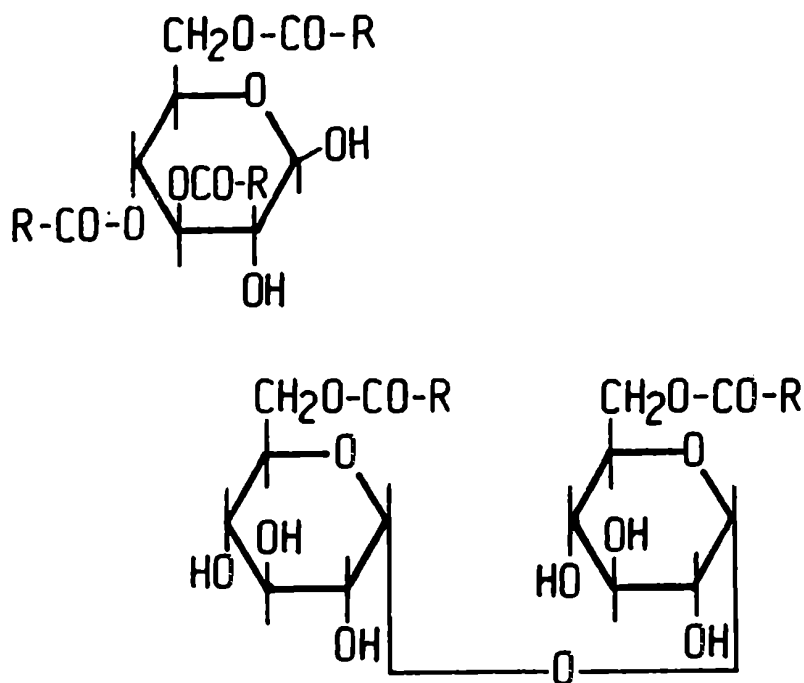


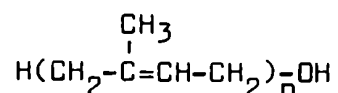
Figura 6: A) 3,4,6-triacil- β -D-glucopiranososa. Triacilglucosa (Mycoplasma). R-CO=oleoil.
 B) 6,6'-diaciltrehalosa (Mycobacteria). R-CO=palmitoil
 $C_{16}H_{31}O$, micolanoil $C_{87}H_{175}O_2$ ó corinomicolanoil
 $C_{32}H_{63}O_2$.

I. 1.5. POLIPRENILFOSFOAZUCARES

Los poliprenilfosfatos son compuestos de alta energía que existen en las membranas de procariones y eucariones en cantidades extremadamente pequeñas.

La naturaleza del lípido participante es la de un poliprenol cuya estructura y biosíntesis ha sido exhaustivamente estu-

diada, (55), (56) y cuya fórmula es la siguiente:



donde el número de unidades isoprénicas n y el grado de saturación de la unidad α es distinto entre pro y eucariotes. En bacterias, los poliprenoles tienen 10 á 12 unidades isoprénicas, todas insaturadas (56), mientras que en eucariotes n es igual a 17-21 unidades isoprénicas para animales y de 14 á 24 para hongos y plantas, saturadas en la posición α . (57), (58). Los poliprenilfosfatos pueden contener simplemente fosfato o pirofosfato. Unido al fosfato se puede encontrar un monosacárido y unido al pirofosfato, un monosacárido o un oligosacárido. Las propiedades de estos compuestos difieren de otros glicolípidos conocidos en no ser saponificables y ser lábiles a la hidrólisis ácida suave (HCl 0,01 N, 100°C, 10 min.). Son compuestos hidrofóbicos y su síntesis es catalizada por enzimas asociadas a la membrana celular.

En bacterias la función de estos glicolípidos es actuar como intermediarios hidrofóbicos en el proceso de transferencia de azúcares de los dadores nucleotídicos hidrosolubles al lipopolisacárido de la pared bacteriana. (59), (60), (61), (62), (63), (64). En Eucariotes, su función está ligada a la glicosilación de proteínas (65), (66).

En 1970, Behrens y Leloir incubando una preparación enzimática de microsomas de hígado con ^{14}C -uridinadifosfatoglucosa en presencia de Mg^{++} (67), observaron la formación de un compuesto marcado en ^{14}C -glucosa soluble en solventes orgánicos. Si a la mezcla se le agregaba una sustancia extraída de hígado, también soluble en solventes orgánicos, aumentaba la formación del producto radioactivo soluble en la fase orgánica. Esta sustancia era aniónica, contenía fosfato y su espectro al infrarojo la asemejaba a los poliprenoles (67). Entonces, se fosforiló químicamente dolicol aislado de hígado de cerdo, (68) y se comparó con la sustancia activa.

Tanto el dolicol monofosfato sintético como la sustancia del hígado resultaron resistentes a la hidrólisis alcalina y ácida y tenían la misma movilidad en cromatografía en capa delgada, de ahí se concluyó que era la misma sustancia.

La reacción, catalizada por la preparación microsomal resultó ser la siguiente:

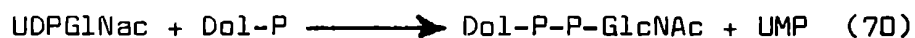


Esta reacción ha sido descripta en una variedad de tejidos de mamíferos, aves e insectos, así como también en hongos, protozoarios y plantas, (66).

Por otro lado, la reacción:



es catalizada por otra enzima que se describió por primera vez en hígado y cerebro de rata, (69), pero que existe en otros tejidos de aves, mamíferos, protozoos, levaduras e insectos, (66). Si por el contrario, los microsomas de hígado de rata, se incuban con uridina difosfato N-acetilglucosamina, se forma el derivado pirofosforilado conteniendo azúcar, según la siguiente reacción:



que se ha descrito similarmente en una gran variedad de sistemas, (66). Leloir y colaboradores, han descrito además la formación de dolicol pirofosfatos oligosacáridos marcados en mano-sa, utilizando también preparaciones microsomales de hígado, incubadas con ^{14}C -GDPMan o con ^{14}C -Dol-P-Man, (71).

Como se dijo anteriormente, la función de estos compues-tos en eucariotes es la de actuar como intermediarios lipofí-licos en el proceso de biosíntesis de las cadenas de oligosa-cáridos unidas a las proteínas en los residuos N-asparagina.

El camino de biosíntesis más común es el descrito en células de mamíferos (67), (72) y de levaduras (73), (74), (75) donde a partir del Dol-P-P-GlcNAc se adicionan sucesivamente otra GlcNAc, varias manosas y finalmente tres glucosas a par-tir de distintos dadores como se ve en la fig. 7.

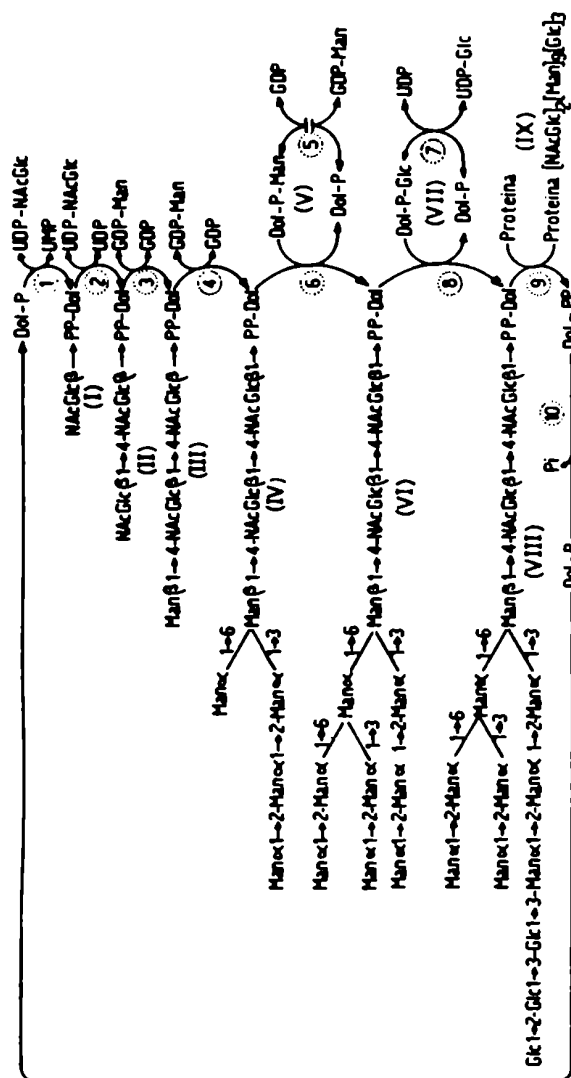


Figura 7: Ciclo del Dolicol. (Tomado de Mentaberry, A. (1961) (29)).

El compuesto finalmente sintetizado es transferido intacto a un residuo asparagina del polipéptido aceptor, (76) en una reacción que requiere Mn^{++} . Posteriormente y a nivel de la proteína, el oligosacárido sufre un proceso de degradación parcial (procesamiento) y adición de nuevos azúcares. (77).

I. 1.6. GLICOESFINGOLIPIDOS

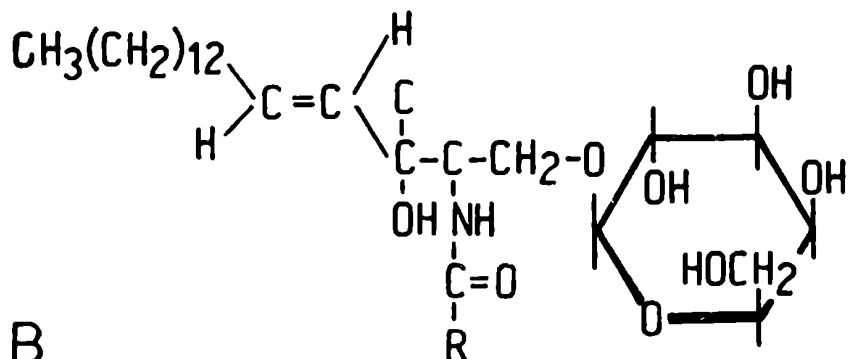
Estos compuestos pueden dividirse en tres grupos principales: (Fig. 8)

a) Glicoesfingolípidos neutros, b) Sulfátidos, y c) Glicoesfingolípidos con ácido siálico o Gangliósidos.

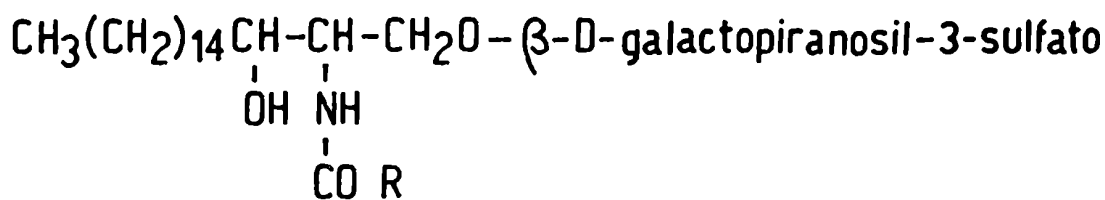
Los glicoesfingolípidos están presentes, en la mayoría, si no en todos, los tejidos de mamíferos. Su estructura básica es la siguiente: (Fig. 8)

La existencia de varias anomalías provocadas por las deficiencias en el metabolismo de estos compuestos ha motivado un sostenido interés por las investigaciones sobre la naturaleza química de los mismos y de los mecanismos involucrados en su biosíntesis y metabolismo. El descubrimiento de las propiedades antigénicas de estos lípidos ha estimulado asimismo el estudio de sus propiedades físicas y químicas. Además, en los últimos años, los glicoesfingolípidos han sido muy estudiados en células transformadas por virus tumorogénicos y el interés mayor

A



B



C

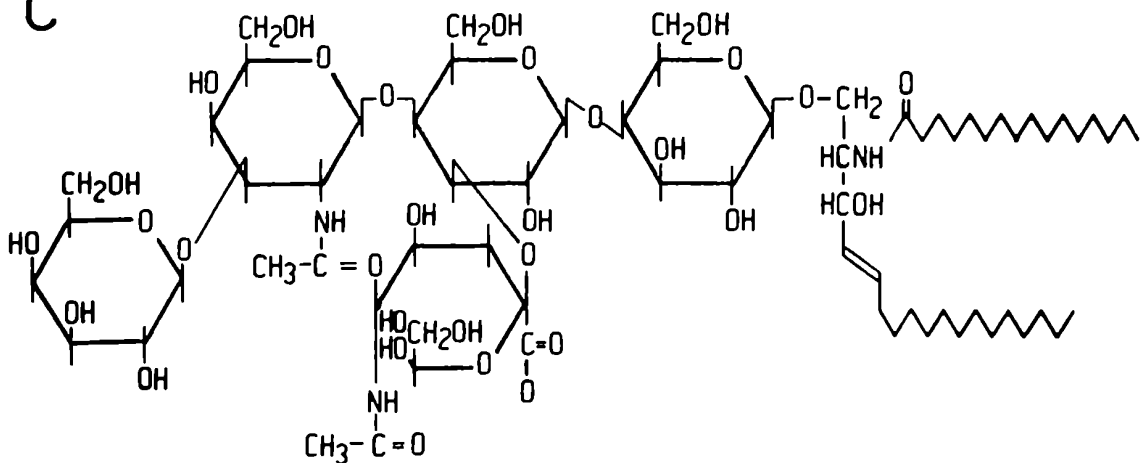


Figura 8: Glicoesfingolípidos. A) N-acil-esfingosina-1-β-D-galactopiranosido. R-CO=lignoceril, 2-hidroxilignoceril, nervonil, 2-hidroxinervonil. Galactosilceramida 6 cerebrosido.
 B) N-acil-esfingosina-1-β-D-galactopiranosil-3-sulfato. Sulfátido.
 C) II- N-acetilneuraminosil-gangliotetraglicosilceramida. Monosialogangliósido. G_{M1}.

se centró en las alteraciones que sufren los gangliósidos en estas células como resultado del proceso de transformación.

Thudichum en 1874 (78) fue el primero en aislar un glicoesfingolípido de cerebro humano que contenía un ácido graso, un azúcar y una base orgánica que no se conocía anteriormente, resultando ser el cerebrósido o galactosilceramida. Muchos años después, Klenk, (1935), (79) encontró en cerebros de chicos que sufrían la enfermedad de Tay-Sachs o de Niemann-Pick un glicoesfingolípido que contenía un azúcar desconocido: el ácido siálico. Anteriormente esos lípidos habían sido detectados por Landsteiner y Levene, (1925) (80) y Walz (1927) (81), (82) por su reacción con el p-dimetilamino benzaldehído y orcinol para formar un complejo coloreado. Blix, (1938), (83) informó sobre la aparición de estos lípidos en cerebros normales y Klenk (1942) (84) los llamó gangliósidos porque sospechaba que estaban localizados en células ganglionares. Mucho más tarde, en 1951, Yamakawa y Suzuki (85) descubrieron que los gangliósidos aparecen en tejidos extraneurales. La estructura de estos compuestos fué dilucidada en la década del 60 por Svennerholm y otros (86), (87), (88). Los globósidos son también glicoesfingolípidos y constituyen un componente lipídico importante en las membranas de los eritrocitos humanos.

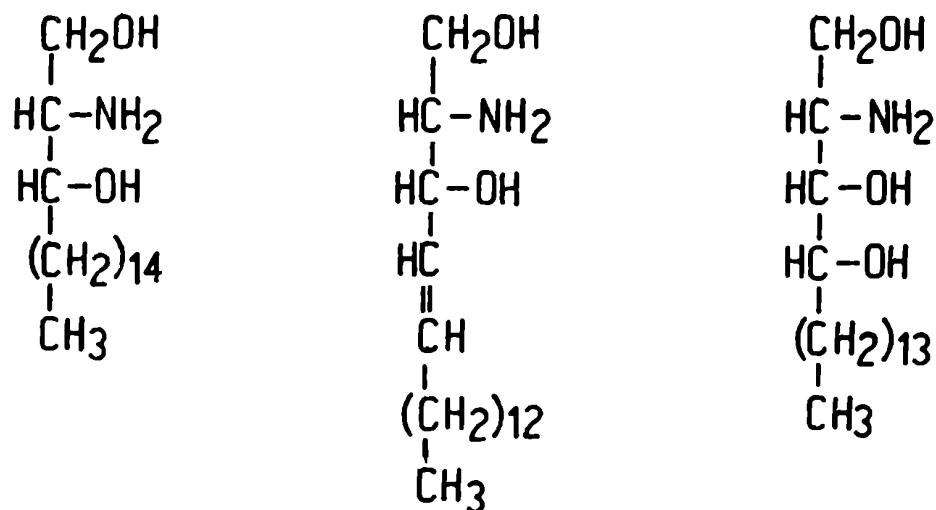
Su aislamiento y propiedades fueron descriptos por Klenk

y Lauenstein (1962) (89) y por Yamakawa y Suzuki (1952) (90). En 1964, Rapport y col. (91) aislaron la citolipina K de riñón humano. Esta sustancia junto con la citolipina H tiene propiedades hapténicas únicas.

Las estructuras químicas de la esfingosina (4-esfinguenina) y fitoesfingosina (4-D-hidroxisfinganina) que son las principales bases orgánicas en la mayoría de los glicoesfingolípidos, fueron establecidas por medio de estudios degradativos (92), (Fig.9).

En los glicoesfingolípidos de mamíferos, la 4-esfinguenina es generalmente la base aminada de cadena larga que aparece en mayor cantidad, aunque los ganglios del cerebro contienen cantidades casi iguales de 4-esfinguenina y de un isómero de cadena larga, 4-eicosasfinganina. En las plantas, la 4-hidroxisfinganina es generalmente la base de cadena larga que aparece en mayor cantidad. (93). Karlsson, (1964), (94) fue el primero en encontrar una familia de fitoesfingosinas en cerebrósidos de riñón. Una revisión sobre estas bases fue hecha por Karlsson en 1971, (99).

La composición de ácidos grasos de los glicoesfingolípidos varía según el tejido, habiendo sido estudiado en: cerebro (95), (96), bazo, (97) y glóbulos rojos (98).



Esfinganina (Dihidroesfingosina)	4-Esfinguenina (Esfingosina)	4-D-Hidroesfinganina (Fitoesfingosina)
-------------------------------------	---------------------------------	---

Figura 9: Bases aminadas de cadena larga.

Se sabe además que los glicoesfingolípidos neutros y sulfátidos de tejidos no nerviosos tienen altas concentraciones de lignocérico (24:0) y nervónico (24:1) seguidos por behénico (22:0) y palmítico (16:0).

Hay concentraciones variadas de α -hidroxi ácidos grasos en los lípidos de estas fuentes. En cerebrósidos y sulfátidos cerebrales los ácidos grasos mayoritarios son del tipo 24:0 y 24:1 y sus α -hidroxiderivados.

Nomenclatura La IUPAC-IUB Commission of Biochem. Nomenclature propuso reglas para la nomenclatura de estos lípidos, algunas de las cuales conciernen a las bases de cadena larga. Este término se refiere a la esfinganina, sus homologos y estereoisómeros y a los derivados hidroxilados y no saturados de estos compuestos. Los términos genéricos usados son: esfingolípidos, para cualquier lípido conteniendo una base de cadena larga, glicosfingolípidos para aquellos lípidos que contienen una base de cadena larga y uno o más azúcares, ceramidas para N-acilbases de cadena larga, cerebrósidos para glicoceramidas y gangliósidos para un glicosfingolípido con ácido neuramínico. (Fig. 8)

El compuesto conocido como dihidroesfingosina, 1,3 hidroxil-2 amino-octadecano se llama esfinganina. La esfingosina o 1,3 hidroxiaminooctadeceno se conoce como 4-esfinguenina.

Los homólogos más comunes son las bases de C₂₀ que se llaman eicosaesfinganina y 4-eicosaesfinguenina.

Las bases de cadena larga que están sustituidas en C-4 con un grupo OH son del grupo de las fitoesfingosinas y se conocen como derivados de las esfinganinas. La fitoesfingosina misma se llama 4-D-hidroxiesfinganina. (Fig. 9)

La ceramida es la porción hidrofóbica de un glicosfingolípido. Consiste en una mezcla de especies moleculares donde la esfingosina o bases similares están unidas por unión amida a varios ácidos grasos.

En los glicosfingolípidos, la ceramida está unida a mono u oligosacáridos por unión glicosídica con el grupo hidroxilo primario de la base aminada del glicosfingolípidio.

Cuando el carbohidrato contiene una o más moléculas de ácido siálico, se los llama gangliósidos. El término ácido siálico se usa para clasificar el ácido N-acilneuramínico (5-amino-3,5- dideoxi D-glicero-D-galacto-2 nonulo piranosónico). El compuesto aparece generalmente como un derivado N-acetil o N-glicolil. Los ácidos siálicos ocupan su posición en el extremo no reductor del oligosacárido ceramida en los gangliósidos. (Fig. 8 c), donde se unen por una unión cetosa a los grupos hidroxilo de la galactosa o a un segundo ácido siálico. Alternativamente también se encuentran como un azúcar ramificado sobre un residuo interno de galactosa (101) (102).

En la Tabla 3 pueden verse las estructuras y nomenclatura de los glicosfingolípidos neutros, gangliósidos y sulfatidos más importantes descritos hasta el momento.

Distribución en mamíferos

Distribución general: La galactosilceramida y galactosilceramida 1-3 sulfato son los glicosfingolípidos más abundantes del tejido nervioso. Aparecen en el cerebro junto con los fos-

TABLE 3

Structure y nomenclature de glicosfingolipidos neutros, gangliosidos y sulfatidos

Structure	Nomenclature propuesta	Abreviatura propuesta	Nombre Común	Referencias de los Descubridores
1.- Gal (1) → 1' Cer	Galactosilceramida	GalCer	Cerebrósido	(78)-(105)-(120)
2.- Gal (1) → 4 Gal (1) → 1' Cer	Galebiosilceramida	GaOse ₂ Cer	Galebio-	(104)-(109)-(110)
3.- GalMac (1) → 3GalMac (1) → 3 Gal (1) → 4Gal (1) → 1' Cer	II ³ -β-N-Acetilgalactosaminil-α(1) → 3-N-acetilgalactosaminil-galactosilceramida	II ³ -β-(GalMac) → 3GalMac)GaOse ₂ Cer	Forseman (tetraglicosilceramida)	(130)
4.- Glc (1) → 1' Cer	Glucosilceramida	GlcCer	Glucosil-	(106)-(111)-(115)
5.- Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Lactosilceramida	LacCer	Ceramide	(107)-(108)-(115)
6.- Gal (1) → 4Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Globotriglicosilceramida	GbOse ₃ Cer	(citoli-pine H) ceramide	(109)-(111)-(115)
7.- GalMac (1) → 3Gal (1) → 4Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Globotetraglicosilceramida	GbOse ₄ Cer	Trihexosil-	(108)-(109)-(111)-(114)
8.- GalMac (1) → 3Gal (1) → 3Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Globosactetraglicosilceramida	GbOse ₄ Cer	de Fabry ceramide	(85)-(91)-(111)-(114)
9.- GalMac (1) → 3GalMac (1) → 3Gal (1) → 4Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Globopentaglicosilceramida	GbOse ₅ Cer	Globosido-	(85)-(91)-(111)-(114)
10.- GalMac (1) → 4Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Gangliotriglicosilceramida	GgOse ₃ Cer	citoli-pine H	(116)
11.- Gal (1) → 3GalMac (1) → 4Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Gangliotetraglicosilceramida	GgOse ₄ Cer	ne R	(116)
12.- Gal3SO ₃ (1) → 1' Cer	Galactosilceramida-1'-sulfato	I ³ -SO ₃ -GalCer	Forseman-	(118)
13.- Gal3SO ₃ (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	Lactosilceramida-II ³ -sulfato	II ³ SO ₃ -LacCer	pentaglicosilceramida	(118)
14.- NeuAc (2) → 3Gal (1) → 1' Cer	I ³ -α-N-Acetilneuraminosil-galactosilceramida	I ³ -α(NeuAc)-GalCer	ceramide	(124)
15.- NeuAc-Gal-Gal-Cer				(125)
16.- NeuAc (2) → 3Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-lactosilceramida	II ³ -α(NeuAc)-LacCer	Asialo- ₄ H ₁	(126)-(127)
17.- NeuAc (2) → 2NeuAc (2) → 3Gal (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-α(2) → β-N-Acetilneuraminosil-lactosilceramida	II ³ -α(NeuAc) ₂ -LacCer	Sulfatido	(128)
18.- GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-gangliotriglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc)-GgOse ₃ Cer	Dihexoside	(86)-(101)
19.- GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (2) → 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-α(2) → β-N-Acetilneuraminosil-gangliotriglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc) ₂ -GgOse ₃ Cer	remido-sulfato	(129)
20.- Gal (1) → 3GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-gangliotetraglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc)-GgOse ₄ Cer	₄ H ₁	(101)
21.- NeuAc (2) → 3Gal (1) → 3GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -IV ³ , α-O ₁ -N-Acetilneuraminosil-gangliotetraglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc)IV ³ -α(NeuAc)-GgOse ₄ Cer	₅ H ₁	(86)-(101)
22.- Gal (1) → 3GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (2) → 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil-gangliotetraglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc) ₂ -GgOse ₄ Cer	₅ H ₂	(130)
23.- NeuAc (2) → 3Gal (1) → 3GalMac (1) → 4Gal (3) ← 2 α(NeuAc) (2) → 2 α(NeuAc) (1) → 4Glc (1) → 1' Cer	II ³ -α-N-Acetilneuraminosil α(2) → β-N-Acetilneuraminosil IV ³ -α-N-Acetilneuraminosil-gangliotetraglicosilceramida	II ³ -α(NeuAc) ₂ IV ³ -α(NeuAc)-GgOse ₄ Cer	G ₁₁	(86)-(100)-(101)-(130)

folípidos, el colesterol, los gangliósidos y pequeñas cantidades de numerosos glicoesfingolípidos como glucosilceramidas, lactosilceramidas, I⁶-acilgalactosilceramidas, oligoglicosilceramidas de mayor complejidad y galactosildiglicérido. La galactosilceramida y su éster sulfato aparecen en mayor concentración en la materia blanca y la mielina donde constituyen más del 20% del peso seco del tejido. En proporción a otros componentes, el cerebrósido constituye más o menos el 5% de los lípidos totales en la materia gris, el 20% en la materia blanca y el 23% en la mielina.

El éster sulfato, por otra parte, constituye más o menos el 1% del peso fresco del cerebro humano (2,5-4% del peso seco) y representa 5,4%, 3,8% y 1,7% respectivamente del total de los lípidos en la materia blanca, mielina y materia gris (102) (103). Por otro lado la concentración de galactosilceramida y su éster sulfato en riñón, es de 0,04% de peso seco y la de lactosilceramida-1³-sulfato es 0,014-0,018% de peso seco (104). La concentración de estas dos sustancias es mayor en la mielina del sistema nervioso central que en la mielina de los nervios espinales, mientras que la concentración de esfingomieli-
na es a la inversa.

La presencia de glicoesfingolípidos en plasma fue demostrada por Svennerholm y Svennerholm (1963) (111) y posterior-

mente Vance y Sweeley (1967) (115) los caracterizaron tanto del plasma como de los eritrocitos, como glucosilceramidas, lactosilceramida, trihexosilceramida y globósido, cuyas estructuras figuran en la tabla 3. Es importante destacar que estos glicoesfingolípidos también están asociados a lipoproteínas circulantes del plasma (133). En linfocitos humanos purificados también se aislaron estos cuatro compuestos (134).

Gangliósidos:

La mayoría de los gangliósidos totales está en la materia gris que contiene 2,5 umoles de ácido neuramínico/g de peso húmedo (2% del peso seco ó 5% de lípidos totales). La médula adrenal es otro tejido rico en gangliósidos. Estos compuestos se localizan en las membranas celulares del tejido nervioso, especialmente en membranas externas de los sinaptosomas y en microsomas. La estructura de los principales gangliósidos puede verse en la tabla 3 y entre los tejidos extraneurales donde se los encuentra se pueden nombrar: riñón, cristalino, plasma, eritrocitos humanos, equinos, caninos, felinos, plaquetas, placenta, bazo y retina.

I. 1.7. OTROS GLICOLIPIDOS

DERIVADOS FOSFATIDOS DE AZUCARES

Fosfatidilglucosaminil glicerol en Bacillus megaterium y Pseudomonas ovalis (53) (Fig. 10A) y fosfatidil inositol poli-manósidos en Mycobacteria. (Fig. 10B). Son D-manósidos del fosfatidilmioinositol. Este último es común en plantas y tejidos animales. (54).

FITOGLICOLIPIDOS

Estos compuestos fueron estudiados en tejidos vegetales y se distinguen entre los glicolípidos de plantas por su base amideada de cadena larga. Carter (1969) (135) lo identificó como un N-acil fitoesfingosil fosforilinositol unido glicosídicamente a un complejo oligosacárido. (Fig. 11A)

Está ampliamente distribuido en granos de cereales y semillas de oleaginosas. No se conoce su función y significado biológico.

Las primeras evidencias de la existencia en hongos de estos compuestos, se obtuvieron con el hallazgo de grandes cantidades de ceramidas libres en los extractos lipídicos y se pensó entonces que eran productos de degradación de compuestos más complejos. Wagner y Zofczik (1966) (136) aislaron un esfingolípido con fosforo, mio-inositol y D-manosa de Saccharomyces cerevisiae y de Candida utilis y sugirieron la estructura

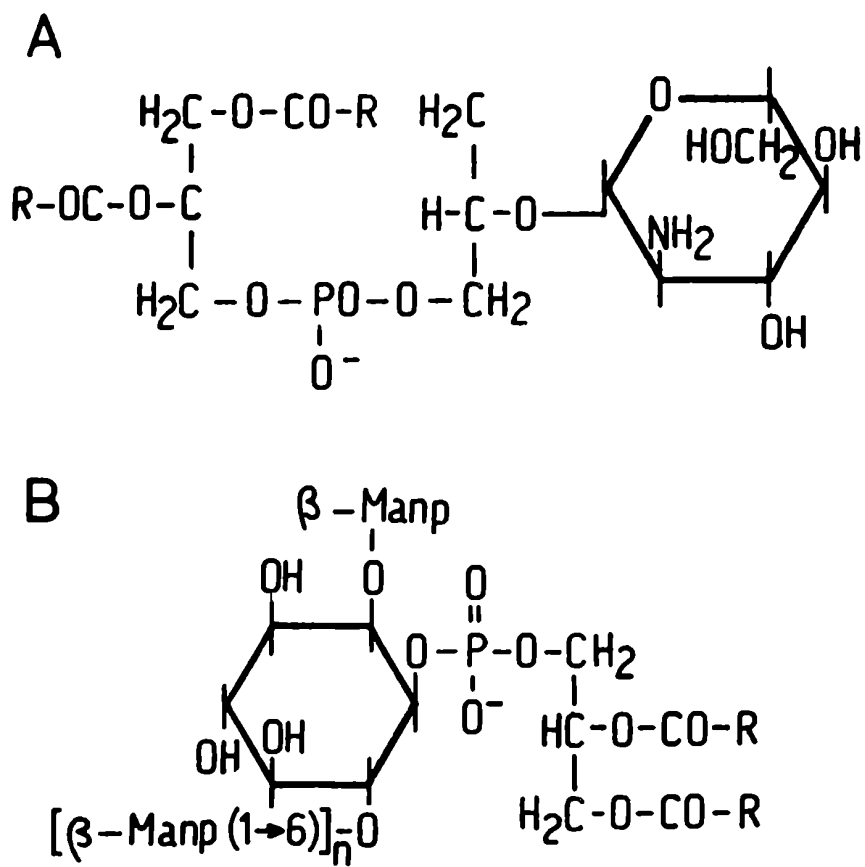


Figura 10: A) 3-sn-fosfatidil-1'-(2'-D-glucosaminil)-sn-glicerol. Fosfatidil glucosaminil glicerol.
 B) 3-sn-fosfatidil-sn-1'-mio-inositol-2'-β-D-manopiranosido-6'-β-(1→6)poli-D-manopiranosido. Fosfatidil inositol polimanósidos.

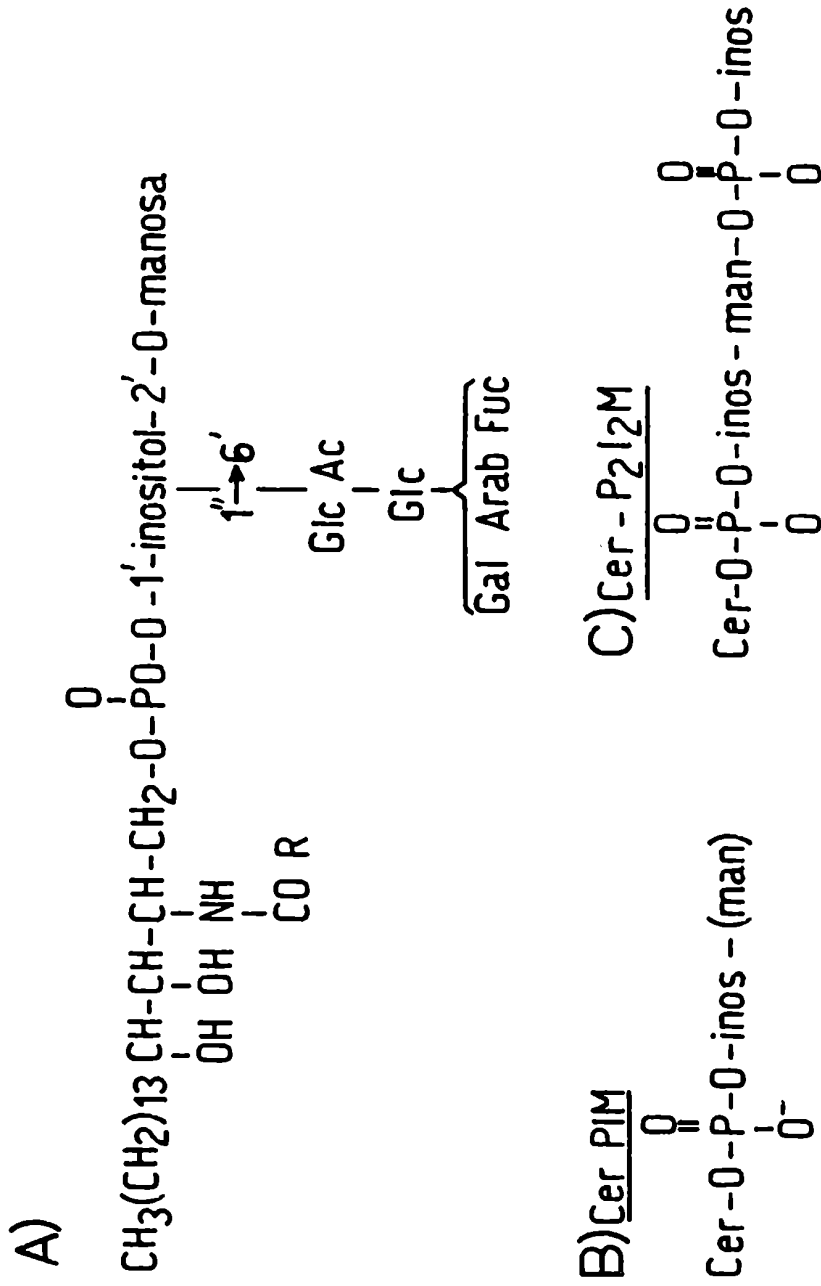


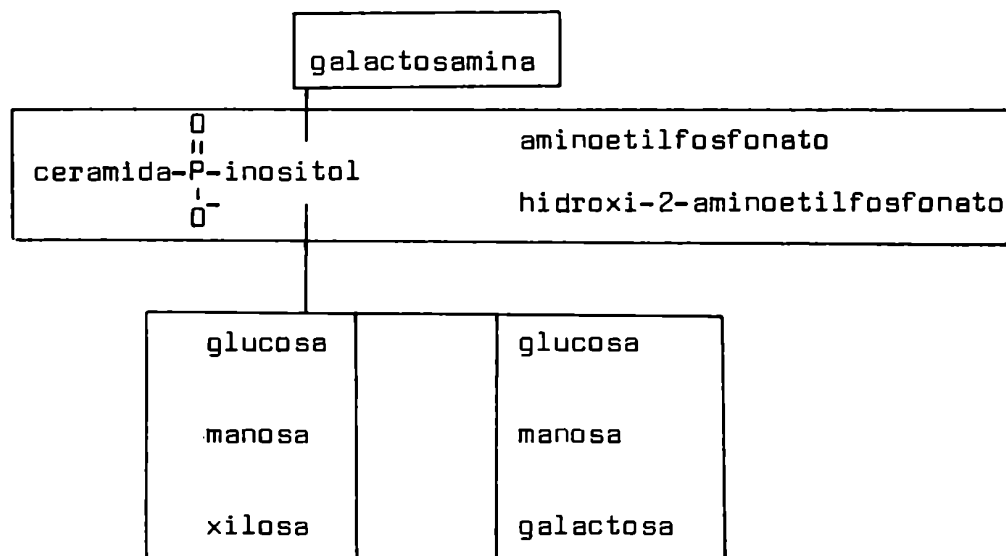
Figura 11: Fitoglicolípidos. A) N-acil-fitoesfingosilfosforil inositol. B) manosil-mono-inositol-monofosforilceramida (CerPIM). C) D-manosil-inositol-difosforilceramida (CerP₂I₂M).

manosil-mono-inositol-monofosforilceramida. (Fig. 11B).

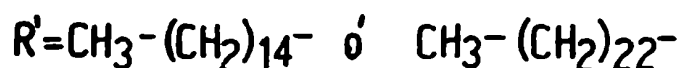
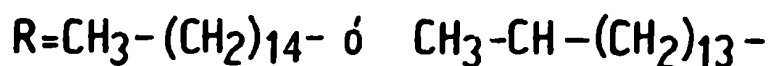
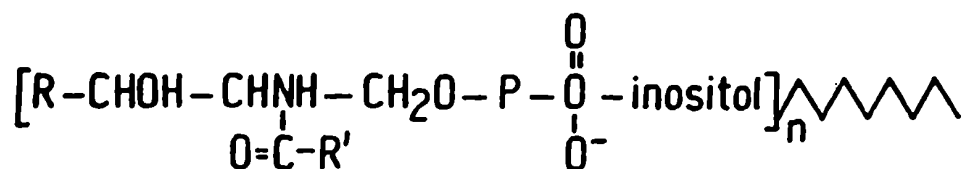
Al principio se pensó que era un producto de degradación alcalina suave de otro lípido más complejo el CerP₂I₂M (D-manosil-diinositol-difosforilceramida) (Fig. 11C) que había sido aislado por Steiner y col. en 1969 (137), pero en 1974, Smith y Lester (138), aislaron y caracterizaron cantidades significativas de Cer-PIM (manosil-mono-inositol-monofosforilceramida). No obstante ello el compuesto constituye una fracción muy pequeña de los lípidos totales (2%). Ulteriormente, Brennan y su equipo (5) lo aislaron de Agaricus bisporus y en este hongo representa el 50-60% de la mezcla total de esfingolípidos. Otros autores encontraron estos lípidos en S.cerevisiae (139) (140). Un precursor en la biosíntesis de CerPIM y CerP₂I₂M sería la inositol-fosforilceramida, Cer PI. Smith y Lester (1974) (138) aislaron y caracterizaron tres miembros de este tipo de esfingolípidos en S.cerevisiae. Por otro lado, Lester y col. en 1974, (141), los encontraron en Neurospora crassa y Hackett y Brennan (1977) (142) los identificaron en Aspergillus niger. Byrne y Brennan (1976) (143) estudiaron estos compuestos para ver si al igual que en las plantas superiores presentaban segmentos de oligosacáridos, encontrando por lo menos 4 glicofosfoesfingolípidos diferentes en A.bisporus y 8 distintos en A.niger. Algunos de estos fueron caracterizados.

En protozoos pueden encontrarse estos compuestos como componentes de la membrana plasmática de Acanthamoeba castellanii (144) y también en células totales de formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi (145). En ambos casos fueron aislados y caracterizada parte de su estructura.

La estructura propuesta para el lipofosfoglicano de A. castellanii es la siguiente:



La identificación de los componentes lipídicos del lipopeptido-fosfoglicano de T. cruzi da la siguiente estructura:



R= dihidroxiesfingosina-C₁₉

R'= ácido palmítico ó
lignocérico.

Los azúcares eran manosa, glucosa y galactosa y en cantidades menores, glucosamina.

LIPOPOLISACARIDOS

Estos compuestos son lipo-polisacáridos complejos de alto peso molecular que aparecen en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas. Están constituidos por un polisacárido ligado a un glicolípido (lípidos A) por un residuo 3-deoxioctuloseanato. El lípidos A parece ser una poli N-acil-glucosamina esterificada con etanolamina fosfato y con ácidos grasos. (Fig.12).

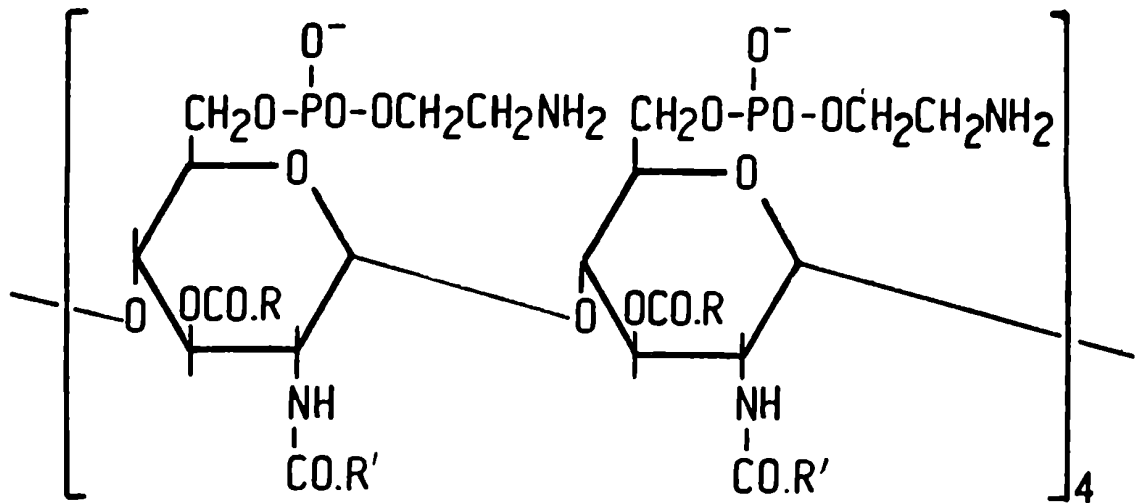


Figura 12: Estructura tentativa del lípido A de Escherichia coli (146) donde R-CO y R'-CO son cadenas de ácido acético, láurico, hidroxiláurico, mirístico y palmítico.

Otros lipopolisacáridos conocidos son los de *Salmonella* que fueron agrupados en 16 tipos basados en los monosacáridos que los constituyen. Hay un core, común a todos los tipos que contiene heptosa, etanolamina, fosfato, 3-deoxi-D-ácido manooctulosónico, D-Gal-D-glu y 2-amino 2-deoxiglucosa. El core está unido, por un lado, a través del ácido octulosónico al componente lipídico, lípido A y por el otro, por intermedio de una hexosa, a un polisacárido que contiene las secuencias de azúcar específicas responsables de la especificidad antigénica.

MICOSIDOS:

Son peptidoglicolípidos complejos preparados de las ceras de *Mycobacteria*.

El micósido C de *Mycobacterium avium* contiene 6-deoxi-L-talosa y 3-O metil-6-deoxi-L-talosa. Uno de los azúcares está ligado en éster a un residuo C-terminal de amina de un penta o heptapéptido hecho de D-aminoácidos. El otro residuo azúcar está unido glicosídicamente a la única D-alotreonina presente en estos péptidos. Los ácidos micólicos están unidos por unión amida a los grupos terminales amino de D-fenilalanina. Algunos azúcares están acetilados al C-2 y C-4. La fracción cera se caracteriza por su insolubilidad en acetona. La cera D de *Mycobacterium tuberculosis* contiene un complejo peptido-glicolípido, todavía incompletamente caracterizado, de alto peso molecular que contiene ácido micólico esterificado en algunos residuos azúcar. Esta sustancia es responsable de la acción adyuvante y de la gran hipersensibilidad causada por los lípidos del bacilo tuberculínico.

II. GLICOESFINGOLIPIDOS

II. 1. Función de los glicoesfingolípidos.

En la superficie de las células animales aparece una gran variedad de glicoesfingolípidos, donde la porción de carbohi-

dratos puede ser diferente y cada uno de ellos puede tener una función determinada, ya sea como lipido anular, receptor o marcador en la superficie o integrante de la matriz de la membrana. En cuanto a su distribución intracelular están en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, sitios donde ocurre la biosíntesis de las membranas periféricas. De allí son llevados a la superficie en vesículas que se fusionan con la membrana superficial.

A pesar de que los glicoesfingolípidos constituyen solo el 5% de los lípidos totales, las actividades biológicas que presentan son muy importantes. Además, por su ubicación especial dentro de la membrana celular donde están asimétricamente distribuidos en la mitad externa de la bicapa lipídica se los considera entre el grupo de moléculas involucradas en la maquinaria de control de información de las células.

Las evidencias crecientes que existen sobre la disposición asimétrica de estos lípidos en las membranas se basan en estudios hechos en membranas de eritrocitos (147) (148). La fosfatidilcolina y la esfingomiélin que contienen colina, se ubican preferentemente en la capa más externa de la bicapa, y los lípidos que contienen grupos-NH₂, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, principalmente en la parte interna, el colesterol está en ambas capas y los esfingolípidos parecen residir,

como se ha dicho, exclusivamente en la capa externa de la membrana plasmática. A pesar de la pequeña proporción que los glicoesfingolípidos ocupan en la membrana plasmática, considerando que todos están en la mitad externa de ésta, se puede calcular que de cada dos o tres moléculas de lípidos una es un esfingolípido. Esto es válido para células de mamíferos y puede ser un fenómeno general en células animales. En la mayoría de los microorganismos, sin embargo, el colesterol y los esfingolípidos no han sido detectados aunque son componentes obligados de hongos y protozoos.

Karlsson (149) postula que la mitad externa de la bicapa de las células animales consiste de proteínas y tres componentes lipídicos, colesterol, fosfatidilcolina y esfingolípidos.

De acuerdo a sus funciones en la membrana, los glicoesfingolípidos se pueden dividir en tres tipos (150):

Tipo I: Lípidos anulares de la superficie celular.

Tipo II: Los glicoesfingolípidos como receptores y marcadores de superficie.

Tipo III: Los glicoesfingolípidos como integrantes de la matriz de la membrana.

Tipo I: Lípidos anulares de la superficie celular.

Son aquellos lípidos que rodean una proteína funcional de membrana (151). Los estudios que se han hecho sobre este punto

fueron en su mayoría con sulfátidos.

En una serie de investigaciones se ha demostrado que la concentración de sulfátidos ($I^3-SO_3-GalCer$) en numerosos tejidos está correlacionada con la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , (152). Esta enzima está involucrada específicamente en la translocación del Na^+ en la superficie de las membranas de las células animales (153). Esta relación se da tanto en los tejidos con un considerable transporte de Na^+ como en las glándulas de la sal de ciertos peces, órganos eléctricos, riñón y células nerviosas, como en eritrocitos con sólo unos pocos cientos de moléculas de enzima por célula. (Figura 13).

Existen, sin embargo, divergencias en la correlación señalada. En la materia blanca, por ejemplo, el sulfátido está en concentración muy alta. Esto se explica obviamente por la presencia de mielina, un sistema de membranas múltiples especializado para aislar los axones nerviosos. La mielina deriva de las células de la glia y ha perdido su actividad enzimática, pero retiene sus lípidos.

No hay sin embargo, evidencias suficientes que prueben que los sulfátidos con sus grupos aniónicos son parte esencial de la unidad de translocación, aun cuando existe una hipótesis donde el sulfátido es postulado como un componente esencial para la translocación del K^+ (modelo del "sitio del cofactor").

Actividad ATPasa dependiente de
Na⁺ y K⁺

mmoles Pi/g peso seco

Concentración de Sulfátidos

umoles/g de peso seco

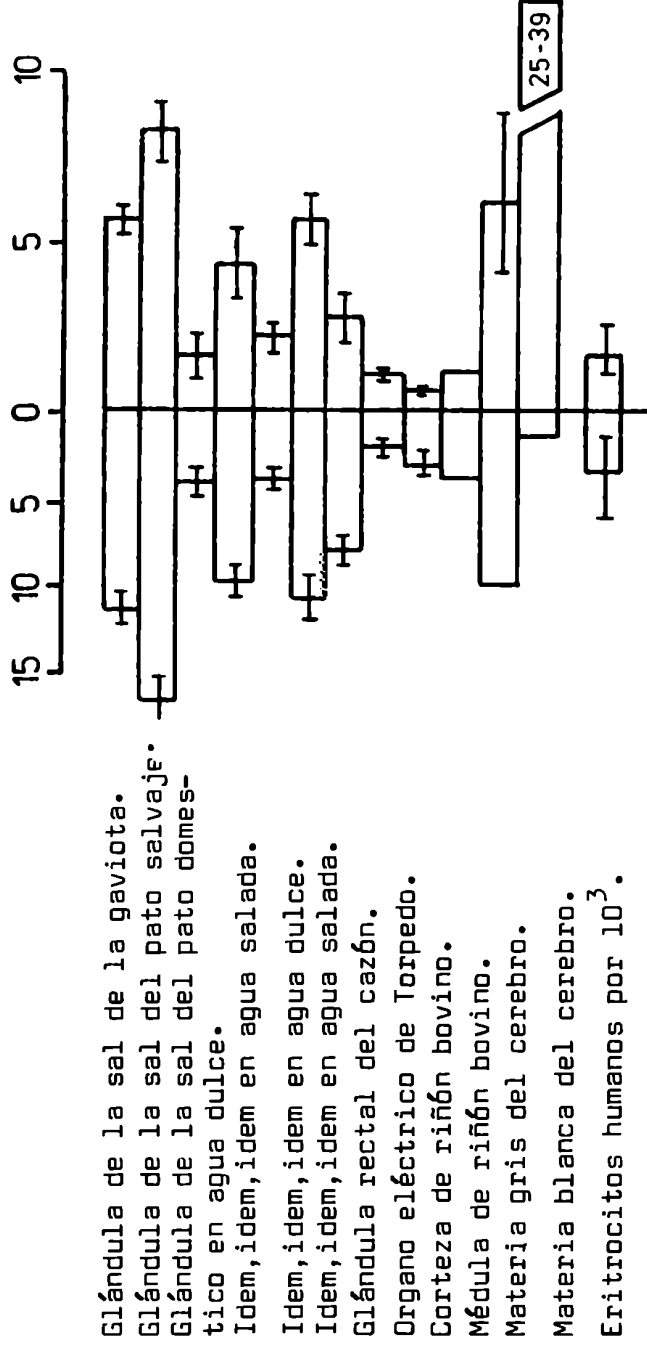


Figura 13: Diagrama que muestra la relación entre la concentración de sulfátidos y la actividad de ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺ en varios tejidos animales (154).

La ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ es una lipoproteína unida a la membrana que ha sido aislada y altamente purificada en varios tejidos.(154). El ensayo de actividad consiste en la hidrólisis de ATP siendo la reacción dependiente de lípidos. El lípido requerido necesita presentar el estado "líquido-cristalino" para interactuar con la proteína, pero no se ha probado que se necesite una cabeza polar determinada. Aunque la hidrólisis de ATP se considera un paso esencial en la translocación del Na^+ y del K^+ , los estudios hechos sobre los requerimientos lipídicos para la hidrólisis no son concluyentes en cuanto a un requerimiento lipídico determinado para la translocación. Usando liposomas y enzimas purificadas de bacterias, se intentó reconstruir la bomba iónica y se vió que hay un transporte neto de Na^+ desde el exterior hacia el interior, cuando se agregada ATP a la suspensión. La ouabaina produce una inhibición completa del transporte, pero sólo desde el interior. Esto indica la existencia de una proteína específicamente orientada. En estos experimentos, los liposomas están formados exclusivamente por lecitina y por ello surge evidente que ni la fosfatidilserina ni los sulfátidos son absolutamente necesarios para la translocación del Na^+ .

Por otro lado en otros experimentos hechos con preparaciones enzimáticas animales, Karlsson infiere que los sulfátidos

son necesarios para la translocación del K^+ funcionando como sitios para el catión con su grupo gal-3-sulfato hacia el exterior de la membrana. (Figura 14).

En aquellas preparaciones enzimáticas donde no hay sulfátidos como integrantes de la preparación, no existió transporte de K^+ y la bomba de Na^+ se hace "electrogénica" con cotransporte de Cl^- .

El proceso de translocación (Figura 15), comienza con el Na^+ , no totalmente hidratado, unido al sitio iónico (carboxílico) selectivo para Na^+ , del lado interno del canal ("gate") y el K^+ , hidratado, unido al sulfátido del lado externo, (Figura 15,A). La fosforilación de la ATPasa portadora del sitio "Na", provoca un cambio conformacional cooperativo del "gate", moviendo el sitio de unión al exterior. Concomitantemente, la fuerza del campo de dicho sitio decrece, favoreciendo la hidratación y la disociación del Na^+ . (Figura 15,B). Las constantes de estabilidad ahora explican un intercambio de K^+ entre el sulfato y el "gate".(Figura 15,C). En la defosforilación, (Figura 15,D), el "gate" vuelve al interior con K^+ y con mayor afinidad por el Na^+ . El equilibrio a ambos lados (a través de la competencia entre Na^+ y K^+) da ahora la situación original. (Figura 15,A).

En ausencia del sulfátido, (o en la proximidad del "gate" y sulfátido), la bomba es electrogénica: hay salida de Na^+ pero no

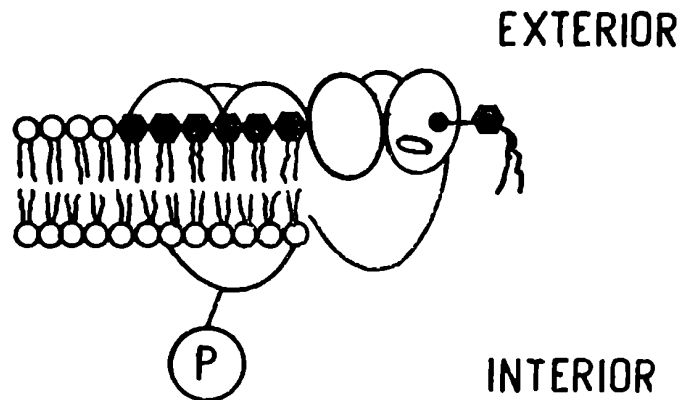


Figura 14: Modelo del "sitio del cofactor" de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ y los sulfátidos en las membranas. La enzima es un dímero compuesto de dos grandes subunidades pero sólo una de ellas reacciona con ATP (modelo del sitio-medio). Dos subunidades pequeñas de glicopéptidos para cada polipéptido grande llevan un canal ("gate") catiónico, (óvalo en la figura). Los sulfátidos (hexágonos negros) están en la mitad externa de la bicapa y en cantidad suficiente para formar un anillo alrededor de las proteínas. El grupo sulfato (círculo negro) está muy próximo del lado externo del canal ("gate") catiónico. Compárese con la figura 15.

hay entrada de K^+ desde el medio hacia el sitio selectivo del "gate". (153).

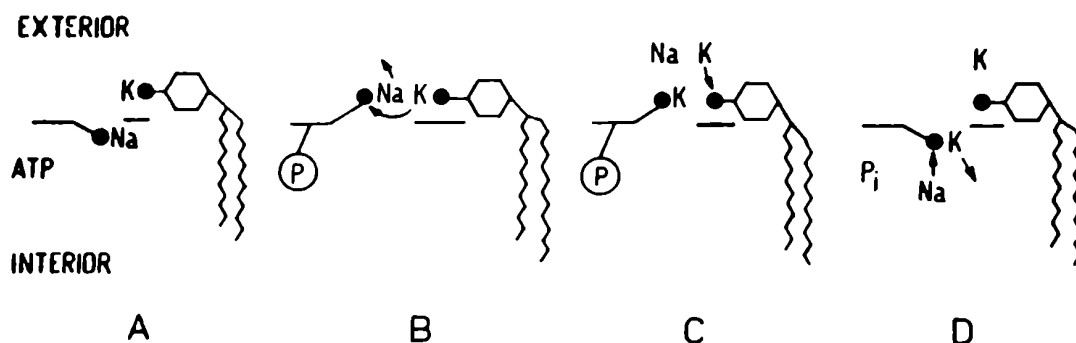


Figura 15: Pasos sucesivos en la translocación del Na^+ y el K^+ , de acuerdo al modelo del "sitio del cofactor" (Fig.14). El grupo sulfato del sulfátido (círculo negro con K^+ en A) está muy cerca del lado externo de un canal ("gate") proteico que tiene el sitio de translocación (círculo negro con Na^+ en A).

OTROS SULFOLIPIDOS

Los grupos aniónicos dominantes en toda clase de membranas son carboxilos y fosfatos, tanto de proteínas como de lípidos y carbohidratos. Aun cuando es importante destacar que el "glicocalix" que rodea muchas membranas plasmáticas, contiene proteoglicanos con grupos sulfato. Similarmente la existencia

de los sulfolípidos sugiere que las funciones que desempeñan están asociadas con sus propiedades aniónicas. Un ejemplo es el glicolípido que contiene sulfonato en plantas y equinodermos, 6-sulfo- α -quinovosildiglicérido (Fig.2) que se ha encontrado que está correlacionado con la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ de los tejidos de caña de azúcar.

La conformación cristalina de la región polar de este lípido (156) parece tener varios aspectos en común con la β -gal-3-sulfato, sugiriendo esto una asociación similar de estos dos sulfolípidos con la proteína en una unidad de translocación.

SULFOGALACTOGLICEROLIPIDOS EN TESTICULOS Y ESPERMATOZOIDES.

Poco es lo que se sabe hasta el momento sobre la posible función de los sulfogalactoglicerolípidos, en los testículos de mamíferos, pero hay algunos hechos importantes que los relacionan con el proceso de espermatogénesis.

Cuando se forman los espermatoцитos I en los testículos de rata, hay un gran incremento en la cantidad de sulfogalactoglicerolípido. (27) Este compuesto es metabólicamente estable dado que se lo encuentra posteriormente en espermatozoides.

Como en los espermatozoides también existen gangliósidos (157) (158), se puede pensar que éstos y los SGG podrían contribuir a la carga negativa en la superficie de los espermatozoides,

(159), dado que sus grupos polares están expuestos al exterior. Hasta el momento, sin embargo, no se sabe cual es la función real de los lípidos aniónicos en los espermatozoides. Particularmente con respecto a los sulfogalactoglicerolípidos, un punto importante es establecer si estos compuestos están ubicados en la cabeza o/y en la cola del espermatozoide. Si estuvieran en la cabeza habría que determinar si están en el acrosoma o en la membrana plasmática. Si están en la membrana, podría sugerir un papel en la interacción entre óvulo y espermatozoide. Si estuvieran localizados en el acrosoma estarían involucrados en la reacción acrosómica desplegada por el espermatozoide antes de la fecundación; (160) se sabe que allí se localiza la arilsulfatasa A (161).

Por otro lado si el sulfogalactoglicerolípidos estuviera ubicado en la pieza media o en la cola podría estar relacionado con procesos bioquímicos asociados con la producción de energía o motilidad, por ejemplo podría estar asociado con la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ .

Tipo II: Los glicosfingolípidos como receptores y marcadores de superficie.

La gran variedad en la composición de carbohidratos en las moléculas de glicosfingolípidos hace que éstos puedan considerarse candidatos probables a cumplir funciones de reconocimiento

en la superficie celular. Hay muchos estudios hechos sobre el papel de los glicolípidos como receptores. Los gangliósidos, por ejemplo, luego del descubrimiento de su capacidad para interactuar específicamente con toxinas bacterianas, han adquirido mucha importancia como receptores en la superficie celular.

La capacidad de los gangliósidos de unirse a la toxina del cólera fue descubierta hace algunos años por Van Heyningen y col. (1974) (162). Desde entonces, varios grupos han demostrado "in vitro" una especificidad muy alta para un gangliósido en particular, el GM_1 (Fig.8c). Existe una buena correlación entre el "binding" a la toxina y la concentración de gangliósidos en las células mucosas de varias especies y esto se puede tomar como una evidencia adicional sobre la localización exclusiva de los glicolípidos sobre la superficie celular. También fué demostrada la existencia de redistribuciones laterales de receptores de toxina (formación de "patch" y "cap"), posiblemente moduladas por proteínas de la membrana (163) (164). Estos resultados son de importancia básica cuando se considera las funciones de los antígenos de la superficie celular de naturaleza glicolipídica, porque esto demuestra que un ligando puede ejercer un efecto celular específico mediante el "binding" con un componente de membrana, en este caso un carbohidrato ligado a una ceramida, el cual probablemente no atraviesa la membrana. Una parte posible del mecanismo sería la asociación

específica entre el azúcar del glicolípido y la proteína que penetre la membrana. (165)

Actualmente se sabe que hay otras toxinas bacterianas que también interactúan específicamente con gangliósidos. Entre ellas, la toxina del tétano y la botulínica, con el G_{D1b} (166) y el G_T (167) respectivamente (tabla 3) en las terminaciones nerviosas presinápticas y la toxina alfa de estafilococos que interactúa con el sialosilparaglobósido (168) de músculo. Además los gangliósidos parecen ser también receptores de algunos virus (169), de interferón (170), hormonas (171) y glicoproteínas (171).

ANTIGENOS DE SUPERFICIE

Aunque el número de azúcares simples, comunes en los mamíferos, aproximadamente 10, es menor que el de los aminoácidos, 20, el número de combinaciones posibles entre aquellos es mayor que la de los aminoácidos. Así por ejemplo en un disacárido con dos hexosas diferentes, puede variar la conformación de la unión glicosídica o la conformación del heterociclo puede ser de cinco o seis miembros. En un dipéptido, sin embargo, existe una sola posibilidad. Una segunda diferencia de interés, cuando se comparan carbohidratos de la superficie celular y proteínas, es el volumen de información genética necesaria para su síntesis. La catálisis de la peptidación en el ribosoma no es específica para

un cierto tipo de unión. En contraste, cada unión glicosídica necesita su propia glicosiltransferasa, siempre con una especificidad muy alta.(172). Por lo tanto el carbohidrato puede ser un portador potente y específico de una información obligada de superficie en sistemas multicelulares.

El ejemplo clásico de los antígenos específicos de la superficie celular son los antígenos de carbohidratos que pertenecen a los mayores grupos sanguíneos en el hombre y otros animales (173). El punto de vista general, hasta el presente, es que la actividad ligada a membrana está en los glicoesfingolípidos mientras que la actividad soluble y que se secreta está en forma de glicoproteínas.

Hay una gran variedad de oligosacáridos unidos a ceramida, aunque la mayoría de estos glicolípidos existen sólo en muy pequeñas cantidades (173).

El glicolípidio con mayor tamaño de cadena oligosacarádica identificado en membranas de eritrocitos A_1 es una nonaglicosilceramida, aún cuando existen otros de menor movilidad cromatográfica que pueden tener hasta 20 azúcares y que no han sido todavía bien caracterizados. Este número parece ser el límite superior para cadenas de azúcares de las proteínas de los grupos sanguíneos (174). De acuerdo a los cálculos, el número total de glicolípidos para eritrocitos A_1 con más de cuatro azúca-

res podría ser por lo menos 40. El número de diferentes cadenas oligosacarídicas ligadas a lípidos sobre la superficie celular es así muy grande.

¿Por qué está la superficie celular equipada con información estructural tan variada en la forma de carbohidratos? No hay respuesta simple a esa pregunta. Los carbohidratos de superficie se consideran involucrados en los procesos de reconocimiento celular y como reguladores del comportamiento celular. Las asociaciones y modificaciones intercelulares pueden ser mediadas por interacciones proteína-carbohidrato como lo propone el modelo de Roseman (172) de glicosiltransferasas-sustrato y el modelo de la lectina-azúcar de Barondes y col. (175). Los procesos de diferenciación normales y anormales pueden describirse en término de estos dos modelos, aunque la evidencia experimental está lejos de ser concluyente. Las glicosiltransferasas y lectinas se encuentran sobre la superficie celular y parecen estar involucradas en la modificación del comportamiento celular después del contacto célula a célula. Las células tumorales parecen responder a un comportamiento más primitivo con esquemas de transferasas menos desarrollados y con la síntesis de glicolípidos bloqueada en muchos casos en etapas precoces.(176). Este bloqueo está asociado a menudo con la acumulación de precursores tales como la lactosil o glucosilceramida y la desaparición del glicolípidos con más de cinco azúcares (mela-

noma del intestino delgado, tipo 21) pero aparece una triglicolceramida que no está en tejidos normales. Esta podría ser un intermediario en la elongación de la cadena de azúcares a glicolípidos más complejos. Su ausencia aparente en el tejido puede deberse a un tiempo de vida corto, haciendo que sea difícil de detectar excepto en células que crecen rápidamente. Alternativamente, un complejo multiglicosiltransferasas puede no disociar normalmente este intermediario.

Los sulfátidos como receptores para opiáceos

Law y col. (177) demostraron en 1978 que la potencialidad analgésica de varios opiáceos se correlacionaba con su afinidad por el cerebrósido-sulfato y también que éste poseía la mayoría de las características de un receptor para opiáceos (178), (179), (180). Estos investigadores observaron que el cerebrósido-sulfato no sólo cumplía con los requisitos estructurales del receptor para analgésicos postulado por Beckett y Casy (1954) (181) y por Portoghese (1965) (182) sino que presentaron evidencias de que el receptor para opiáceos denominado "proteolípido" por Lowney y col. (1974) (183) era el cerebrósido-sulfato. Una objeción para aceptarlos como receptores es el hecho de que los sulfátidos están muy ampliamente distribuidos en el cerebro a diferencia de los receptores de opiáceos que están localizados selecti-

vamente en las fracciones subcelulares sinaptosómicas y microsomas (184), (185), (186) y en regiones discretas del cerebro, (187), (188).

Law y col. (177), presentan evidencias que corroboran el papel que pueden tener los sulfátidos en los receptores para la morfina. Una de estas pruebas la da el hecho de que el azul A que es un colorante con alta afinidad para los sulfolípidos pero con baja afinidad por lípidos que no tienen sulfato, antagoniza tanto el efecto analgésico de la morfina como la unión de los opiáceos en membranas plasmáticas aisladas de sinaptosomas. Otras experiencias indican que la acción de la sulfatasa A, que es una enzima que hidroliza específicamente sulfátidos, decrece o disminuye la unión específica de los opiáceos a dichas membranas. Más recientemente, Zalc y col. (1979) (189), presentaron evidencias inmunohistoquímicas sobre la relación de la sulfogalactosilceramida con el receptor para opiáceos. Preincubando secciones de tejido cerebral que se sabe que son ricas en receptores de opiáceos con el análogo de la morfina, levorfanol, inhibieron selectivamente la unión de los anticuerpos antisulfátidos sobre las membranas de las neuronas.

Tipo III: Los glicosfingolípidos como integrantes de la matriz de las membranas.(149)

Los glicosfingolípidos están anclados por la ceramida a

la matriz fluída lipofílica y tienen la cabeza polar expuesta al ambiente celular.

Una cuestión interesante es discernir que elementos hacen que la célula seleccione a la ceramida como un constituyente importante de su límite con el ambiente. Parecerían existir algunas características en la estructura de la ceramida que la hacen particularmente adecuada en relación con su presencia en la periferia celular.

Las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos y bases aminadas (fig. 16) que constituyen las ceramidas le confieren cierta versatilidad en cuanto a los requerimientos de fluidéz de las membranas. Las cadenas hidrofóbicas de estos compuestos están más saturadas y son más largas que en los glicerolípidos. Por otro lado en la región en que se unen químicamente los componentes ácido graso y esfingosina, "zona intermedia" (Fig.17) se da una mayor posibilidad de variación en los grupos polares funcionales: OH^- y alílicos. Tal hecho no se corresponde con los fosfolípidos, a excepción de los plasmalógenos. La estructura de la "zona intermedia", ubicada entre la zona hidrofóbica y el grupo polar de la cabeza, se correlaciona bastante bien en los distintos tejidos con el grado de estiramiento mecánico de los distintos tipos de células. (Tabla 4). Esto sugiere que la zona intermedia puede crear interacciones polares

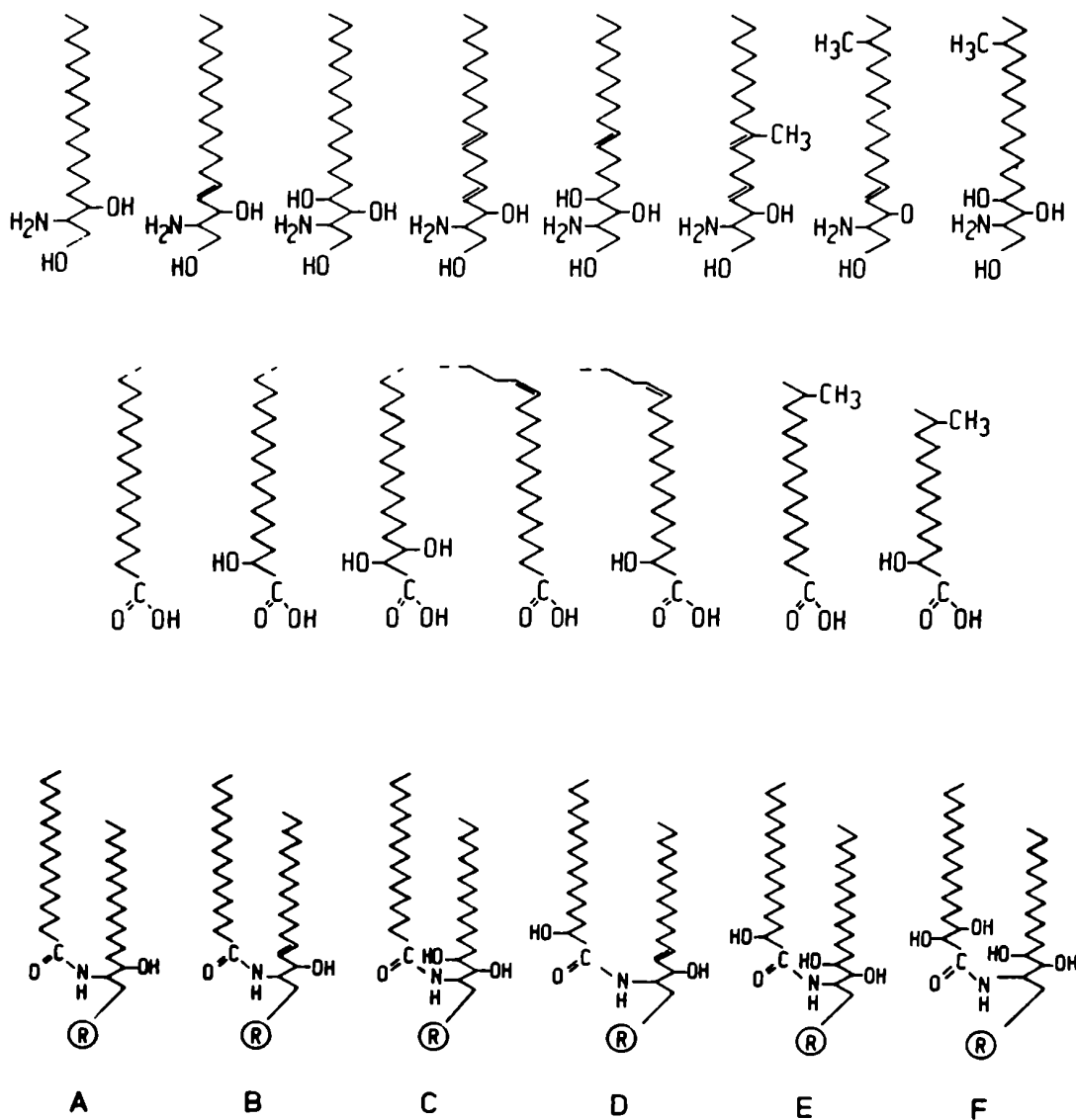


Figura 16: Tipos diferentes de bases aminadas de cadena larga (esfingosinas), (arriba), ácidos grasos (medio) y algunas de sus combinaciones posibles en esfingolípidos, (abajo).

estabilizantes, (puentes de Hidrógeno) en una dirección lateral de la membrana. Esto significa que las ceramidas pueden influenciar las propiedades de la monocapa superficial: una es por intermedio del tipo de cadenas hidrocarbonadas, la otra es a través de los grupos polares en la zona intermedia.

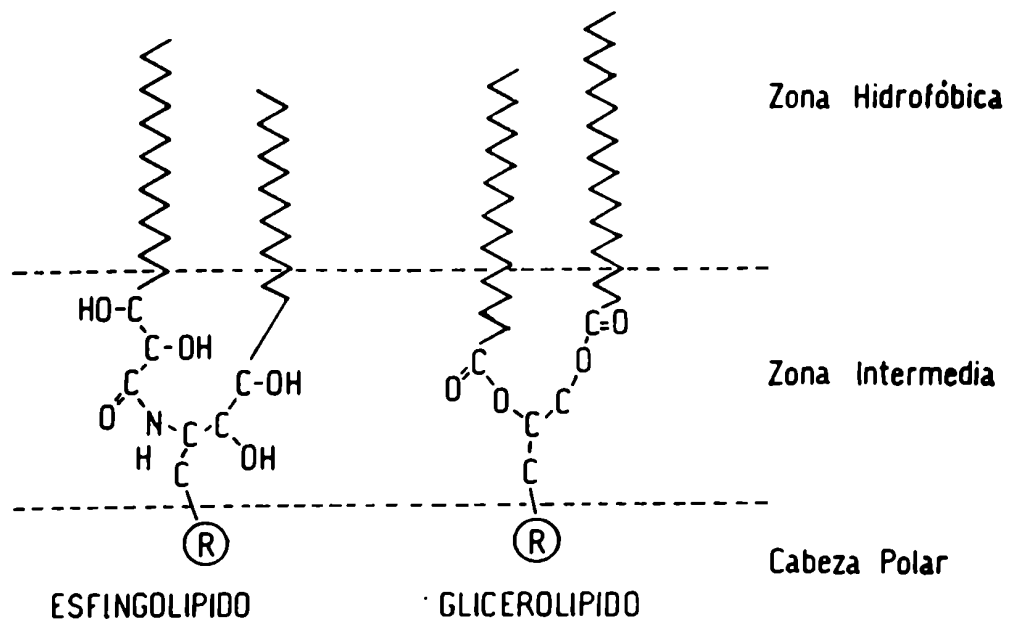


Figura 17: Estructura de un esfingolípido y de un glicerolípido. La zona intermedia tendría importancia en las interacciones laterales en la membrana.

TABLA 4

Composición en ceramidas de algunas células y o tejidos. En todos los casos un grupo polar está unido al C-1 de la base aminada. (Tomado de Karlsson, (1976), (149).

<u>Tipo celular</u>	<u>Ceramida más abundante</u> (Compare fig.16)	<u>Número de grupo OH⁺</u>	<u>Referencia</u>	<u>Observaciones</u>
Cristalino (humano)	A, B	1	(190)	--Este tejido es el único que tiene más A que B.
Eritrocito (humano)	B	1	(99)	--Ambiente constante (plasma sanguíneo)
Cerebro	B, D	1, 2	(99)	--Variación local en la fuerza iónica, dentro de ciertos límites.
Riñón (humano)	B, C, D, E	1, 2, 3	(99)	--Aumento del contenido en OH ⁺ y largo de la cadena hacia la papila.
Intestino (perro)				
--Lamina propia	B	1	(192)	--Embebido en tejido conectivo
--Epitelio	E	3	(192)	--Expuesto a la variación de contenido de la luz intestinal.
Levaduras	E, F	3, 4	(138)	--Organismo unicelular en un ambiente no regulado.

Cuando se consideran las interacciones posibles del colesterol, fosfatidilcolina, esfingolípidos y proteínas, puede observarse que la zona intermedia es diferente en los esfingolípidos y glicerolípidos. En estos últimos solamente existen aceptores de puentes de H mientras que los esfingolípidos como ya se dijo, poseen tanto aceptores como dadores. En una monocapa de estos dos lípidos, podría esperarse, por lo tanto que existan puentes de H en las zonas intermedias incrementando así la probabilidad de un estado asociado entre las moléculas de la monocapa. No obstante esto, es muy poco lo que se conoce todavía acerca de la influencia de la zona intermedia sobre la función, constitución o fluidez de la membrana. Sólo puede sugerirse, por el momento, que una estructura variable de la zona intermedia, puede producir efectos de orientación precisos, importantes no sólo por los puentes de H en esta parte de la membrana sino también por la conformación molecular como un todo.

II. 2. BIOSINTESIS DE LOS GLICOESFINGOLIPIDOS

La química y el metabolismo de los glicoesfingolípidos sigue siendo de fundamental importancia ya que dicho conocimiento ayuda a definir el papel que estos compuestos juegan en la dinámica de las funciones celulares y en los aspectos estructurales de las membranas de las células.

Existen dificultades específicas en este campo relacionadas con la insolubilidad de los sustratos y los productos en medios acuosos. Además, la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis de los esfingolípidos están asociadas a partículas. Por todo ello su ensayo "in vitro" requiere usualmente la presencia de detergentes.

En general se acepta que los glicoesfingolípidos se sintetizan por agregado secuencial de monosacáridos a la porción lipídica (ceramida) por el extremo no reductor de la cadena de oligosacáridos en crecimiento. En la síntesis están involucrados los nucleótido-azúcares y presenta requerimientos de pH y de cationes divalentes semejantes a los que se necesitan para la síntesis de glicoproteínas. Además, aunque hasta el momento no hay evidencias directas, no debe descartarse la intervención que podrían tener los lípidos intermediarios en la síntesis de los glicolípidos. (193).

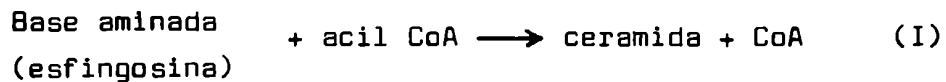
II. 2.1. GALACTOSILCERAMIDAS

La mayoría de los estudios sobre el metabolismo de las galactosilceramidas se hicieron con extractos de cerebro a causa de que los mamíferos jóvenes sintetizan grandes cantidades de este lípido durante el proceso de mielinización. Las glicosilceramidas de cerebro son muy heterogéneas con respecto a los

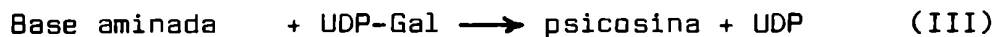
ácidos grasos que integran la molécula, se pueden encontrar ácidos grasos hidroxilados como no hidroxilados, saturados o no saturados y con longitudes de cadena que oscilan entre 16 y 28 átomos de carbono (95).

Burton y col., (194) demostraron "in vitro" la formación de la galactosilceramida a partir de UDP-Gal y un precursor endógeno. Se propusieron dos rutas de biosíntesis alternativas:

a) Acilación de una base de cadena larga seguida de galactosilación:



b) Galactosilación de una base aminada para formar psicossina, seguida de acilación:



El ácido graso unido a la CoA puede contener o no un grupo OH⁻. Ambos caminos metabólicos pueden demostrarse "in vitro" (Fig.18). La galactosilación de la ceramida con hidroxí-ácido graso para formar hidroxí-ácido graso-galactosilceramida (II) ha sido demostrada por Morell y Radin (195) y Basu y col. (196) quienes usaron fracciones particuladas de cerebro en desarrollo.

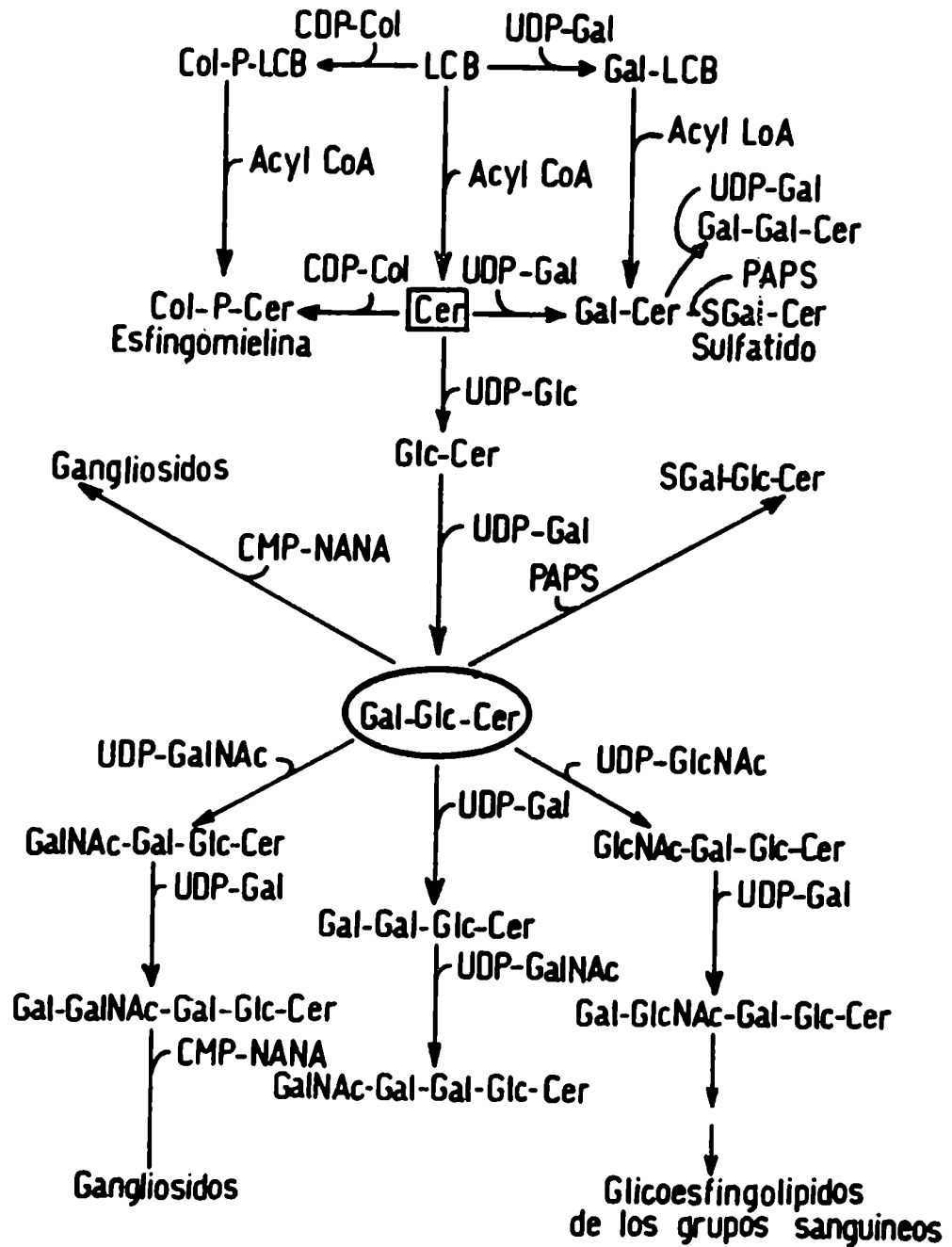


Figura 18: Biosíntesis de los esfingolípidos. Abreviaturas: Col=colina; S=sulfato en posición 3 de la galactosa; PAPS= 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato; NANA= ácido siálico. Resto de abreviaturas en tabla 6. (215).

Esta reacción ha sido confirmada tanto en cerebro (197), (198) como en riñón (199). Hay evidencias posteriores que demuestran como la ceramida con hidroxí-ácido graso es incorporada intacta a la galactosa obtenida usando sustratos sintéticos e identificando al producto por espectrometría de masa (200). También se ha demostrado que la galactosilceramida con ácido graso no hidroxilado también se sintetiza por galactosilación de la ceramida (201), (202).

El camino alternativo de formación de galactosilceramida, reacción III con formación de psicósina lo demostraron Cleland y Kennedy (203) y fue confirmado por otros autores (195), (204), (205), (206). La acilación de la psicósina por acil CoA para formar galactosilceramida con ácido graso no hidroxilado fue demostrada por Brady (207) y también por Hammarstrom (208).

No puede desecharse, por lo tanto el posible papel fisiológico que puedan jugar en la célula la galactosil o glucosil esfingósina, aunque probablemente este camino de biosíntesis sea de menor importancia para la síntesis de glicolípidos "in vivo".

II. 2.2. SULFATIDOS

La transferencia del azufre radiactivo desde 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato a galactosilceramida para formar sulfo-

galactosilceramida (sulfátido) se demostró en preparaciones de cerebro de mamíferos (209), (210). (Fig.18).

La máxima actividad transferasa en cerebro de rata coincide con el período de máxima mielinación, (211). Este resultado es esperable dado que el sulfátido de cerebro se encuentra en su mayor parte en la mielina. En riñón se encuentra una lactosilceramida sulfatada (212) y la enzima de cerebro puede catalizar la transferencia del sulfato a la lactosilceramida, (213), (210). La incorporación de galactosilceramida radiactiva al sulfato se demostró usando riñón de rata, (214) y cerebro, (213). El producto "in vitro" tiene el sulfato en posición 3 de la galactosa, (214) como lo hace el sulfato natural.

II. 2.3. GLUCOSILCERAMIDAS

En extractos particulados de cerebro embrionario de pollo, Basu, Kaufman y Roseman, (216), demostraron que la ceramida puede ser glucosilada por UDP-Glc para formar glucosilceramida (Fig.18). La enzima de cerebro de ratón no muestra especificidad por la longitud de la cadena; lignoceroil-esfingosina es un sustrato tan activo como la estearoil-esfingosina, (201) y las ceramidas con hidroxi-ácidos grasos son también efectivos como aceptores, (217).

OLIGOGLICOSILCERAMIDAS

Las oligoglicosilceramidas neutras cuya biosíntesis ha sido estudiada en detalle, pueden clasificarse en tres grupos, (Tabla 5): a) la tetraglicosilceramida ó globósido I (218, (219), b) la tetraglicosilceramida estructural de los grupos sanguíneos (220) c) precursores de la tetraglicosilceramida y gangliósidos (asialogangliósidos). La formación de lactosilceramida a partir de glucosilceramida ha sido demostrada por Hildebrand y Hauser en bazo de rata (221) y por Basu y col. en cerebro embrionario de pollo (216).

El próximo paso, la galactosilación de la lactosilceramida por UDP-Gal, puede ser catalizada por homogenados de bazo (222) y riñón (199), (223). Las dos actividades enzimáticas que transfieren galactosa a la glucosilceramida y lactosilceramida respectivamente, pueden diferenciarse por inactivación por calor y son inhibidas por esfingolípidos diferentes (222). Se ha descrito la N-acetilglucosilación de la lactosilceramida (224) y recientemente Basu y Basu (225) han demostrado otro paso en esta secuencia biosintética, la galactosilación por UDP-Gal de GluNAc-Gal-Glu-Cer. Handa y Burton (226) usaron una fracción particulada de cerebro de rata joven para demostrar que la lactosilceramida podría actuar como aceptor para la mitad azúcar de UDP-GalNAc.

El próximo paso, galactosilación por UDP-Gal de la GalNAc-Gal-Glu-Cer, lo demostraron Yip y Dain (227). Aunque la actividad enzimática está presente en el cerebro de la rata joven, se encontró mayor actividad en cerebro de rana; la enzima del cerebro de rana fué solubilizada y caracterizada (227). Los pasos biosintéticos discutidos hasta el momento están resumidos en la fig. 18.

II. 2.4. GANGLIOSIDOS

La biosíntesis de los gangliósidos, a partir de la ceramida, se produce por el agregado gradual de azúcares en presencia de glicosiltransferasas unidas a membranas. Es bastante probable que toda la biosíntesis se haga a través de un complejo multienzimático, genéticamente regulado y específico (228) y cada complejo sería el responsable de la síntesis de un glicolípido completo. Cada reacción involucra la transferencia de un residuo azúcar desde el nucleótido azúcar hacia un aceptor



El camino de síntesis de los gangliósidos principales ha sido estudiado por Roseman (229), Basu (230) y Fishman (231), (Fig. 19). La incorporación de los azúcares se hace ordenadamente y cada glicosiltransferasa es altamente específica. Como

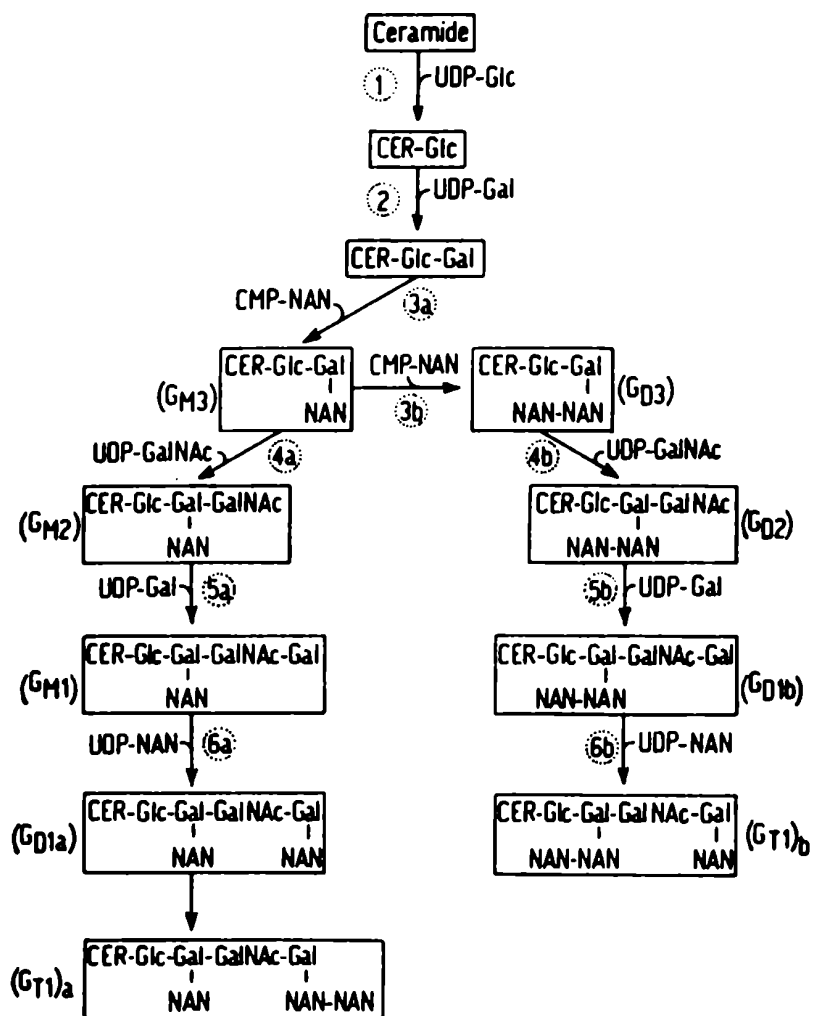


Figura 19: Biosíntesis de gangliósidos. Cada reacción es catalizada por una glicosiltransferasa específica. CER-ceramida; Gal=galactosa; GalNac=N-acetilgalactosamina; Glc=glucosa; NAN=ácido siálico. Resto de abreviaturas en tabla 6. (243).

puede observarse en la fig. 19, aunque G_{M2} es una molécula ramificada, el ácido siálico se incorpora antes que la N-acetilgalactosamina.

Parece ser, por biosíntesis "in vitro" que el G_{M3} es mejor sustrato para la N-acetilgalactosaminiltransferasa que la lactosilceramida (228). Lo mismo ocurre con otras enzimas en este proceso (231). La biosíntesis de los disialogangliósidos ocurre por medio de reacciones análogas a las descritas (228), (232) comenzando con la formación del G_{D3} (233). "In vitro" se ha estudiado la actividad de una sialiltransferasa que convierte el G_{D1b} en G_{T1b} (234). (Reacción 6 b de la figura 19). Estos experimentos se hicieron usando glicolípidos exógenos como aceptores. Sin embargo, experimentos hechos en vivo o con aceptores endógenos por Caputto y col. (235), (236) sugieren que las interacciones entre las enzimas y los sustratos serían mucho más complejas de lo que señala el esquema de la figura.

INTERRELACIONES DE LOS CAMINOS METABOLICOS QUE INVOLUCRAN A LOS ESFINGOLIPIDOS.

En líneas generales se piensa que los caminos metabólicos que involucran a los esfingolípidos están controlados por el mismo tipo de mecanismos operativos que para otros caminos metabólicos. Sin embargo no hay muchas evidencias sobre la existencia de mecanismos de control tales como inducción, repre-

sión o inhibición por retroalimentación de las enzimas involucradas. Tal vez, el obstáculo más importante al progreso en este campo lo da el hecho de que no hay preparaciones enzimáticas puras y la consiguiente incapacidad para determinar cantidades de una determinada enzima. Verdaderamente, a causa de la heterogeneidad de las fracciones de ácidos grasos y de las bases de cadena larga dentro de una clase dada de esfingolípidos, no puede decirse con certeza cual es el número de enzimas que pueden estar involucradas en efectuar reacciones biosintéticas relacionadas. Algunos de los interrogantes en relación a las interrelaciones metabólicas y tal vez al número de enzimas que intervienen pueden explicarse por métodos indirectos. Por ejemplo, enzimas que son activas en la síntesis de los esfingolípidos de la mielina pueden caracterizarse por estudios de desarrollo. La aparición de actividad enzimática en cerebro para la galactosilación de la ceramida con hidroxí-ácido graso para formar Gal-Cer (198), (217), indica que esta enzima está comprometida, probablemente en la mielinación. La dependencia de la actividad con la edad del animal diferencia claramente esta enzima de la enzima que galactosila la glucosilceramida para formar lactosilceramida (205).

TABLA 5

Estructuras anoméricas de tetrahexosiceramidas (215)

Globósido I	GalNAc(β ,1 \rightarrow 3)Gal(α ,1 \rightarrow 4)Gal(β ,1 \rightarrow 4) Glc(1 \rightarrow 1)Cer
Esfingolípido es- tructural de gru- pos sanguíneos (estructura común)	Gal(β ,1 \rightarrow 3)GlcNAc(β ,1 \rightarrow 4)Gal(1 \rightarrow 4) Glc(1 \rightarrow 1)Cer
Asialogangliósido	Gal(β ,1 \rightarrow 3)GalNAc(β ,1 \rightarrow 4)Gal(β ,1 \rightarrow 4) Glc(1 \rightarrow 1)Cer

Los sistemas bacterianos también pueden ser útiles para obtener información sobre el control del metabolismo de esfingolípidos. Cuando la bacteria anaeróbica Bacteroides melaninogenicus crece en un medio suplementado con vitamina K, contiene más o menos la mitad de sus fosfolípidos como fosfoesfingolípidos, ceramida fosforiletanolamina y ceramida fosfatidilglicerol (237). En ausencia de vitamina K, la síntesis de esfingolípidos y el crecimiento se detienen. (238). El agregado de succinato restablece un ritmo bajo de crecimiento y produce una forma aberrante de célula alargada con poco contenido de esfingolípidos. La adición de vitamina K restablece tanto el crecimiento normal como la síntesis de esfingolípidos. La capacidad de reiniciar la síntesis es muy rápida por lo que este sistema resulta interesante en estudios sobre el control de estos procesos. Estas observaciones junto con el

hecho de que la vitamina K estimula la CDP-colina:ceramidacolina fosfotransferasa (esfingomielinasintetasa) de las mitocondrias del hígado de pollo, sugieren un papel importante para las naf-toquinonas en el metabolismo de los esfingolípidos.

Otros campos potencialmente importantes tienen que ver con las investigaciones sobre la relación entre el metabolismo de los glicoesfingolípidos y los glicerofosfolípidos, a través de los productos de degradación de las bases de cadena larga (239), (240) y también con el metabolismo de las proteínas estructurales en sistemas de membranas (241), (242).

Por todo ello, una de las razones para estudiar los glicoesfingolípidos en hongos, es que estos eucariotes inferiores ofrecen la ventaja de poder controlar las condiciones de crecimiento. Además, la obtención de mutantes permitiría conocer cuales y como son las enzimas que catalizan la síntesis y degradación de los glicoesfingolípidos en estos organismos.

II. 3. GLICOESFINGOLIPIDOS EN HONGOS

Brennan y col. (1975) (244) sugirieron que la gran mayoría de los esfingolípidos de hongos son glicoesfingolípidos del tipo de los que existen en las plantas superiores o en los animales.

En los tejidos animales, los residuos de azúcar están unidos glicosídicamente con el grupo hidroxilo primario de la esfingosina acetilada (ceramida). En plantas superiores, la unión glicosídica directa se ve solamente en las monoglicosilceramidas simples (cerebrósidos). El resto de los glicoesfingolípidos de plantas tienen un puente fosfoinositol entre la ceramida y el azúcar. En los hongos se encuentran ambos tipos de glicoesfingolípidos (Tabla 6) y a menudo se los denomina genericamente micoesfingolípidos.

Cerebrósidos o glicosilceramidas

Tanto en mohos como en levaduras o en Basidiomycetes, se ha descrito la presencia de cantidades abundantes de glucosil y galactosilceramidas. (Tabla 6). Los primeros que intentaron aislar cerebrósidos en hongos fueron Landsiedel y Bamberger en 1905 (245) en Lycoperdon bovista, Zellner en 1911 (246) y Rosenthal en 1922 (247) en Amanita muscaria, Hartmann y Zellner en 1928 (248) en Marasminus scorodoni. Lamentablemente ninguno de ellos pudo obtener buenas caracterizaciones, ya que los productos eran impuros y los datos proporcionados no eran suficientes.

Wagner y sus colaboradores fueron los primeros que informaron realmente sobre la existencia de una glicosil ceramida

TABLA 6

Esfingolípidos complejos en hongos (tomado de Brennen) (5)

Estructura probable	Nombre común y abreviaturas	Composición de la ceramida	Fuente	Referencia
$\text{Cer-(1)} \rightarrow \text{-O-P-O-inositol}$	Inositolfosforilceramida (CerPI)	Fitoesfingosina e hidroxil $\text{C}_{26:0}$ ácido graso	<u>Seccheromyces cerevisiae</u>	(138)
$\text{Cer-(1)} \rightarrow \text{-O-P-O-inositol}$	Inositolfosforilceramida (CerPI)	Fitoesfingosina y $\text{C}_{26:0}$ ácido graso	<u>Seccheromyces cerevisiae</u>	(138)
$\text{Cer-(1)} \rightarrow \text{-O-P-O-inositol}$	Inositolfosforilceramida (CerPI)	Fitoesfingosina y dihidroxil $\text{C}_{26:0}$ ácido graso	<u>Seccheromyces cerevisiae</u>	(138)
$\text{Cer-(1)} \rightarrow \text{-O-P-O-inositol}$	Inositolfosforilceramida (CerPI)	No determinada	<u>Neurospora crassa</u>	
$\text{Cer-(1)} \rightarrow \text{-O-P-O-inositol}$	Inositolfosforilceramida (CerPI)	No determinada	<u>Aspergillus niger</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-O-P-O-inositol}$ $\text{O}^- \text{Na}^+ \quad \text{O}^- \text{Na}^+$	Di-inositol-di-fosforil ceramida (CerP ₂ I ₂)	Fitoesfingosina e hidroxil $\text{C}_{24:0}$ ácido graso	<u>Neurospora crassa</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-(man)-O-P-O-inos}$	Manosil-di-inositol-di-fosforilceramida (CerP ₂ I ₂ M)	No determinada	<u>Seccheromyces cerevisiae</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-man}$	Manosilinositolfosforil ceramida (CerPIM)	Fitoesfingosinas C ₁₈ y C ₂₀ Mezcla de 2-hidroxi y no hidroxi ácidos grasos, saturados e insaturados	<u>Seccheromyces cerevisiae</u> y <u>Candida utilis</u>	(249) (136)
$\text{Cer-O-P-O-inos-man}$	Manosilinositolfosforil ceramida (CerPIM)	Dihidroesfingosina C ₁₈ 2-hidroxi y no hidroxi ácidos grasos de C ₂₆	<u>Seccheromyces cerevisiae</u>	(138)
$\text{Cer-1'-fosforil-1-inos-(2} \leftarrow \text{1)-}\alpha\text{-D-man}$	Manosilinositolfosforil ceramida (CerPIM)	Esfingosina C ₁₈ 2-hidroxi $\text{C}_{20}\text{C}_{24}$ ácidos grasos	<u>Agericus bisporus</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-(man-gal)}$	Galactosilmanosilinositol fosforilceramida (CerPIMGal)	No determinada	<u>Aspergillus niger</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-(man-gal-glc)}$	Glucosilgalactosilmanosil inositolfosforilceramida (CerPIMGalGlc)	No determinada	<u>Aspergillus niger</u>	
$\text{Cer-O-P-O-inos-(man}_2\text{-gal}_3\text{)}$	Trigalactosildimanosil inositolfosforilceramida (CerPIM ₂ Gal ₃)	No determinada	<u>Aspergillus niger</u>	
$\text{Cer-(1')fosforil-(1)inos(6} \leftarrow \text{1)}$ $\alpha\text{(D-GlcUA)}$	Fucosiltrigalactosilglucuronosilinositolfosforilceramida (CerPIGlcUA)Gal ₃ Fuc)	No determinada	<u>Agericus bisporus</u>	
	$\alpha\text{-D-Gal(2} \leftarrow \text{1)}\alpha\text{-D-Gal(2} \leftarrow \text{1)}\alpha\text{-D-Gal(2} \leftarrow \text{1)}\alpha\text{-L-Fuc}$			
$\text{Cer-(1'} \leftarrow \text{1)glucose}$	Glucosilceramida (GlcCer)	Gran variedad de fitoesfingosinas. 2-hidroxi $\text{C}_{16:0}$ ácidos grasos	<u>Phycomyces blakesleeana</u>	
$\text{Cer-(1'} \leftarrow \text{1)glucose}$	Glucosilceramida (GlcCer)	Esfingosina C ₁₉ y C _{18:2} ácidos grasos	<u>Menaenula ciferrii</u>	(252)

en hongos (249). Se trataba de una galactosilceramida hallada en Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis (136) y Aspergillus niger (251). El glicosfingolípido de A. niger tenía esfingosina C_{18} y dihidroesfingosina C_{18} y más del 80 % del ácido graso que componía la ceramida era 2-hidroxiocetadecenoico. La galactosilceramida de C. utilis tenía dihidroesfingosina de C_{16} y C_{18} , esfingosina C_{18} y ácido 2-hidroxiesteárico como ácido graso principal. En la cepa de A. niger usada por Wagner, la galactosilceramida parecía ser el lípido mayor dado que fué obtenida en forma cristalina por cromatografía en capa delgada de un extracto entero de cloroformo: metanol.

Kaufmann y col. (252) en 1971 describieron en detalle una monoglicosilceramida en Hansenula ciferrii. Aparentemente, este organismo no contenía las mismas galactosilceramidas de S. cerevisiae ni de C. utilis. Las bases eran esfingosinas de C_{17} y C_{19} . Los ácidos grasos también eran diferentes, pues los componentes mayores no eran hidroxilados. Průstenik y Cosovic en 1974 (253) aislaron y caracterizaron parcialmente los cerebrósidos de Clitocybe tabescens y de un gran número de especies agáricas demostrando la existencia de distintas bases aminadas, pero en los cerebrósidos de los Basidiomycetes, el azúcar que los compone es la glucosa.

Poliglicosilceramidas:

Hasta hace pocos años no se sabía si los hongos y las plantas superiores contenían poliglicosilceramidas similares a los globósidos, citolipinas, gangliósidos o glicoesfingolípidos similares a los de los grupos sanguíneos de las células animales. En 1974, Lester y col. (141) describieron una (gal)₃-glu-cer en Neurospora crassa. (Tabla 6). Buscando glicofosfoesfingolípidos encontraron otro glicoesfingolípido pero desprovisto de fósforo. La base aminada aparentaba ser fitoesfingosina C₁₈ y el ácido graso, el 2-hidroxitetraicosanoico. El glicolípido era estable a la metanólisis alcalina suave indicando una unión amida con el ácido graso. Este glicolípido aparece también en otras cepas de Neurospora pero hasta el momento no se ha encontrado en otros hongos o levaduras. En esta tesis se presentan evidencias de otros glicoesfingolípidos de cadena más corta que el encontrado por Lester.

Probable función de los glicoesfingolípidos en los hongos.

La función de los glicoesfingolípidos en hongos es poco conocida. Parecería ser que la naturaleza de la porción azúcar de los glicoesfingolípidos estaría involucrada en fenómenos de reconocimiento celular y asociación intercelular. En los hongos por lo tanto los glicolípidos parecería que juegan el papel que las glicoproteínas ocupan en eucariotes superiores. Por

ejemplo, el ácido glucurónico está directamente involucrado en los fenómenos de reagregación celular en Microciona prolifera (255) y la manosa es el principal factor de aglutinación sexual liberado por Hansenula wingi (256). Asimismo la manosa y otros azúcares están aparentemente implicados en la aglutinación de las gametas de Chlamydomonas (257). En Dyctiostelium discoideum, los glicoesfingolípidos parecen estar involucrados en los procesos de agregación celular. Este es un sistema excelente para estudiar aspectos de la diferenciación en eucariotes, ya que en un medio rico, Dyctiostelium se multiplica y permanece como células individuales (amebas). Cuando el medio es insuficiente, la población de células individuales, homogénea, se hace mutuamente adhesiva y se agrega para formar organismos multicelulares, comparables a un tejido animal, transformándose en dos tipos de células que maduran como esporas viables o como células pedunculadas, vacuoladas (258). Mc Mahon en 1973, (259) propuso un modelo para la agregación ameboide, que en algunos aspectos no es diferente al sugerido por Roseman (1974), (260) para el contacto intercelular en animales superiores. Dicho autor sugirió que hay moléculas "sensibles al contacto" en la superficie de las células que regulan la concentración interna de AMP cíclico. Estas moléculas son activadas por interacción con moléculas complementarias de las células adyacentes. Se examinó la composición química de algunos de estos factores de cohesión, algunos

resultaron ser glicoproteínas (261). Sin embargo, Whilhems y col. en 1974, (262) encuentran que los glicoesfingolípidos intervienen en la agregación ameboide. Un extracto fenólico-acuoso de células capacitadas para la agregación produjo dos antígenos diferentes (I y II). El antígeno I se supuso que era un fosfoesfingolípido, dado que tenía ácidos grasos, fitoesfingosina y fósforo, pero no inositol. También tenía etanolamina y 19 residuos de azúcares. Posiblemente este antígeno sea un complejo de glicoesfingolípido relativamente simple más un lípido análogo al lipofosfonoglicano aislado en Acanthamoeba castellanii (263), (144).

El antígeno II, en cambio, es una glicoproteína con los mismos azúcares que el antígeno I pero en distinta proporción y con la fracción proteica rica en aminoácidos acídicos hidroxilados. El antígeno I de una mutante de D. discoideum que no agrega, contenía mucho menos fucosa que las células que podían agregarse. Estos resultados parecen sugerir una ausencia de "respuesta por extensión glicosídica" en las amebas en agregación.. Este término, acuñado por Hakomori en 1972, (265) se originó cuando observaron que la cantidad y complejidad del azúcar en los glicoesfingolípidos se incrementaba cuando los cultivos alcanzan la confluencia y este incremento se atribuyó a un incremento de la extensión glicosídica de los lípidos precursores. Esta observación, combinada con la evidencia de que

los glicosfingolípidos de las células animales están primariamente localizados en la membrana plasmática ha llevado a Hakomori a suponer que en células en crecimiento, una cierta proporción de glicosfingolípidos y glicoproteínas están acomodados en un orden complementario a estructuras semejantes en células opuestas. Este concepto de la función de los glicosfingolípidos sobre la superficie de células animales puede aplicarse directamente a la agregación en los Acrasiales. En el caso de Eumycota, los glicosfingolípidos mientras proveen de un sitio de unión a la membrana de los constituyentes de la pared celular, pueden proveer también de sitios de agregación o factores sexuales de aglutinación.

En Neurospora crassa fué descrito por Lester (1974), (141) un glicosfingolípidos del tipo de las oligoglicosilceramidas, pero en 1976, Kushwaha y Kates (266) niegan la existencia de glicosfingolípidos en este hongo. Esta tesis confirma la presencia de glicosfingolípidos en Neurospora crassa y los caracteriza.

III. Neurospora crassa

III. 1. Características

Neurospora crassa es un hongo que pertenece a la clase Ascomycetes, Serie: Pyrenomycetes, Orden: Sphaeriales, Familia: Sordariaceae. (267). (Figura 20).

Fu  estudiado por primera vez, a mediados del siglo pasado (1843), y se lo clasificó entre los hongos imperfectos, como Monilia sitophila ya que no se conocía su ciclo sexual. Se lo llamó Monilia porque la forma y disposición en serie de sus esporas, las asemejaban a un collar y sitophila porque significa amante del pan, ya que estos son los hongos que se conocen vulgarmente como moho rojo del pan.

Recién alrededor de 1927 se encontraron formas perfectas asociadas con estos mohos y fueron B.O. Dodge y J. Shear (268) quienes los clasificaron incluyéndolos en la clase Ascomycetes y le dieron el nombre genérico de Neurospora a causa de que sus esporas ovales y negras presentan sobre la superficie externa estrías semejantes a nervaduras.

La especie N. crassa se encuentra en áreas tropicales y subtropicales y crece sobre árboles o restos celulósicos de plantas. Se la aisló por primera vez en Indiana (E.U.A.) y actualmente es muy usada en investigación, porque su cultivo y mantenimiento son fáciles. Debido a estas características de cultivo es posible compararlos con las bacterias y establecer de este modo paralelos valiosos entre la biología molecular de organismos eucariotes y procariotes.

El micelio es laxo, de aspecto mohoso con conidios rosados en forma de collar. Las células que constituyen las hifas,

son multinucleadas, variando el número de núcleos entre 3 y 100 por célula. Poseen mitocondrias normales, retículo endoplasmático con ribosomas, nucléolos y varias inclusiones tales como cristales de ergosterol, gotas de lípidos sobre todo en los órganos reproductores y en las esporas (5) corpúsculos de glucógeno y gránulos de pigmento. Por fuera de la membrana plasmática existe una pared celular muy gruesa compuesta de polímeros de glucosa, un proteoglicano, quitina y poligalactosamina, proteína y lípidos en menor proporción (269). Las hifas o filamentos ramificados aparecen incompletamente segmentadas por septos que tienen poros simples de $0,5 \mu$ de diámetro en su centro. Los poros permiten el libre fluir del citoplasma a lo largo de la hifa llevando núcleos, mitocondrias y otras inclusiones hacia el extremo de la hifa donde se produce el crecimiento por extensión de la misma.

Como organismo heterotrofo puede usar acetato, succinato, glicerol, glucosa y/u otros monosacáridos, así como oligo y polisacáridos como fuente de carbono. Como fuente de nitrógeno acepta nitritos, nitratos, amonio y aminoácidos. También necesita unas pocas sales simples, oligoelementos y una sola vitamina, la biotina.

Presenta tres formas de esporas, dos asexuales, macro y microconidios y una sexual (ascosporas). Los macroconidios,

ovales, rosados, se desarrollan sobre conidioforos ramificados y constituyen la fase de propagación asexual. Son multinucleados, con un promedio de 2,5 núcleos por conidio.

Los microconidios son uninucleados y también pueden germinar y dar micelio, pero su función primordial es como espermacio en la fecundación.

Los macroconidios aparecen en los cultivos entre los dos y cuatro días de crecimiento, mientras que los microconidios tardan entre 8 y 10 días a temperaturas de 25° C.

Los cultivos vegetativos son haploides y morfológicamente hermafroditas, una cepa normal de cada tipo (A ó a) puede producir gametas masculinas (microconidios) y gametangios femeninos (ascogonios) encerrados en el protoperitecio. Como la especie es heterotálica, requiere la participación de dos tipos de cepas compatibles (A y a) en la reproducción sexual; ésta ocurre cuando las condiciones ambientales son desfavorables para el desarrollo vegetativo.

La fertilización implica la distribución de conidios sobre la superficie del cultivo compatible que tenga protoperitecios.

Después que el núcleo del espermacio penetra en el ascogonio, los núcleos parentales se dividen mitóticamente varias veces y simultáneamente el ascogonio produce prolongaciones a donde migran los pares de núcleos compatibles. Estas son las

llamadas hifas ascógenas que desarrollan hasta convertirse en células madres de los ascos. Aquí ocurre la fusión de los núcleos dando por resultado un núcleo diploide que pronto sufre una división meiótica seguida por una mitótica. El resultado final es un asco con ocho ascosporas que a su vez son binucleadas. (270). Los dos tipos de apareamiento segregan en las ascosporas en proporción 1:1 como dos alelos de un mismo gen. Las ascosporas son expulsadas al exterior a través del cuello del peritecio. Pueden permanecer en estado latente bastante tiempo y necesitan temperaturas de hasta 60°C para activarse y germinar.

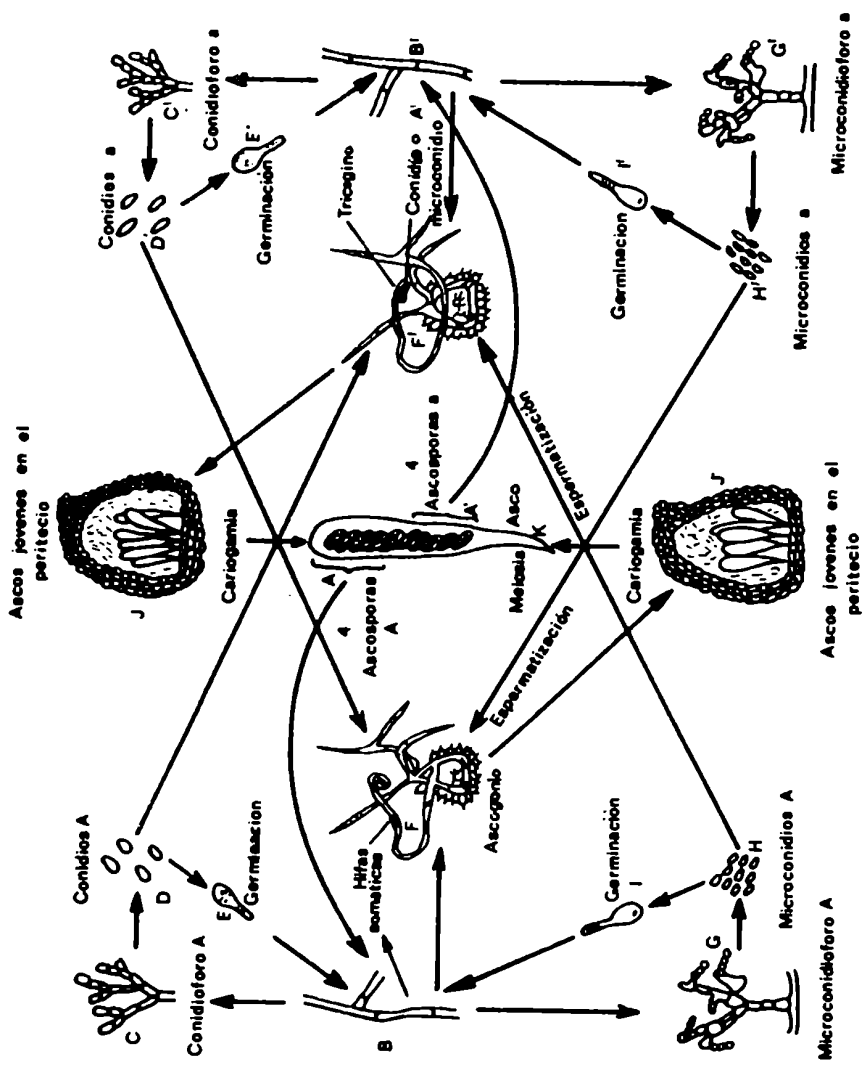


Figura 20: Ciclo de vida de *Neurospora* sp. (270)

MATERIALES Y METODOS

I. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

I. 1. Organismo utilizado

En todos los estudios realizados se usó la cepa salvaje del hongo Neurospora crassa original St Lawrence 74 del cepario de este laboratorio. Cuando fue necesario se usó la cepa mutante cr-1 (FGSC 488) deficiente en adenilato ciclasa.

Las cepas se repicaron en tubos con medio sólido conteniendo 2% de sacarosa, 0,5 μg /100 ml. de biotina y 1,5% de agar en el medio mínimo de Vogel, (272). Los repiques se realizaron cada 6 ó 7 días, manteniéndose los cultivos en estufa a 30°C.

Para obtener cantidad suficiente de material lipídico, los cultivos se hicieron en medio líquido, este medio está compuesto por los mismos elementos usados para el medio sólido, pero sin el agar. Para realizar el cultivo en gran escala se probaron dos métodos alternativos. En todos los casos el inóculo inicial fue de 10^5 conidias por ml. de cultivo. En el primer caso, se usó un recipiente de vidrio con capacidad para 15 litros de medio líquido aireado a presión a través de un burbujeador de vidrio frito. El cultivo además se agitó magnéticamente. El hongo se cultivó

siempre por 43 hs. de acuerdo a los datos obtenidos de la curva de crecimiento. En el segundo caso se utilizaron vasos de Erlenmeyer con capacidad para 2000 ml. a los que se les colocó 400 ml. de medio mínimo a cada uno. Se incubaron a 30°C durante 43 hs. en un agitador rotatorio (120 ciclos por minuto). El rendimiento resultó mayor cuando el hongo se incubó en vasos de Erlenmeyer por lo que finalmente se siguió usando la segunda metodología.

I. 2. Curva de crecimiento

Con objeto de determinar el momento en que el cultivo debía interrumpirse para obtener el máximo de material lipídico, se realizó una curva de crecimiento procediéndose de la siguiente manera:

Se obtuvieron gran cantidad de conidias, incubando éstas en un Erlenmeyer de 1000 ml. con 200 ml. de medio mínimo durante 6 días. Al final del período de incubación, los micelios fueron aplastados con una varilla estéril para que soltaran la mayor cantidad de conidias posibles y se filtraron, por un embudo previamente esterilizado y con lana de vidrio, recogiendo se el material en tubos de 20 ml. El filtrado se lavó posteriormente con 10 ml. de agua destilada.

El líquido de filtrado se diluyó 20 veces para ser contado en cámara de Neubauer. Con las conidias así obtenidas se sembra-

ron cultivos en frascos de Erlenmeyer de 100 ml., siguiendo la segunda metodología y los micelios se cosecharon a las 18,28,38, 48 y 60 horas a partir de la inoculación.

Independientemente de la metodología utilizada para el cultivo del hongo, una vez finalizado el período de incubación, el micelio se filtró a través de un embudo Büchner, se lavó con agua destilada, se liofilizó y luego se pesó y guardó en congeladora hasta el momento de ser procesado. El peso del material liofilizado fué aproximadamente de un 10 a un 20% del peso húmedo.

I. 3. Incorporación de precursores radiactivos

I.3.1. C¹⁴ Glucosa

Para estudiar la síntesis de glicolípidos, el micelio fué incubado en presencia de C¹⁴ glucosa durante 3 hs. Para ello se usaron cultivos de las cepas salvajes y de la mutante cr-1 deficiente en adenilato ciclasa. Los micelios fueron cultivados en vasos de Erlenmeyer durante 43 hs. y luego de la filtración por Büchner, 500 mg. de micelio se colocaron en un vaso de Erlenmeyer que contenía 20 ml. de medio mínimo sin sacarosa como fuente de Carbono, al que se le agregó 20 µl. de C¹⁴ D-glucosa uniformemente marcada, (1 mCi/ml. a.e.:1 mCi/mg.). A las 3 hs. el micelio fué filtrado y liofilizado para su posterior procesamiento.

I. 3.2. Sulfato de Sodio radiactivo

Cuando se quiso detectar la presencia de sulfolípidos, la cepa St Lawrence 74 se cultivó en un frasco de Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio mínimo al que se le agregó 0,3 ml. de $S^{35}O_4Na_2$ (10 mCi/ml., a.e.: 896 mCi/mMol) a tiempo cero. El cultivo se inició por el agregado de 10^5 conidias/ml y se incubó por 43 hs. a 30°C.-

II. OBTENCION DEL EXTRACTO LIPIDICO

El micelio liofilizado se homogeneizó con 20 volúmenes de una mezcla de cloroformo: metanol (C:M), 2:1, (v:v) en un homogeneizador Sorvall Omnimixer y se calentó 20 min. a 55°C para inactivar las lipasas. El extracto se dejó de 1 a 4 hs. a temperatura ambiente y se decantó en una centrífuga Internacional.

El precipitado se reextrajo con 10 volúmenes de C:M, 2:1, se dejó 10 min. a 55°C y 1 h. a temperatura ambiente. Una tercera extracción se llevó a cabo con 5 volúmenes de C:M, 1:2.

Los sobrenadantes de las distintas fracciones se llevaron a seco con evaporación a baja temperatura y el residuo se re-suspendió en C:M, 2:1, realizándose una partición con 0,2 vol. de $MgCl_2$ 4 mM, según el método de Folch y col. (273). Luego de ello, las dos fases obtenidas se lavaron dos veces cada una

con la correspondiente fase teórica opuesta, es decir, la fase inferior se lavó con la fase superior teórica, cloroformo: metanol: agua, 1:16:16 y la fase superior se lavó con fase inferior teórica, cloroformo:metanol:agua 84:14:1. La fase superior se guardó en congeladora hasta el momento de ser utilizada para detectar la existencia de gangliósidos mientras que, la fase inferior se evaporó y el residuo así obtenido, 10 % del peso del micelio liofilizado original fué utilizado en los fraccionamientos que se indican a continuación.

III. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO LIPIDICO

III. 1. Cromatografía en columnas de ácido silícico:

La fase inferior de la extracción de Folch se fraccionó en una columna de cromatografía usando como adsorbente ácido silícico (100-200 mesh). preparada según la metodología descrita por Kates (274).

Este material tiene una capacidad de adsorción de 10-13 mg. de lípido por g. Antes de usarlo, el ácido silícico se activó durante 12 hs. a 80-100°C. La dimensión de las columnas fué de 1,5 cm. por 13 cm. y se armaron con el ácido silícico suspendido en cloroformo. La muestra se sembró suspendida en cloroformo y se eluyó con los siguientes solventes:

1-Cloroformo, 10 volúmenes de columna

2-Cloroformo:acetona, C:A, 1:1, 10 volúmenes de columna.

3-Acetona, 5 volúmenes de columna.

4-Acetona:metanol,A:M, 1:1, 10 volúmenes de columna.

5-Metanol, 10 volúmenes de columna.

III. 2. Cromatografía en columnas de intercambio aniónico

Se usó dietilaminoetilcelulosa (DEAE celulosa) forma acetato, preparada según el método descrito por Rouser y col. (281) con algunas modificaciones. Para ello, la resina se suspendió y dejó reposar en HCl 1 N por 2 hs. y luego se lavó hasta neutralidad con agua. Se filtró con Büchner de plástico con una gasa y se siguió lavando en Büchner con:

1) NaOH 1N, 2-3 hs; 2) 10 veces con agua destilada; 3) se suspendió en etanol y se lavó varias veces hasta que el material quedó casi seco; 4) se resuspendió en metanol 99 % y se procedió de igual manera que en 3). Luego de ello se secó con papel de filtro una noche. 5) se resuspendió en ácido acético una noche; y 6) se lavó varias veces con metanol 99% hasta neutralidad, guardándose en frasco oscuro hasta el momento de usar.

Se usaron columnas de 1,5 cm. por 21 cm. La resina en metanol 99% se empaquetó a presión (10 psi) y luego se lavó sucesivamente con tres a cinco volúmenes de metanol 99%, cloro-

formo:metanol, 1:1 y cloroformo.

La muestra fué resuspendida en cloroformo y sembrada.

La elución secuencial se hizo con los siguiente solventes:

1-Cloroformo, 10 volúmenes de columna.

2-Cloroformo:metanol, C:M, 9:1, 10 volúmenes de columna.

3-Cloroformo:metanol, C:M, 7:3, 10 volúmenes de columna.

4-Cloroformo:metanol, C:M, 1:1, 5 volúmenes de columna.

5-Metanol, 5 volúmenes de columna.

Este sistema de fraccionamiento se usó con la fase inferior de la extracción de Folch, saponificada, a fin de eliminar los fosfolípidos.

III. 3. Cromatografía en columnas de ácido silícico eluidas con gradiente lineal de metanol en cloroformo.

La fracción cloroformo:acetona obtenida de la cromatografía indicada en III. 1., y la fracción de cloroformo:metanol, 9:1, de III. 2. se purificaron por pasaje a través de una segunda columna de ácido silícico pero eluida con un gradiente lineal de metanol 0-15 % (v:v) en cloroformo, mientras que las fracciones acetona y acetona:metanol de III. 1. y la fracción cloroformo:metanol, 7:3 de la columna de III. 2. se purificaron con el mismo sistema pero se eluyeron con un gradiente de metanol 0-60 %

en cloroformo. En todos los casos se colectaron fracciones de 3 ml.

IV. DEGRADACION QUIMICA

IV. I. Tratamiento con ácido

IV. I. 1. Hidrólisis suave

Para descartar la presencia de poliprenilfosfoazúcares, las fracciones que contenían glicolípidos fueron sometidas a una hidrólisis a pH 2. En estas condiciones solamente es hidrolizado el enlace entre el fosfato y el azúcar en los prenil fosfo(o difosfo)azúcares. Para ello la muestra de glicolípido fué llevada a seco bajo flujo de N_2 a presión en tubos de 10 x 75 mm. Se añadieron 0,5 μ l. de una solución al 0,04 % de azul timol en agua como indicador y 5 μ l. de butanol saturado en agua como emulsificante y se agitó en un vibrador de tipo "Vortex" con HCl 0,01 N en un volúmen final de 200 μ l. El color rosado del indicador se consideró pH $2 \pm 0,2$. El tubo se tapó con bolita de vidrio, se calentó 20 min. aproximadamente en baño de agua hirviente y se interrumpió pasando a agua helada. Se agregó 1 ml. de cloroformo:metanol, C:M, 3:2, realizándose una partición según Folch (273).

En estas condiciones se supone que la fase superior debe contener los productos hidrosolubles de la hidrólisis, mientras que la fase inferior contiene el glicolípido remanente y los productos liposolubles.

IV. 1. 2. Hidrólisis enérgica.

Se utilizó para romper tanto la unión glicosídica entre las bases aminadas de cadena larga y el o los azúcares que conforman el glicolípido de tipo glicoesfingolípido como la unión amida entre los ácidos grasos y las esfingosinas.

Se utilizaron tubos de 10 x 270 mm. tipo Wheaton, con tapa a rosca hermética a las que se les agregó una lámina de teflón para evitar que los solventes usados en las sucesivas extracciones posteriores a la hidrólisis disolvieran sustancias que pudieran contaminar las muestras.

Las muestras de glicoesfingolípidos se secaron a presión de N_2 y se les agregó 300 μ l. de HCl 3N disuelto en una mezcla de butanol:agua 1:9. Se calentaron durante 4 hs. en estufa a 100°C y se interrumpió la hidrólisis por enfriamiento en hielo. Sin modificar el pH se completó el volumen hasta 1 ml. con agua y se agregó 1 ml de hexano para particionar y extraer de ese modo los ácidos grasos que se hubieran liberado con la hidrólisis. La extracción se repitió dos veces más con volúmenes

menores. La fracción hexano, conteniendo los ácidos grasos, se evaporó bajo presión de N_2 y se guardó en congeladora hasta el momento de su análisis.

Por otro lado la fracción acuosa se llevó a seco bajo presión de N_2 y se tomó en 0,3 ml. de agua, ajustándose a pH 10 por el agregado de amoníaco. Este procedimiento permitió disociar las sales formadas por las esfingosinas con los cloruros, dejando las bases libres y por lo tanto insolubles en agua. De este modo se pudo ulteriormente extraerlas con cloroformo (tres extracciones), quedando en la fase acuosa solamente los azúcares y el cloruro de amonio formado. Para eliminar este último compuesto, las muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en 0,2 ml. de piridina anhidra y evaporadas con presión de N_2 . Este procedimiento se repitió dos veces. Después del tercer agregado de piridina, los tubos se centrifugaron para precipitar las sales insolubles y los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos y guardados para su posterior análisis. (Clara Krisman, método no publicado).

IV. I. 2. 2.

Para corroborar la presencia de esterilglicósidos, las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida en HCl 3N disuelto en una mezcla de butanol:agua, 1:9, durante 4 hs. a 100°C.

Una vez concluida la hidrólisis se realizó una partición con hexano, efectuándose dos extracciones adicionales con dicho solvente, sin modificar el pH. Los esteroides se extrajeron posteriormente con una partición con cloroformo. Las fracciones se llevaron a seco con presión de N_2 y se guardaron en congeladora hasta su análisis.

IV. I. 3. METANOLISIS

IV. I. 3. 1. Enérgica

Cuando los análisis de las fracciones azúcares o ácidos grasos se hicieron por cromatografía gaseosa y/o espectrometría de masa, los glicosfingolípidos fueron sometidos a metanólisis. Se siguió básicamente el método de Clamp y col. (292). Las muestras se colocaron en tubos tipo Wheaton de 10 x 270 mm., se las llevó a seco bajo N_2 y se las resuspendió en 1 ml. de HCl 0,75 N en metanol calentándose durante 18 hs. a 80°C en estufa. El procesamiento y fraccionamiento de los productos de la metanólisis se realizó según lo descrito en el punto IV.I.2.

IV. I. 3. 2. Suave

Se utilizó para detectar o descartar la presencia de sulfátidos, cuya movilidad cromatográfica en los solventes habitua-

les coincide con las de otros glicoesfingolípidos. Se llevó a cabo retomando las muestras en HCl 0,5 N en metanol y calentando a 60-65°C durante distintos tiempos (3, 6 y 12 min.). Una vez concluido esto, se colocaron los tubos en hielo, se liofilizaron y cromatografiaron en capa delgada. (278).

IV. 2. Tratamientos con álcali

IV. 2. 1. Saponificación

Cuando fué necesario, el extracto lipídico total o algunas de las fracciones de la columna de cromatografía fueron saponificadas con NaOH 0,1 N en metanol durante 15-30 min. a 37°C con agitación permanente. Se neutralizó con HCl en metanol hasta pH 7,5-7,8 y la muestra se llevó con cloroformo a una proporción 3:2 para realizar una partición según Folch. La fracción liposoluble fué llevada a seco y resuspendida en cloroformo:metanol C:M, 2:1 para su análisis posterior. (298).

IV. 2. 2. Hidrólisis alcalina intermedia

Se utilizó para corroborar la presencia de cerebrósidos en algunas de las fracciones de las columnas de cromatografía. Las muestras se resuspendieron en 200 µl de KOH 1 N en metanol y se hidrolizaron durante 6 hs. a 100°C. La hidrólisis se hizo

en tubos tipo Wheaton con tapa a rosca. La neutralización se hizo con 50 μ l de ácido perclórico 4 N (39,9 ml. de perclórico a 100 ml. de agua) y luego de ello se añadieron 300 μ l de cloroformo más 50 μ l de agua para particionar según Folch. La fracción liposoluble se cromatografió en capa delgada. (210).

IV. 2. 3. Hidrólisis alcalina fuerte

Se utilizó para diferenciar los cerebrósidos de los esterilglicósidos que existen presuntivamente en Neurospora crassa.

Las muestras se resuspendieron en 300 μ l. de hidróxido de potasio 1,5 N en metanol y se incubaron durante 72 hs. a 80°C en tubos tipo Wheaton con tapa a rosca. (279). Luego de la hidrólisis, las muestras se transvasaron a frascos de vidrio tipo Kimax de 250 ml. conteniendo 45 ml. de cloroformo, 30 ml. de metanol y 15 ml. de agua para desalar. (La concentración de sales disminuye a 10 mmolar aproximadamente). Se centrifugaron y la fase inferior se evaporó para sembrar en capa delgada.

V. METODOS ANALITICOS

V. 1. Azúcares totales

Se valoraron por el método del fenol-sulfúrico de Dubois y

col. (280) basado en la formación de derivados del furano en medio ácido. Este método se usó para identificar aquellos picos de las columnas de DEAE celulosa que contenían glicolípidos. Para ello alícuotas de aproximadamente 10 % del volumen total de cada una de las fracciones fueron llevadas a seco bajo presión de N_2 , procediéndose según dicho método. La valoración del color se efectuó en un espectrofotómetro Coleman 2000, a 490 nm.

V. 2. Cromatografía en capa fina

Para fines preparativos se confeccionaron placas de cromatografía de 0,3-0,5 mm. de espesor, usando Silicagel G tipo 60 sobre base de vidrio.

Para fines analíticos se usaron placas de Silicagel G de base de vidrio, comerciales, sin indicador fluorescente, de 0,25 mm. de espesor.

V. 2. 1. Preparación de placas de sílice

Se utilizó el método de Kates (275). Las placas de vidrio se lavaron sucesivamente con una solución de detergente, agua corriente y agua destilada. Se secaron dejándolas escurrir y antes de utilizarlas se desengrasaron con un algodón embebido en cloroformo. El soporte de sílice se preparó de la siguiente manera: en un frasco de Erlenmeyer lo bastante grande para agi-

tar fuertemente la mezcla se colocó agua y el polvo de sílice en la proporción 33:67 ó 40:86 (peso:volumen). Una vez agitada, la mezcla se dejó reposar 1 min. y se colocó en el aplicador de gel y se armaron las placas con un espesor de 0,3 a 0,5 mm. según se necesitara. Las placas se secaron al aire y luego de ello se las cromatografió en metanol:ácido clorhídrico concentrado, 9:1, para eliminar el hierro y otros metales pesados. Una vez corridas, se secaron al aire hasta eliminar el HCl y antes de usarlas se las activó por calentamiento en la estufa a 110-120°C de 30 a 60 min. Este lavado no se puede efectuar en las placas comerciales.

V. 2. 2. Elución de los lípidos de las placas de sílice

Se realizó utilizando los solventes: cloroformo:metanol:agua, 1:2:0,8, ó cloroformo:metanol, 2:1, para lípidos neutros. El procedimiento fue el siguiente: las zonas con reacción positiva al Iodo se rasparon y el material se recogió en tubos de ensayo (16 x 150 mm.) a los que se les agregó el solvente de extracción. Se agitaron 2-3 min. en "vortex" y se los dejó reposar toda la noche. Luego de ello se centrifugó (2000 rpm) y el precipitado se reextrajo dos veces de la misma manera. Los sobrenadantes fueron sometidos a una partición tipo Folch y la fase inferior obtenida se secó bajo flujo a N₂ y se las

resuspendió luego en C:M,2:1, para su posterior análisis.

V. 2. 3. Solventes para cromatografía en capa delgada

1) Generales para glico y fosfolípidos

Cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. (282) (290)

Cloroformo:metanol:agua, 60:25:4.

Cloroformo:metanol:agua, 60:35:8. (283)

Cloroformo:metanol:NH₄OH 2,5 M, 60:35:8. (284)

Cloroformo:metanol, 9:1. (4)

2) Generales para lípidos neutros

Eter isopropílico: éter de petróleo (30-65°C), 1:4. (58)

Diclorometano. (285)

3) Especiales para esterilglicósidos y cerebrósidos

Cloroformo:metanol:borato de amonio 1% en agua, 5:4:1.

Cloroformo:acetona:piridina:amoníaco 20%:agua, 20:30:60:2:2.(286)

Cloroformo:metanol:ácido acético:agua, 65:12:30:2.

4) Especial para ceramidas y esfingosinas.

Cloroformo:metanol:agua:amoníaco 48:14:1:1. (287)

5) Especial para sulfátidos

Cloroformo:metanol:amoníaco, 66:30:5. (289)

Cloroformo:metanol:acetona:ácido acético:agua,10:2:4:2:1.(290)

V. 2. 4. Revelado de los lípidos

---Iodo. Es específico para enlaces insaturados. Los lípidos saturados también se colorean pero menos intensamente. Se utilizó en las cromatografías en capa delgada. Las placas se sometieron a vapores de Iodo en un desecador o cuba de vidrio.

---Fluorescamina.(291) Es específico para aminas primarias. Normalmente esta técnica se usa para dosar proteínas. En este caso sirvió para el reconocimiento de las bases aminadas de cadena larga, ya que la reacción de fluorescencia se produce con el grupo amino. Las placas se rocían primero con solución de buffer fosfato 0,2 M, pH 8,6 y luego con una solución de fluorescamina en acetona (30 mg/100ml). Bajo la lámpara de luz ultravioleta, las esfingosinas y/o sus derivados se ven de color verde manzana.

---Resorcinol-HCl. Sirve para teñir gangliósidos que dan color azul violáceo (276). A 80 ml. de ácido clorhídrico que contiene 0,5 ml. de CuSO_4 0,1 M (2,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua) se le agregan, 4 hs. antes de usar, 10 ml de una solución de resorcinol al 2 %, esta mezcla se lleva a 100 ml con agua. Se rocía la o las placas de silicagel con esta solución y después se la cubre con otra placa de vidrio y se la calienta a 120°C.

---Ninhidrina. Este método se utilizó también para detectar esfingosinas o sus derivados por reacción de coloración con los grupos amino de estas bases. Se preparó una solución de ninhidrina 0,2 % en acetona:piridina, 9:1, con la que se rociaron las placas. Estas fueron luego calentadas a 110°C por 5-10 min. (144).

---Orcinol Por acción del ácido sulfúrico caliente, las hexosas se deshidratan produciendo α -hidroximetil furfural (inestable) que se condensa con el 3,5 dihidroxitolueno (orcinol) dando un compuesto coloreado. Se utilizó esta técnica para diferenciar los glicolípidos de otros lípidos en las cromatografías en capa delgada. Las placas fueron rociadas con una solución de 200 mg. de orcinol disueltos en una mezcla de ácido sulfúrico concentrado:agua, 3:1, que se guardó en frasco oscuro hasta seis meses sin perder efectividad. Luego de rociadas, las placas se calentaron en estufa a 90-100°C por no menos de 15 min. La coloración varió de lila a violeta según el glicolípido, (293).

---Acido sulfúrico 50%. Esta técnica, desarrollada por Heftmann y col. (294), sirvió para detectar la presencia de materia orgánica, utilizándose en el caso de esteroides extraídos de los esterilglicósidos o aún de los mismos esterilglicósidos intactos. Las placas de silicagel donde fueron cromatografiados los esteroides fueron rociadas con ácido sulfúrico al 50 % y colocadas inmediatamente después sobre una plancha caliente a 78-80°C.

A partir de ese momento y con ayuda de un cronómetro se determinó el tiempo en que tardan las manchas en aparecer, el color que presentan al aparecer, el color al cabo de 10 min. de calentamiento y finalmente se las observa a 365 nm al ultravioleta y se determina la fluorescencia que presentan.

V. 2. 5. AUTORADIOGRAFIA

Para llevarlas a cabo se utilizaron placas radiográficas X-OMAT R y S de Kodak que se cortaron en la oscuridad del tamaño de las placas de silicagel (20 x 20 cm) y se sujetaron a éstas con cinta durex. El conjunto así armado se colocó en un chasis para radiografías y se dejó durante el tiempo deseado también en la oscuridad.

Revelado:

Las láminas radiográficas se separaron de las placas de sílica y se colocaron durante aproximadamente 1 ó 2 min. en el líquido revelador, Romek Universal, dilución 1:2. Una vez cumplido el plazo, las placas se pasaron por una solución de ácido acético 2 % durante 25 seg. y luego se fijaban en el líquido apropiado, (Romfix, de Romek), durante unos 9 min. aproximadamente. Finalmente las placas se lavaron con agua destilada antes de dejarlas secar al aire. Es importante destacar que el tiempo del revelado depende del intervalo que toma la aparición

de las manchas radiactivas sobre el fondo gris de la placa.

V. 3. Cromatografía en papel

Se la utilizó para identificar monosacáridos, fué de tipo descendente y se utilizó papel Whatman nº 1.

V. 3. 1. Solvente: Butanol:piridina:agua, 6:4:3. (295).

V. 3. 2. Revelado de los monosacáridos

Se utilizó el reactivo de nitrato de plata alcalino (296) y sus modificaciones (297). El grupo aldehído de los monosacáridos reduce a la plata y ésta precipita en medio alcalino. La técnica consiste en pasar la tira de papel a revelar por una cubeta que contiene la solución de nitrato de plata 1 % en acetona, una sola vez. La tira se deja secar al aire y luego se vuelve a pasar por una cubeta que contiene NaOH 0,5 N en etanol. Las manchas aparecen marrones sobre el fondo castaño del papel. Sumergiendo la tira en una solución de tiosulfato de sodio al 5 % las manchas se fijan y el fondo se aclara totalmente.

V. 4. Cromatografía gaseosa. Espectrometría de masa.

Se utilizó para identificar los componentes azúcar, ácidos grasos y esfingosinas o sus derivados de los glicoesfingolípidos aislados de Neurospora crassa.

La identificación de los azúcares se realizó en el Instituto, pero los metilésteres de ácidos grasos y las esfingosinas fueron analizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, gracias a la gentileza del Dr. Eduardo G. Gros y su equipo de colaboradores.

Para llevar a cabo estos análisis se usaron los productos de las hidrólisis ácidas o de las metanólisis descritas en el ítem de Degradación Química.

V. 4. 1. Análisis del componente azúcar.

La fracción acuosa obtenida a partir de la metanólisis del glicoesfingolípido fue liofilizada y analizada por cromatografía gaseosa. Se eligió la metanólisis en lugar de la hidrólisis ácida dado que la formación de metil-glicósidos en el C-1 hace a los azúcares más estables.

Los reactivos fueron preparados de la siguiente manera:

1-Metanol anhidro: el metanol comercial se destiló a reflujo con iodo y magnesio metálico y fue guardado en botellas con tapón de vidrio (292).

2-HCl (gas) metanólico: el gas clorhídrico se generó por gotas de ácido clorhídrico sobre ácido sulfúrico concentrado.

El gas se circuló a través de una trampa de CaCl_2 anhidro y se recogió directamente en metanol anhidro. En el momento de usarlo se diluyó a 0,75 N. (292).

3-Metanólisis: como fue descrita.

4-Derivatización de los metil-glicósidos.

El material liofilizado fué disuelto en 0,05 ml de piridina anhidra con suave agitación y se lo sililó según la técnica de Clamp y col. (292) agregándole 5 μl . de la mezcla sililante (piridina:Hexametildisilazano: trimetilclorosilano, 3:5:2) y se agitó fuertemente.

5-Aparato utilizado y condiciones de la cromatografía.

Los azúcares así derivatizados fueron analizados en un sistema de doble columna de vidrio, de 1,80 m. x 2 mm. de diámetro interno, una de ellas de referencia, empaquetadas con 3 % de sílica SE 30 montadas sobre un soporte de Anakron ABS (80-90 mesh) con N_2 , (30 ml/min.) como gas portador. Se utilizó un aparato Packard modelo 7400 equipado con un detector de ionización de llama, FID. La temperatura de la columna fué programada a 4 $^{\circ}$ /min. de 140 a 250 $^{\circ}$ C. La temperatura del inyector y del detector fué de 260 $^{\circ}$ C.

V. 4. 2. Análisis del componente ácido graso

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se aislaron de

la fracción hexano obtenida luego de la metanólisis o hidrólisis. Los ácidos grasos fueron disueltos en éter etílico y tratados con una solución etérea de diazometano (277) hasta que el color amarillo se estabilizó en la solución. Luego de 1 h. a temperatura ambiente, se eliminó el diazometano residual con corriente de N_2 y el residuo se redisolvió en éter isopropílico para su análisis posterior.

Aparatos utilizados y condiciones de la cromatografía.

a-La cromatografía gaseosa se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5830 con detector de ionización de llama. Las columnas usadas fueron de vidrio de 1,80 m x 2 mm de diámetro interno rellenas con DGS (dietilenglicol succinato) al 15 % sobre un soporte de Chromosorb W-AW-DMCS (60-80 mesh). Las condiciones de la cromatografía fueron: temperatura del inyector: 250°C, temperatura del detector: 250°C. El programa fue fijado a 10°C/min. desde 70°C hasta 200°C. El gas portador fue N_2 a 20 ml/min.

b-La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa se realizó en un sistema de cromatógrafo gaseoso Varian modelo 1440 y espectrómetro de masa Varian-Mat modelo CH-7A, comandado por una computadora Varian-Mat Data System 166.

La cromatografía se hizo en columnas de vidrio de 2 m x 2 mm de diámetro interno rellenas con DGS al 15% sobre Chromosorb W-AW-DMCS. La temperatura del inyector fue 260°C. La programación fue a 10°C/min. desde 70°C hasta 200°C. El gas portador fue Helio a 20 ml/min, utilizándose un separador de Helio modelo Watson-Biemann de dos etapas a 200°C.

La fuente iónica del espectrómetro de masa operó a 200°C con un potencial de 70 eV y 1 mA de emisión, mientras que la temperatura del detector de corriente iónica fue de 200°C con un potencial de 19 eV y 0,2 mA de emisión. El barrido fue de 40 a 900 unidades de masa y la velocidad del mismo fue de 19 espectros por minuto.

V. 4. 3. Análisis del componente esfingosina

Los productos de la hidrólisis ácida que se extrajeron con cloroformo fueron secados bajo presión de N₂ y se transfirieron a viales de sililación, resuspendiéndolos en 5 µl de piridina anhidra. La extracción se repitió dos o tres veces para lavar bien las paredes del tubo original y se secó con N₂.

Las muestras de Neurospora junto con muestras patrones de esfingosina, dihidroesfingosina y fitoesfingosina fueron sililadas por tres métodos diferentes.

1) Las muestras resuspendidas en 5 μ l de piridina anhidra fueron sililadas con una mezcla de hexametildisilazano:trimetilclorosilano, 2:1 y se las calentó durante 30 min. a 100°C.. Mediante este procedimiento sólo se sililan los grupos OH⁻ de las esfingosinas. (292). Por otro lado se usaron dos métodos alternativos con objeto de sililar también los grupos amino de las esfingosinas.

2) Las muestras resuspendidas en 5 μ l de piridina anhidra fueron sililadas con una mezcla de N,O- bis (trimetil-silil-trifluoracetamida y trimetilclorosilano) en proporción 10:1 y se dejaron 24 hs. a temperatura ambiente. Este procedimiento se usa comunmente para esteroides y es una modificación de otros métodos (299), (300), (301), (302), (303).

3) Se usó una mezcla de N,O-Bis (trimetilsilil-trifluor-acetamida) con piridina en proporción 2:1 y se dejaron las muestras 10 min. a temperatura ambiente (144).

Aparato utilizado y condiciones de la cromatografía gaseosa-espectrometría de masa.

El aparato utilizado fué el mismo con el que se analizaron los ácidos grasos.

La cromatografía se efectuó en columnas de vidrio de 1,80 m x 2 mm. de diámetro interno rellenas con OV-101 al 2 % sobre

Chromosorb-W-AW-DMCS (60-80 mesh). La programación fué a 10°C/min. desde 90 a 280°C. El gas portador fue Helio a 12 ml/min. El separador de Helio fue un modelo Watson-Biemann de dos etapas a 260°C.

La fuente iónica del espectrómetro de masa operó a 200°C con un potencial de 70 eV y la emisión fue de 1 mA., mientras que la temperatura del detector de corriente iónica fué de 200°C con un potencial de 22eV y una emisión de 600µA. El barrido de cada espectro fué de 40 a 800 unidades de masa y la velocidad de barrido fue de 18 espectros por minuto.

Programa "Search"

Los espectros de masa de las señales de los cromatogramas de las muestras incógnita fueron normalizados y codificados por computadora. Esos espectros codificados (Programa ENCO 0) fueron comparados por la computadora (Programa Search) contra los espectros de patrones grabados en memoria magnética. (disco y/o cinta).

VI. REACTIVOS

Los materiales empleados en los experimentos de esta tesis se obtuvieron de los siguientes lugares: C¹⁴ Glucosa y NaS³⁵O₄ de New England Nuclear. Los solventes tales como cloro-

formo, acetona y metanol, todos reactivos proanálisis fueron comprados en Sintorgan o Merck. El ácido silícico era Unisil (100-200 mesh), ha sido obtenido de Clarkson Chemical Co. La silicagel G Tipo 60 según Stahl y las placas comerciales sobre base de vidrio sin indicador fluorescente, fueron de Merck (5721/0025) o de Eastman Kodak. Las placas radiográficas fueron Kodak (X-OMAT R y S). Los patrones de glicolípidos tales como hematósidos GM₃, glucocerebrósidos, esterilglucósidos, sulfátidos, esfingosina, dihidroesfingosina y fitoesfingosina se compraron en Supelco. Los reactivos de sililación tales como hexametil disilazano, trimetilclorosilano, N,O-bis (trimetilsilil-trifluor acetamida) fueron de Pierce.

Los gangliósidos de cerebro de embrión de pollo, los sulfogalactoglicerolípidos de testículo de rata y sulfátidos de cerebro de rata fueron preparados en nuestro laboratorio siguiendo el mismo método de extracción y purificación que se usó para Neurospora crassa.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Curva de crecimiento

En la figura 21 se muestran los resultados de la curva de crecimiento de la cepa salvaje (WT) de Neurospora crassa obtenida a partir de las condiciones del cultivo establecidas en Materiales y Métodos. Se pueden observar las etapas clásicas del crecimiento de los microorganismos a saber: 1) una fase "lag" de 0 a 12 hs.; 2) una fase logarítmica o "exponencial", 12 a 48 hs. y 3) la fase estacionaria, 48 a 60 hs. (317).

Se resolvió fijar el período de crecimiento del hongo en 43 hs, considerando que, de este modo, al final de la fase exponencial, el rendimiento en material lipídico será máximo.

II. Distribución de los lípidos en las distintas fracciones del extracto lipídico.

La extracción del micelio de N. crassa siguiendo el procedimiento de Folch con cloroformo: metanol, 2:1 y posterior partición con una solución salina da lugar a dos fases, una superior que contiene los compuestos hidrosolubles: (mono y disacáridos, sales y nucleótidos así como lípidos altamente polares) y otra

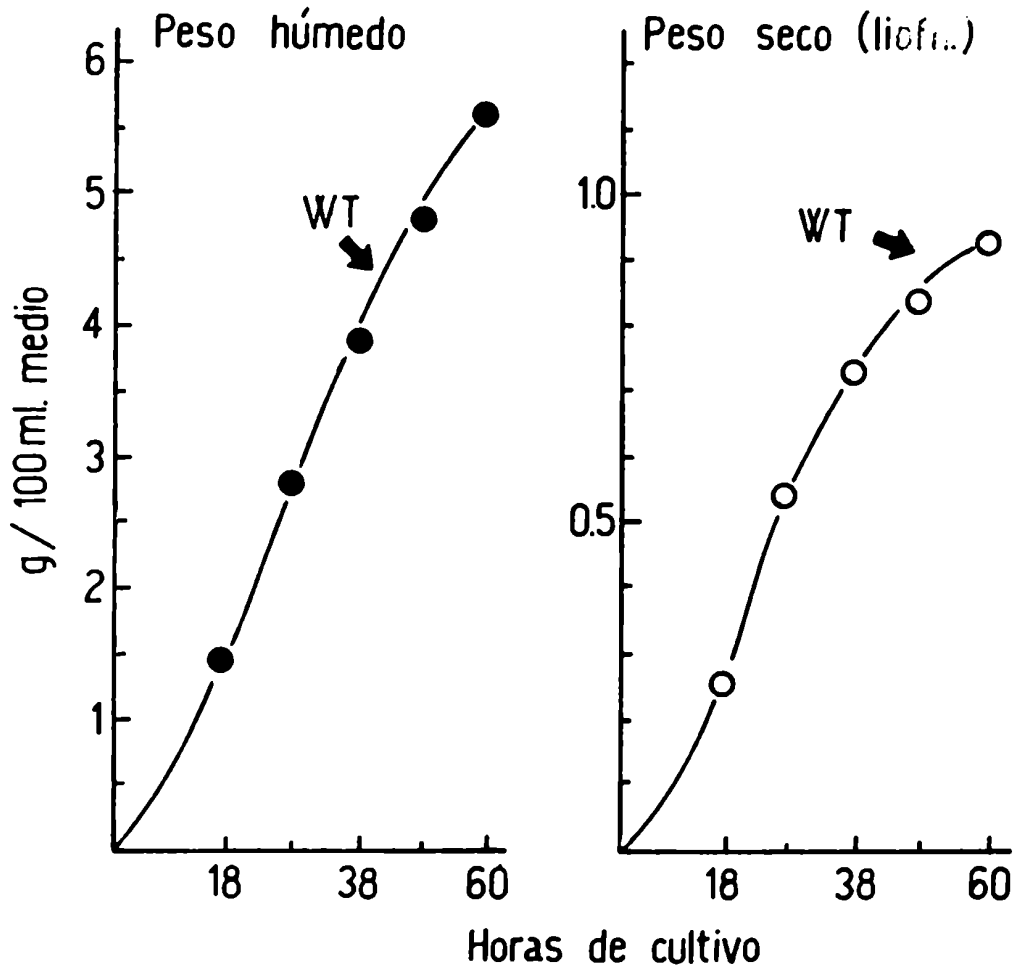


Figura 21: Curva de crecimiento de la cepa salvaje (WT) de Neurospora crassa en función del tiempo de cultivo.

fase la inferior u orgánica, (FI) donde se encuentra la mayor parte de los lípidos. Estos lípidos se pueden clasificar en general en neutros, glicolípidos y fosfolípidos.

II. 1. Fase superior

Las fracciones correspondientes a la fase superior de distintos extractos lipídicos de N. crassa fueron dializadas exhaustivamente contra agua destilada o filtradas por una columna de Sephadex G 25 equilibrada en cloroformo:metanol:agua, 60:30:4,5, para eliminar todos los compuestos hidrosolubles pequeños tales como sales, péptidos, azúcares, nucleótidos, aminoácidos, etc. Las fracciones no dializables o el extracto retenido en la columna de Sephadex que fue eluído con cloroformo:metanol:agua, 60:30:4,5, se resuspendieron en cloroformo:metanol, 1:1 y se cromatografiaron en placas de silicagel G preparadas en el laboratorio. Los solventes elegidos fueron cloroformo:metanol:agua, 60:35:8, y cloroformo:metanol:agua 60:35:8 (NH₄OH 10%). Se usó la coloración de orcinol:sulfúrico, específica para azúcares y de resorcinol:clorhídrico que es específica para gangliósidos. Todos los resultados fueron negativos en cuanto a la existencia de gangliósidos, dado que se observaron manchas que reaccionaron con el reactivo de orcinol pero no con el de resorcinol. (Fig. 22).

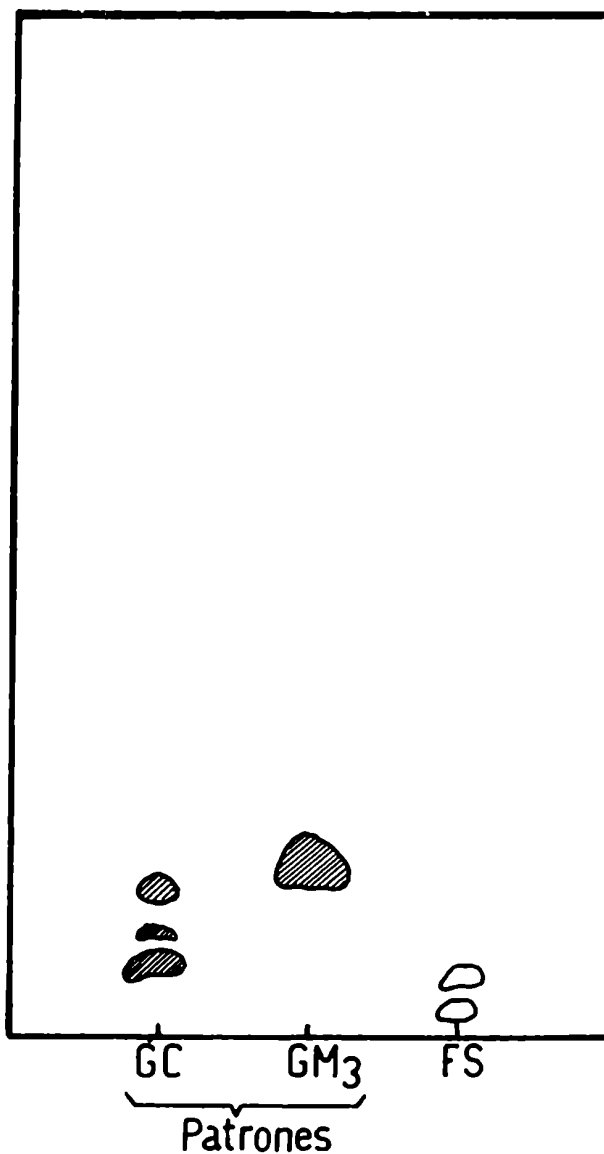


Figura 22: Cromatografía en capa fina de la fase superior (FS) del extracto lipídico de Neurospora crassa. Patrones: GC=gangliósidos totales de cerebro y G_{M3} = hematósido. Solvente: cloroformo:metanol: agua (NH₄OH 10%),60:35:8. Coloración:resorcínol-clorhídrico (manchas oscuras) y orcinol-sulfúrico.

Esto no llama la atención dado que los gangliósidos se encuentran exclusivamente en tejidos animales, en particular en organismos pertenecientes al Phylum Chordata (304). Entre los Invertebrados sólo se ha detectado su presencia en las gametas de equinodermos (305).

II. 2. Fase inferior

II. 2. 1. Cromatografía en ácido silícico

La fase inferior de la extracción de Folch se fraccionó en columna de ácido silícico de acuerdo a la metodología descrita.

La fig. 23 muestra el resultado de la cromatografía en capa fina de las distintas fracciones obtenidas de la columna.

En la fracción clorofórmica pudieron reconocerse por coincidencia de movilidades con los patrones utilizados, la existencia de los siguientes lípidos: escualeno, geranil-geraniol, carotenoides, ácidos grasos libres y esteroides libres. Estos resultados coinciden con los ya publicados por Kates y col. (266).

En la fracción metanólica aparecen manchas que se tiñen con anisaldehído o con I_2 , pero no con orcinol y cuyo R_f coincide con el de los patrones de fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Estos resultados tam-

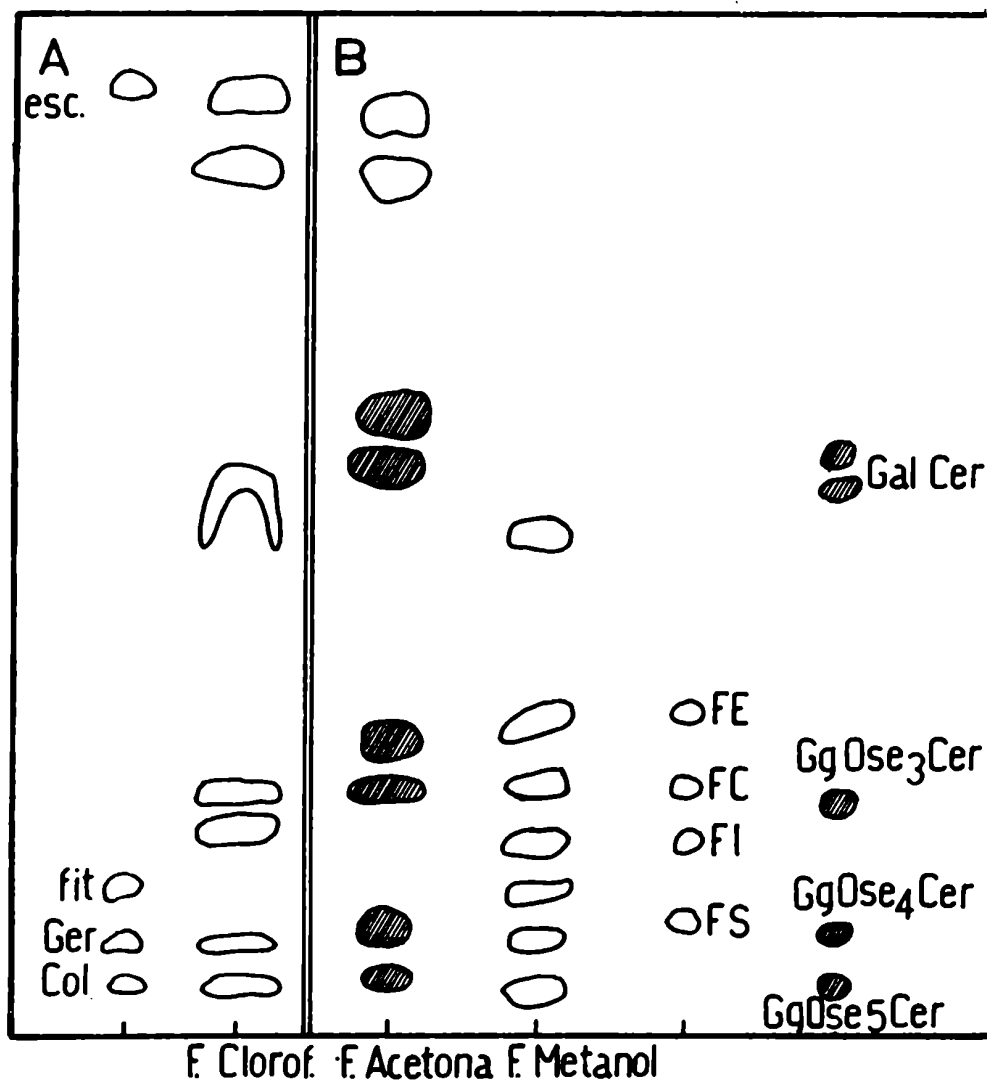


Figura 23: Cromatografía en capa fina de las fracciones eluidas de la columna de ácido silícico. Se usaron placas Merck Nº 5721. Los solventes utilizados fueron: A) éter isopropílico: éter de petróleo, 1:4, para los lípidos neutros (fracción clorofórmica). B) Cloroformo:metanol:agua, 65:25:4, para las fracciones acetónica y metanólica. Coloración: iodo y orcinol-sulfúrico. Las manchas oscuras corresponden a reacciones positivas con este último colorante. Patrones utilizados: esc=escualeno; fit=fitosterol; Ger=geraniol; Col=colesterol; Gal Cer=galactosilceramida bovina; GgOCer=trihexosiceramida; GgOse4Cer=tetrahexosiceramida; GgOse5Cer=pentahexosiceramida; FE=fosfatidil etanolamina; FC= fosfatidil colina; FI=fosfatidil inositol; FS=fosfatidil serina.

bién coinciden con los publicados por Kates (266) y Lester (306).

Por otra parte, en la fracción acetónica se pudo observar la existencia de sustancias con reacción positiva al orcinol, lo que indicó la presencia de glicolípidos en dicha fracción. En general las manchas aparecían contaminadas por sustancias que revelaban con iodo pero no con orcinol y cuyas movilidades coincidían con los patrones de fosfolípidos. Por esta razón, en lo sucesivo, la fase inferior de la extracción de Folch se saponificó y además se agregaron solventes de elución intermedios como la mezcla de cloroformo:acetona, 1:1 y acetona:metanol, 1:1, para obtener una mejor resolución de las distintas fracciones obtenidas de las columnas de ácido silícico. De tal forma, como se observa en la fig. 24, la cromatografía en capa fina de las fracciones de la columna de ácido silícico, indica que en la fracción cloroformo:acetona, 1:1; acetona y acetona:metanol, 1:1; aparecen sustancias con reacción positiva al orcinol que coinciden perfectamente con la tinción de iodo, mientras que en la fracción metanólica prácticamente no se detectan fosfolípidos.

Con el solvente cloroformo:acetona, 1:1 eluye el 90% de estos glicolípidos insaponificables que presentan una movilidad semejante a la de los cerebrósidos patrones, mientras que en acetona y acetona:metanol, 1:1 aparece el 10% restante de estos glicolípidos que parecen ser más polares que los anteriores ya

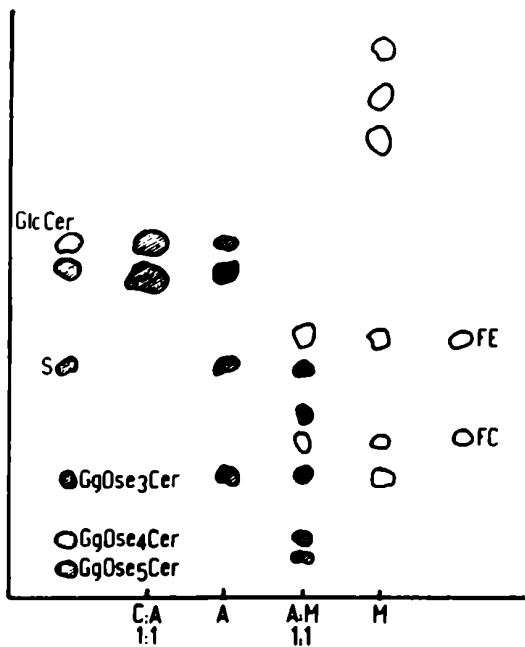


Figura 24: Cromatografía en capa fina de la fase inferior de la extracción de Folch saponificada y eluída en columna de ácido silícico. Fracciones: C:A, cloroformo:acetona, 1:1; A: acetona; A:M, acetona:metanol, 1:1; y M, metanol. Solvente: cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. Coloración: iodo y orcinol-sulfúrico (manchas oscuras). Patrones: S=sulfátidos; GlcCer=glucosilceramida; las restantes referencias están detalladas en la figura 23.



Figura 24:(foto) 1,2=galactosilceramida patrón; 3=cerebrósido bovino; 4=fracción cloroformo:acetona,1:1; 5= fracción acetona; 6,7,8=fracción acetona:metanol,1:1; 9=sulfogalactoglicerolípido de testículo de rata; 10=fase inferior sin saponificar; 11=fosfatidil colina; 12=trihexosiceramida; 13=dihexosiceramida; 14=esterilglucósido y sulfátido patrones.

que permanecen más cerca del origen en el cromatograma y sus movilidades se aproximan más a las de las ceramidas con más de un grupo azúcar.

II. 2. 2. Cromatografía en DEAE celulosa

Como método alternativo de fraccionamiento de la referida fase inferior de la extracción de Folch se utilizó una cromatografía en columna de DEAE celulosa, forma acetato. (ver métodos). En la fig. 25 puede verse la cromatografía en capa fina de los productos obtenidos de las distintas fracciones de dichas columnas y también como desaparecen con la saponificación aquellas sustancias, fosfolípidos, que daban reacción positiva con iodo pero no con orcinol.

Los glicolípidos no saponificables de la fase inferior (FI) se resolvieron en la columna de DEAE en dos grupos, el primero conteniendo el 90% de los glicolípidos eluyó con una mezcla de cloroformo:metanol, 9:1 , mientras que el 10% restante eluyó con una mezcla de cloroformo:metanol, 7:3

Comparando los resultados se puede ver que los productos de elución en cloroformo:acetona de la columna de ácido silícico fueron aparentemente los mismos que los que eluyeron con cloroformo:metanol, 9:1 de la columna de DEAE. Del mismo modo todos aquellos glicolípidos que eluyeron con acetona o acetona:

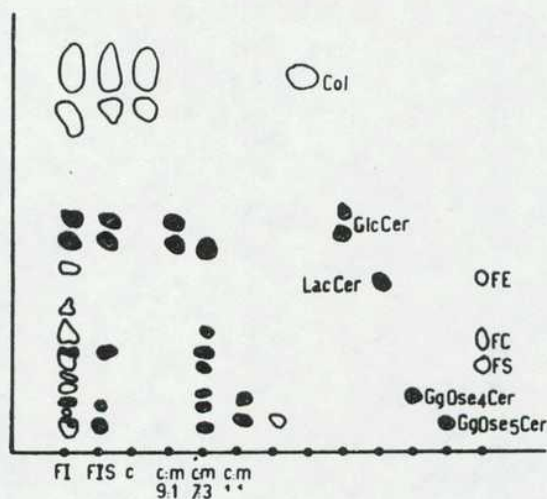
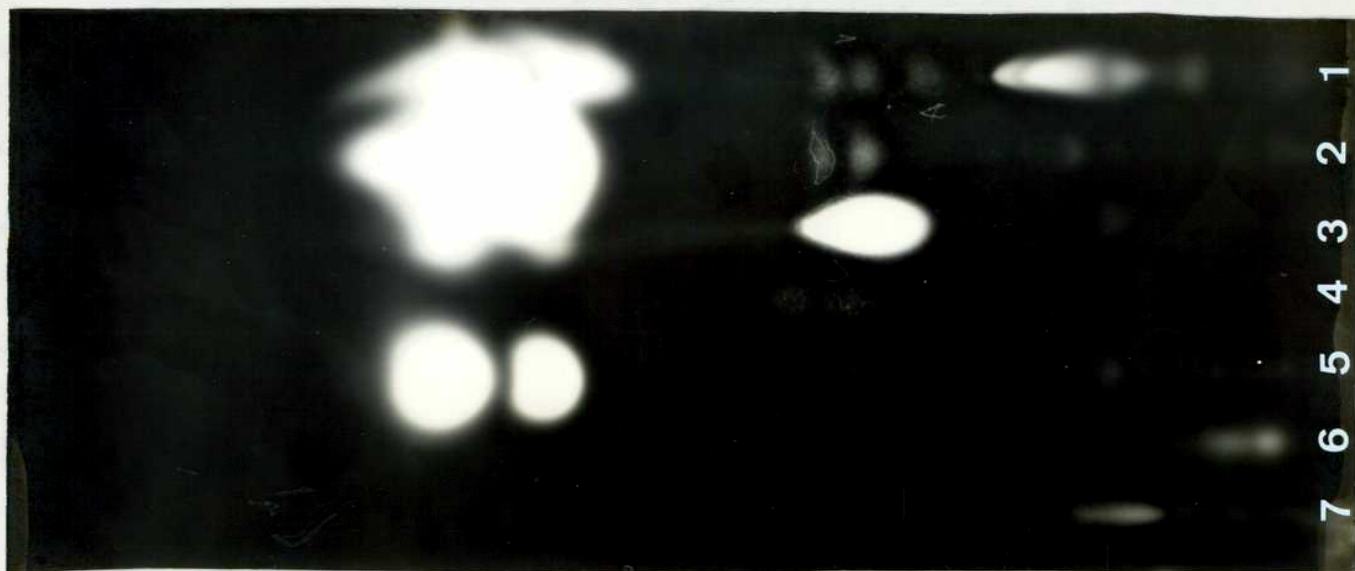


Figura 25: Cromatografía en capa fina de la fase inferior de la extracción de Folch saponificada y cromatografiada en una columna de DEAE celulosa. Solvente:cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. Coloración:iodo y orcinol-sulfúrico (manchas oscuras). FI=fase inferior total; FIS= fase inferior saponificada; c= fracción clorofórmica; c:m,9:1= fracción cloroformo:metanol, 9:1; c:m,7:3= fracción cloroformo:metanol, 7:3; Col=colesterol. LacCer=lactosilceramida. Las restantes referencias están detalladas en las figuras anteriores.

Foto: 1=fase inferior total; 2=fase inferior saponificada; 3=fracción cloroformo:metanol, 9:1; 4=cerebrósido patrón; 5=fracción cloroformo:metanol, 7:3; 6= tetra y pentahexosiceramidas patrones; 7= fosfatidil colina.

metanol del ácido silícico son equivalentes o similares a los que eluyeron con la fracción 7:3 de la columna de DEAE.

Sobre la base de estos resultados puede inferirse que en el micelio de Neurospora crassa existen compuestos con características similares a los cerebrósidos y a glicosfingolípidos de longitud de cadena hidrocarbonada creciente. Estos compuestos presentan una reacción positiva con el orcinol, no se destruyen por saponificación y su movilidad cromatográfica es similar a la de glicosfingolípidos patrones provenientes de células de mamíferos.

III. Purificación de las fracciones que contienen glicolípidos

La separación y purificación de los distintos glicosfingolípidos del micelio de *Neurospora* existentes en las fracciones obtenidas de las columnas de ácido silícico y DEAE celulosa se realizó por recromatografía en columnas de ácido silícico o en placas preparativas de silicagel.

III. 1. Cromatografía en ácido silícico

Los glicolípidos fueron purificados en columnas de ácido silícico eluidas con gradientes lineales de metanol en cloroformo. De tal modo, los glicosfingolípidos que habían eluido

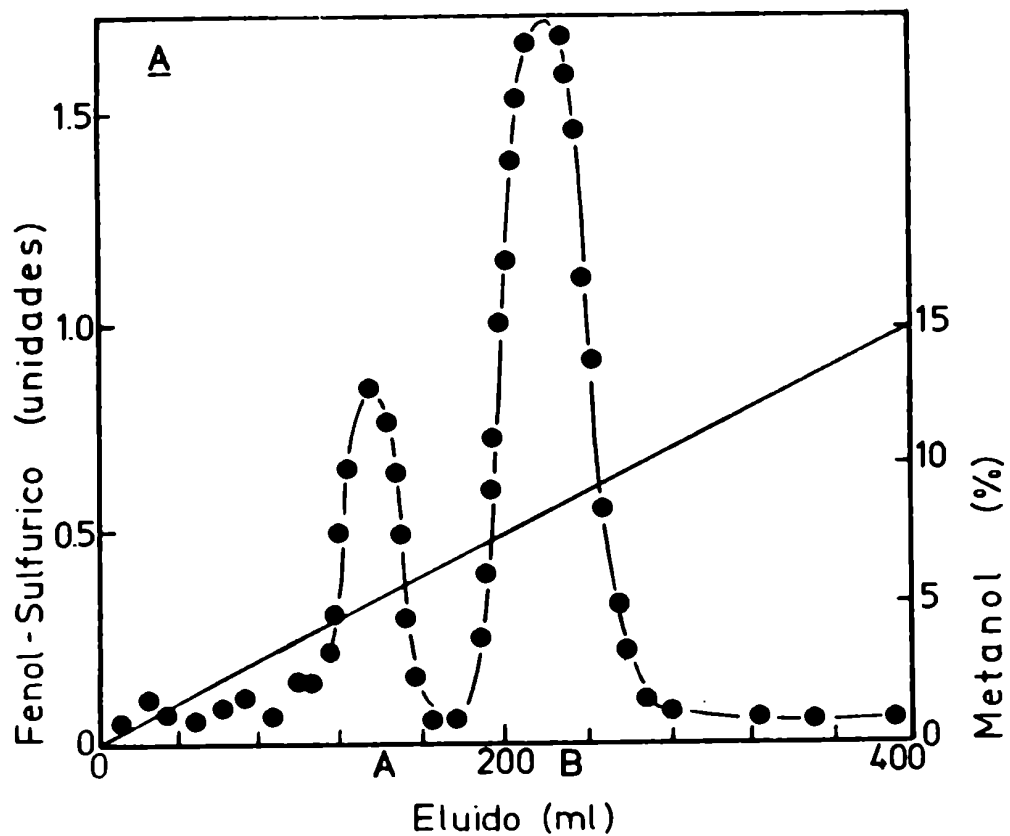


Figura 26: Perfil de elución de los glicolípidos mayoritarios de *Neurospora crassa*. La columna de ácido silícico fue eluída con un gradiente lineal de metanol en cloroformo 0— 15 %. Vol.total=400 ml. Fracciones=3 ml. cada una. Fracción eluída= cloroformo:acetona,1:1, ó cloroformo:metanol,9:1.

de las columnas de ácido silícico y de DEAE celulosa con las mezclas de cloroformo:acetona, 1:1 y de cloroformo:metanol, 9:1 respectivamente, fueron recromatografiadas en una columna de ácido silícico, eluida con un gradiente continuo entre 0 y 15% de metanol en cloroformo. El perfil de elución se puede ver en la fig. 26. Se obtuvieron dos picos que se detectaron por el método del fenol-sulfúrico. El pico A eluyó con 6% de metanol y el pico B con 9-10% de metanol.

Por otro lado en la fig. 27 se observa el perfil de elución, en una recromatografía en ácido silícico de las fracciones acetona y acetona:metanol, 1:1, o cloroformo:metanol, 7:3, (ácido silícico o DEAE celulosa, respectivamente). En este caso el gradiente elegido fue entre 0 y 60% de metanol en cloroformo, como puede apreciarse aparecen entre 3 y 5 picos que eluyen con alrededor de 25,35 y 50% de metanol y dan reacción positiva con el método del fenol-sulfúrico.

III. 2. Cromatografía preparativa en capa fina

Las placas de silicagel G fueron preparadas en el laboratorio con un espesor de 0,5 mm.. Se efectuaron varios desarrollos sucesivos con el solvente cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. La placa una vez desarrollada se cubrió con otra placa de vidrio de forma tal que la mayor parte de lo sembrado quedó cubierto

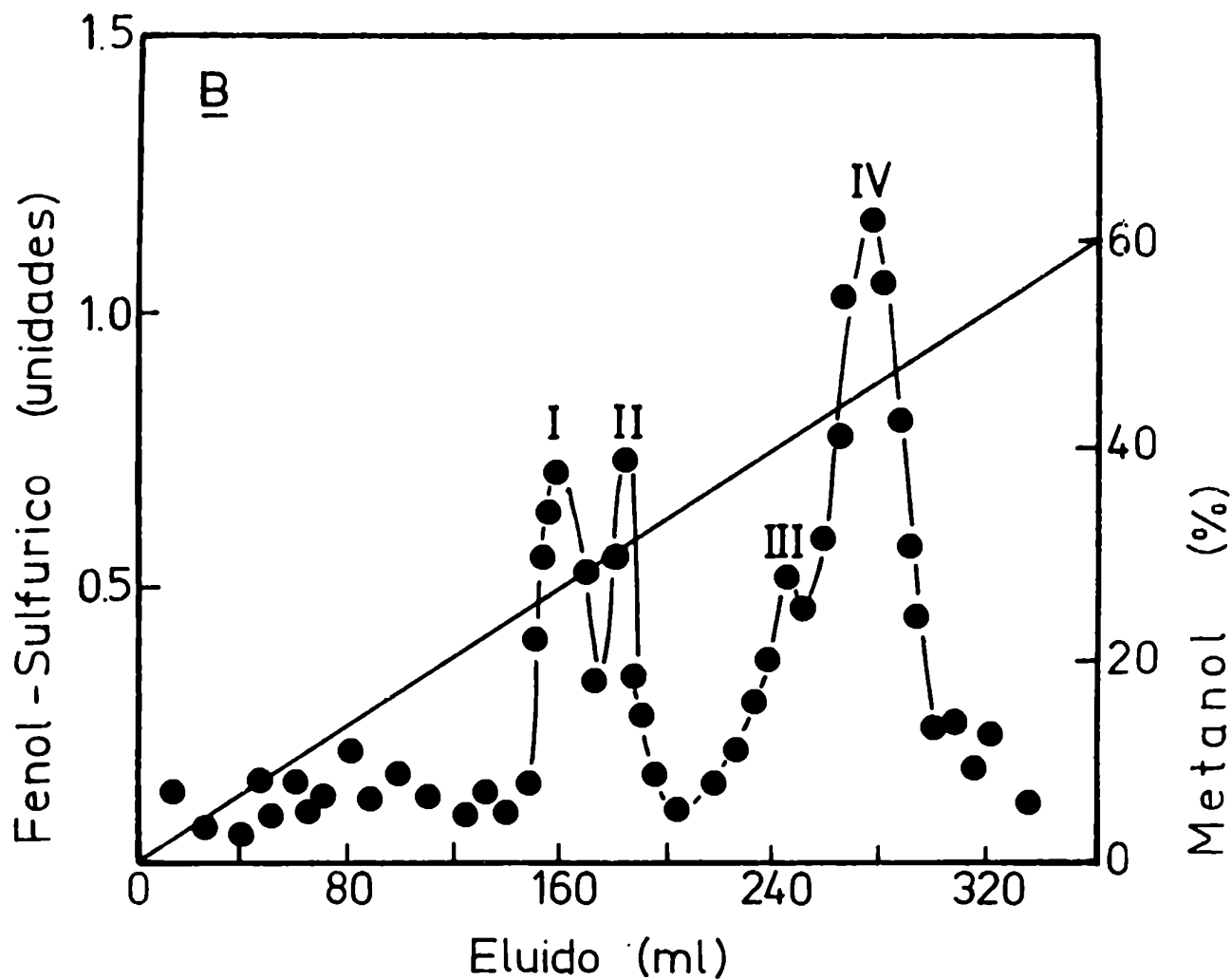


Figura 27: Perfil de elución de los glicolípidos con más de un azúcar de *Neurospora crassa*. La columna de ácido silícico fue eluída con un gradiente lineal de metanol en cloroformo 0—60%. Vol. total=400 ml. Fracciones=3 ml. cada una. Fracción eluída= acetona y acetona:metanol, 1:1 o cloroformo:metanol, 7:3.

excepto en los bordes que al ser coloreados con iodo o con orcinol permitió ubicar las distintas bandas de glicolípidos. Los lípidos se extrajeron de la sílica del modo ya descrito en materiales y métodos.

La figura 28 muestra las cromatografías en capa fina de los productos obtenidos con este método de purificación. Los productos dan reacción positiva con el orcinol y sus movilidades coinciden con la de los patrones.

IV. Cerebrósidos

De todo lo visto hasta el momento puede decirse que los componentes mayores entre los glicolípidos no saponificables de Neurospora crassa son sustancias con características cromatográficas similares a los cerebrósidos o monohexosiceramidas.

A continuación se presentan los resultados que confirman la existencia de estos compuestos en el hongo y también un análisis de la estructura de los mismos.

IV. 1. Cromatografía en capa fina en distintos solventes

La primera evidencia de que estos glicolípidos podían ser cerebrósidos la dió el hecho de que en las cromatografías en capa fina corridas en distintos solventes, siempre cocromatografiaban con la glucosilceramida patrón.

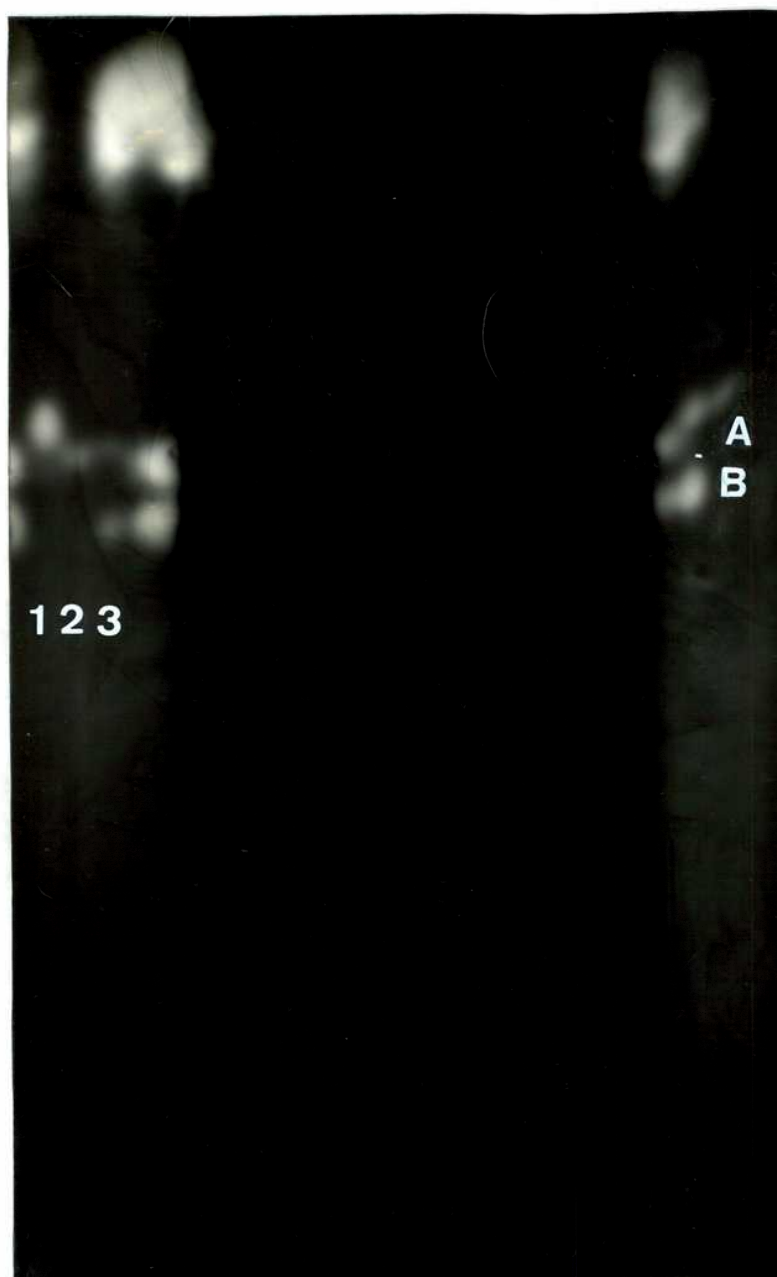


Figura 28: Foto: Cromatografía preparativa de la fracción cloroformo: acetona, 1:1, de la columna de ácido silícico. 1=esterilglucósido patrón; 2=cerebrósido bovino; 3=fracción cloroformo:acetona, 1:1. A y B= cerebrósidos de N.crassa.

La tabla 7 resume los R_f de los cerebrósidos de Neurospora crassa y los de la glucosilceramida patrón, corridos en placas silicagel G de Merck con distintas mezclas de solventes.

TABLA 7

Movilidad cromatográfica de cerebrósidos en distintos solventes

SOLVENTE	Glc-Cer patrón	Gal-Cer bovina	<u>cerebrósidos Neurospora crassa</u>
cloroformo:metanol:agua	0,58	0,47	0,58
65 : 25 : 4	0,60	0,53	0,60
cloroformo:metanol	0,11	0,15	0,11
90: 10	0,30	0,23	0,30
cloroformo:metanol:agua:amoníaco			
48: 14: 1:1	0,24	0,25	0,24
	0,30	0,27	0,30

Como puede observarse, siempre se identificaron dos componentes con características de monohexosiceramidas que en todos los solventes usados difieren ligeramente en su movilidad cromatográfica. Esto, que ocurre normalmente aún con otros cerebrósidos descritos en la literatura (307) (111) parece deberse a diferencias en la composición de ácidos grasos. La presencia de hidroxiaácidos grasos en el grupo ceramida tiende a modificar la polaridad del mismo en los distintos solventes cromatográficos.

Como se verá más adelante el análisis de la composición de ácidos grasos de los dos cerebrósidos A y B corroboró esta hipótesis.

IV. 2. Hidrólisis alcalina

La estabilidad de la unión glicosídica entre la esfingosina y el monosacárido se corroboró sometiendo a los cerebrósidos a hidrólisis alcalina, según las condiciones descritas en materiales y métodos y cromatografiando los productos de la hidrólisis en capa fina. Los resultados pueden verse en la fig. 29. Como era de esperar no se observó ninguna modificación del compuesto posteriormente a la hidrólisis. En cambio cuando la hidrólisis se realizó durante 72 hs. a 80° C, los cerebrósidos se deacilaron dando un compuesto del tipo esfingosina-glucosa con movilidad de 0,36. (Tabla 17), en el solvente utilizado.

IV. 3. Metanólisis e hidrólisis ácidas

Los productos obtenidos de las metanólisis y/o hidrólisis ácidas de los cerebrósidos fueron analizados separadamente utilizando distintas metodologías.

IV. 3. 1. Caracterización de la fracción glicosídica de los cerebrósidos A y B.

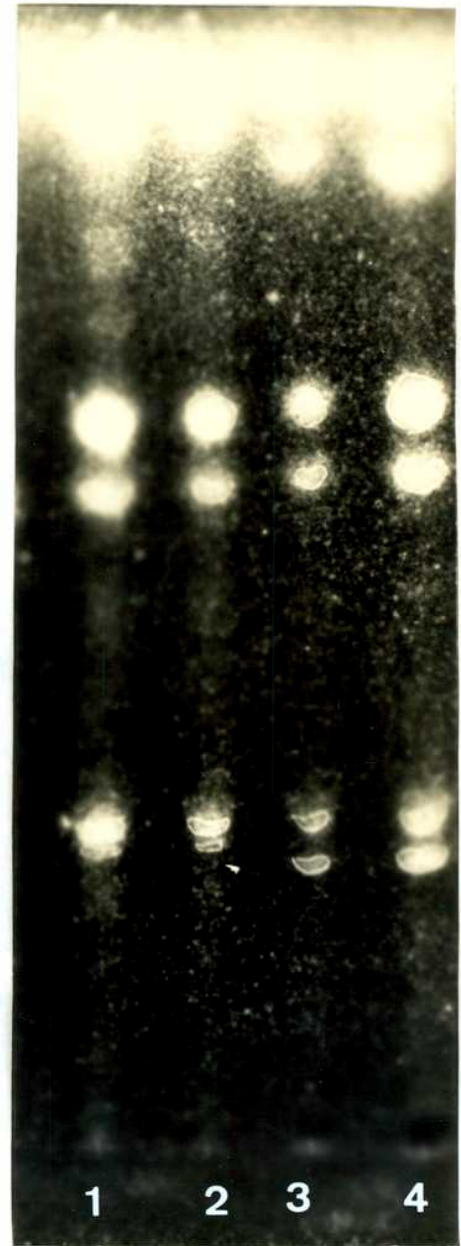
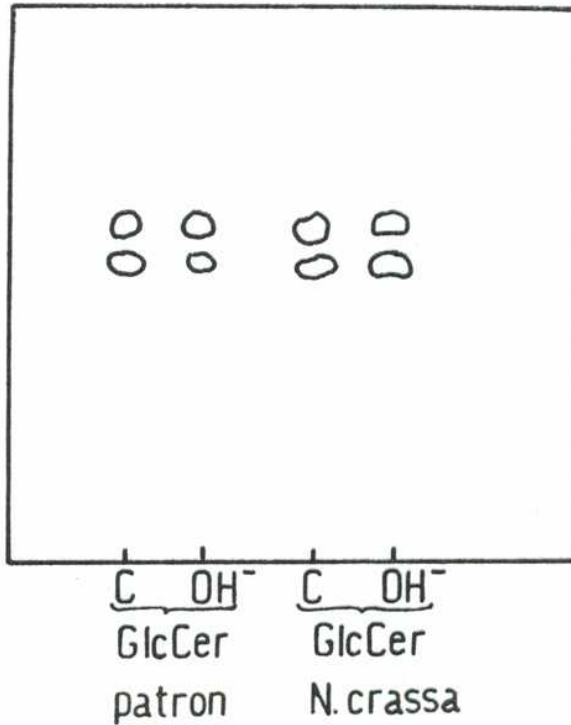


Figura 29: Cromatografía en capa fina de los cerebrósidos de Neurospora crassa sometidos a hidrólisis alcalina. C y OH⁻ corresponden a muestras controles e hidrolizadas respectivamente.

Foto: 1=cerebrósido patrón sin hidrolizar; 2=idem. hidrolizado con KOH 1 N; 3=cerebrósido de Neurospora crassa control; 4=idem. hidrolizado en las mismas condiciones que el patrón.

La fracción acuosa obtenida a partir de la metanólisis y/o hidrólisis ácida de los cerebrósidos fue extraída con piridina para eliminar las sales formadas como subproductos de la hidrólisis y los azúcares así purificados se identificaron por dos métodos distintos.

IV. 3. 1. 1. Identificación del monosacárido por cromatografía en papel.

La cromatografía descendente en papel Whatman Nº 1 usando como solvente butanol:piridina:agua, 6:4:3 y revelada con nitrato de plata mostró como único componente azúcar en ambos cerebrósidos a la glucosa.(Fig. 30).

IV. 3. 1. 2. Identificación de los azúcares por cromatografía gaseosa

En la fig. 31 se observa el perfil de elución de la cromatografía gaseosa del trimetilsilil derivado del metilglucósido del cerebrósido A y del B. Como puede apreciarse aparecieron dos picos que corresponden a α y β metilglucósidos cuyo tiempo de retención es similar al de los patrones utilizados.

Es importante destacar que si bien la galactosa es el componente azúcar más habitual de los cerebrósidos de cerebro y te-

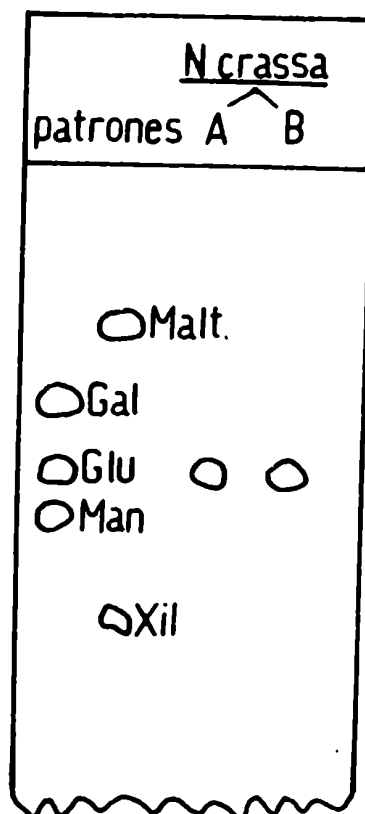


Figura 30: Cromatografía en papel de los monosacáridos que componen los cerebrósidos A y B de N.crassa. Gal=galactosa;Glc=glucosa;Man=manosa;Malt=maltosa; Xil=xilosa. Solvente:butanol:piridina:agua,6:4:3. Coloración:nitrato de plata.Papel:Whatman Nº 1.

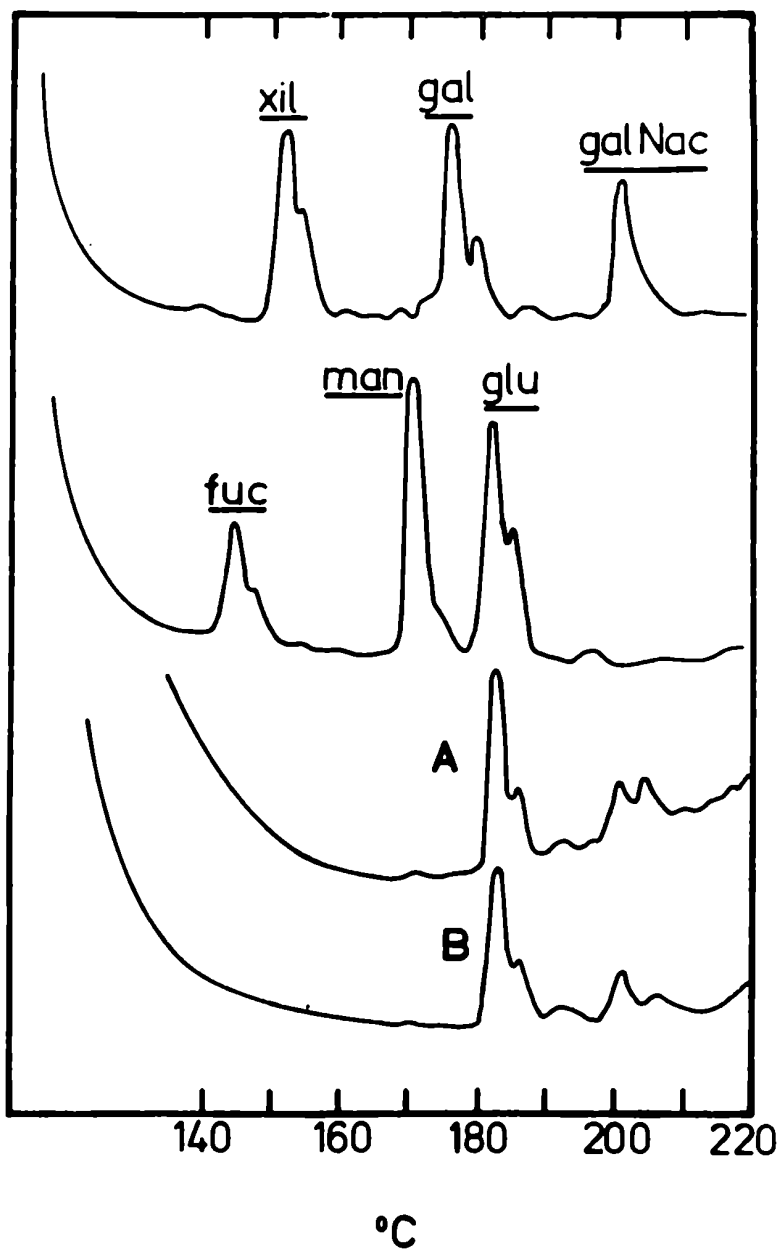


Figura 31: Perfil de la cromatografía gaseosa de los monosacáridos componentes de los cerebrósidos A y B de Neurospora crassa.

jido nervioso en general (316), así como de eritrocitos (115), leucocitos (308), bazo (309) y de espermatozoides del molusco Hyriopsis schlegelli (310), las glucosilceramidas son también componentes comunes de los tejidos animales tales como linfocitos (134), plasma (115), suero (133), la estrella de mar Asterias rubens (311), pulmones en el cerdo (312), leche (313) y de vegetales tales como Phaseolus vulgaris (314) y de la harina de trigo (315).

En aquellos hongos en los cuales se ha estudiado la composición de los cerebrósidos (Tabla 6), la glucosa es también el componente azúcar más frecuente en los cerebrósidos de Fusarium lini (243), Aspergillus oryzae (271), y Fusicoccum amygdali (191) entre los Imperfectos, de Hansenula cifferri (252) entre los Ascomycetes y de todos los Basidiomycetes investigados hasta el momento (307), (250), (253). También posee glucosa el cerebrósido I de Phycomyces blakeesleanus mientras que el II tiene cantidades equivalentes de glucosa y galactosa (243). Por el contrario Aspergillus niger, (251) Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis (249), (136) son los únicos hongos que poseen galactosa como componente azúcar en su cerebrósido.

IV. 3. 2. Caracterización de la fracción lipídica de los cerebrósidos A y B.

IV. 3. 2. 1. Identificación de los ácidos grasos por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa.

El material extraído con hexano, obtenido luego de la metanólisis de los cerebrósidos A y B que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos fue sometido a análisis por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. En la fig. 32 A y B se observan varios picos que corresponden a los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico y oleico del cerebrósido A y de los ácidos hidroxiesteárico e hidroxioleico, así como ácido palmítico, esteárico y oleico en cantidades menores del cerebrósido B. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de los ésteres metílicos de dichos ácidos con patrones cromatografiados en condiciones similares.

La tabla 8 muestra la proporción en que se encuentran estos ácidos en el cromatograma gaseoso.

Tabla 8

Composición de ácidos grasos de los cerebrósidos A y B de N.crassa

Acido	n ^o C: doble enlace	Nomenclatura IUPAC	%	
			A	B
Palmítico	16:0	hexadecanoico	35	23
esteárico	18:0	octadecanoico	41	11
oleico	18:1	?-octadecenoico	24	6.4
hidroxiesteárico	h 18:0	2-hidroxioctadecanoico		43
hidroxioleico	h 18:1	2-hidroxioctadecenoico		15

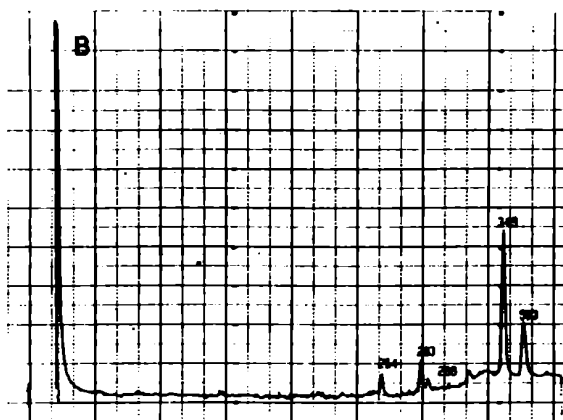
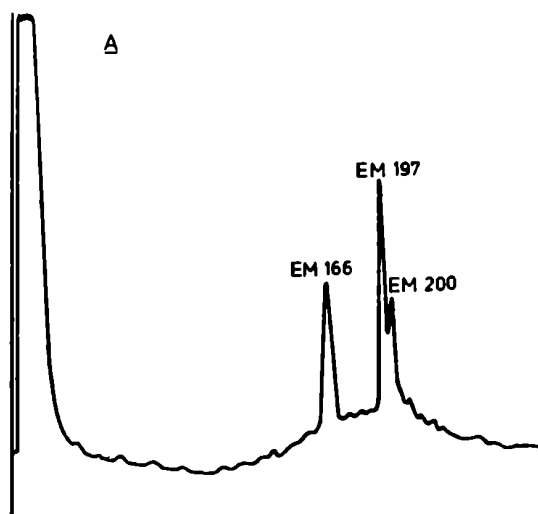


Figura 32: Registro potenciométrico del cromatograma de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que componen los cerebrósidos A y B de Neurospora crassa. A) ésteres metílicos de ácidos grasos del cerebrósido A. B) idem para el cerebrósido B.

Espectrometría de masa

En la figura 33 se observan los espectros de masa (EM) de los ácidos grasos del cerebrósido A. Estos espectros que corresponden a los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico y oleico aparecen indicados como EM 166, EM 197 y EM 200 respectivamente en el cromatograma de la figura 32 A. Los resultados obtenidos se encuentran además sintetizados en la Tabla 9. Los espectros mostraron iones moleculares a m/e 270, m/e 298 y m/e 296 y una alta abundancia del ion m/e 74. Esto indica la existencia de un reordenamiento de los fragmentos donde el H_γ migra a una doble ligadura seguido por una ruptura en β . (318). (Figura 34,a).

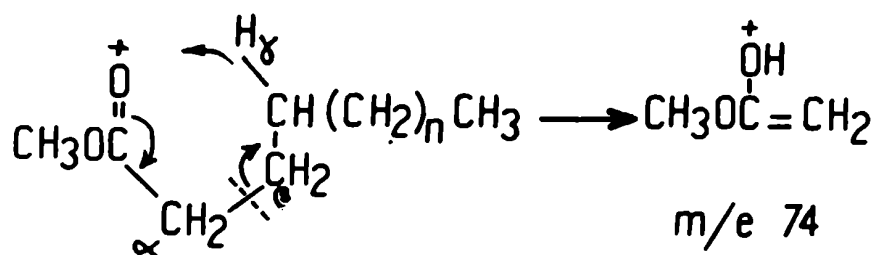


Figura 34,a

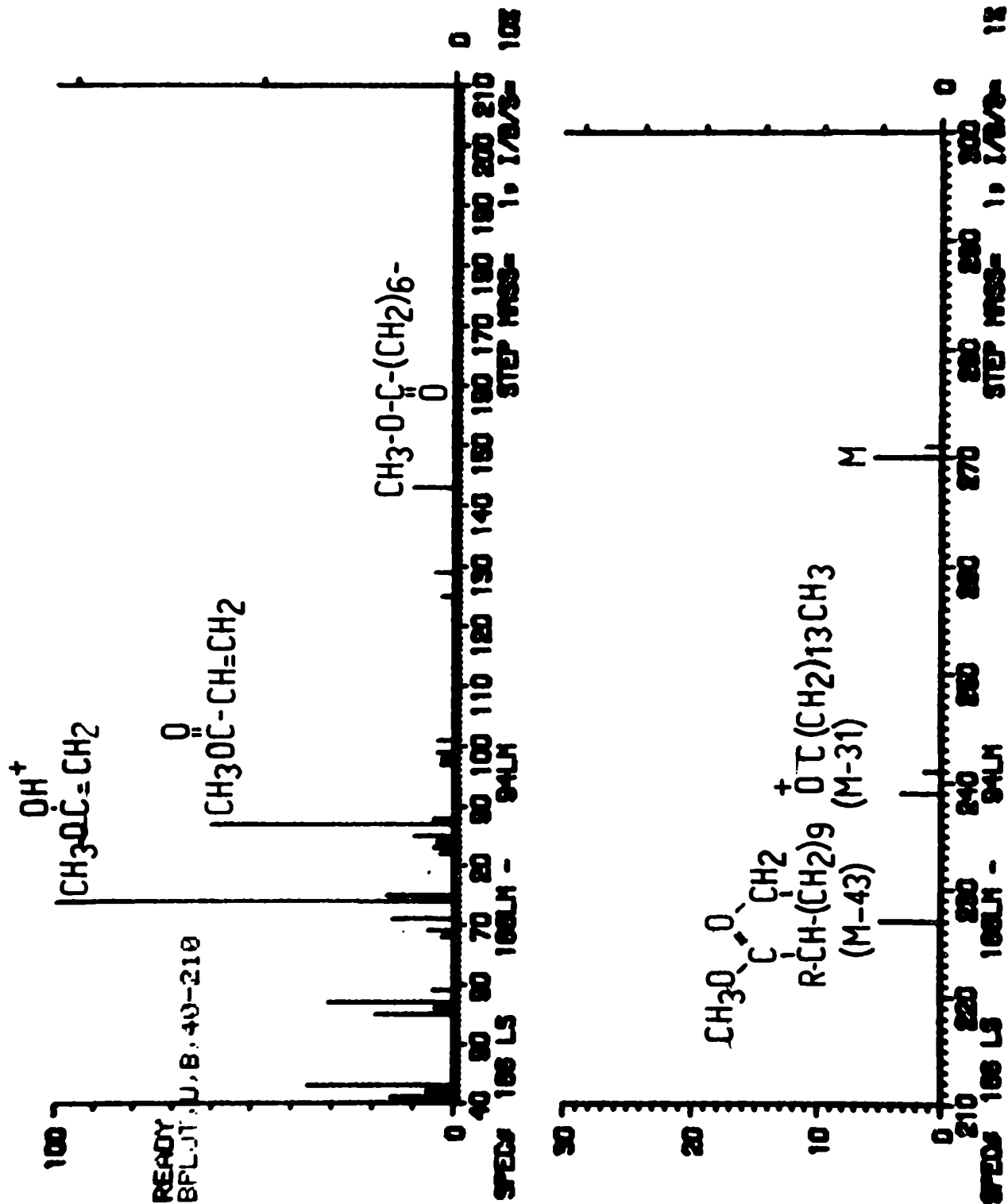


Figura 33: Espectros de masa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que componen el cerebrósido A de *Neurospora crassa*.
 A) Acido palmítico.

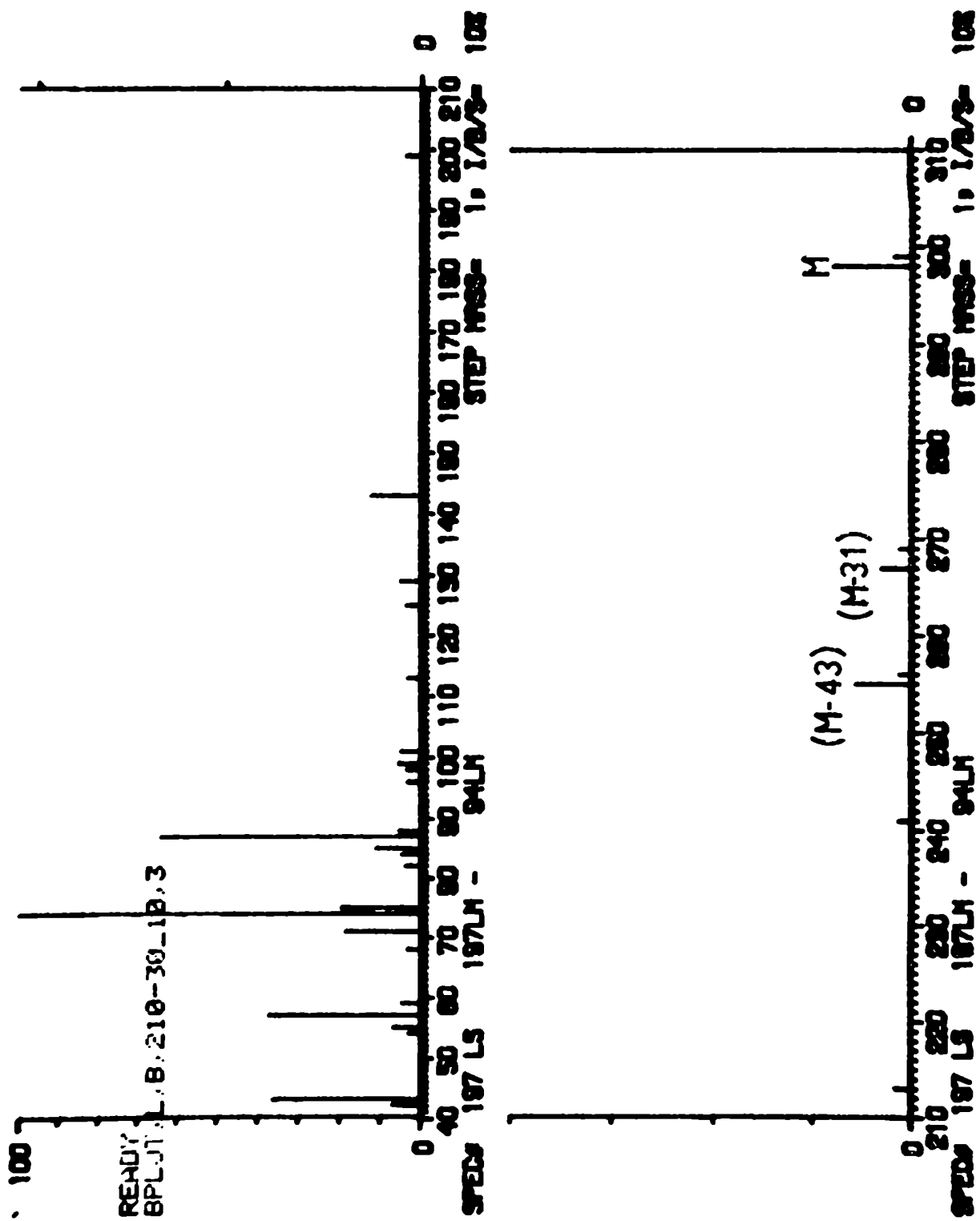


Figura 33,B: Acido esteárico.

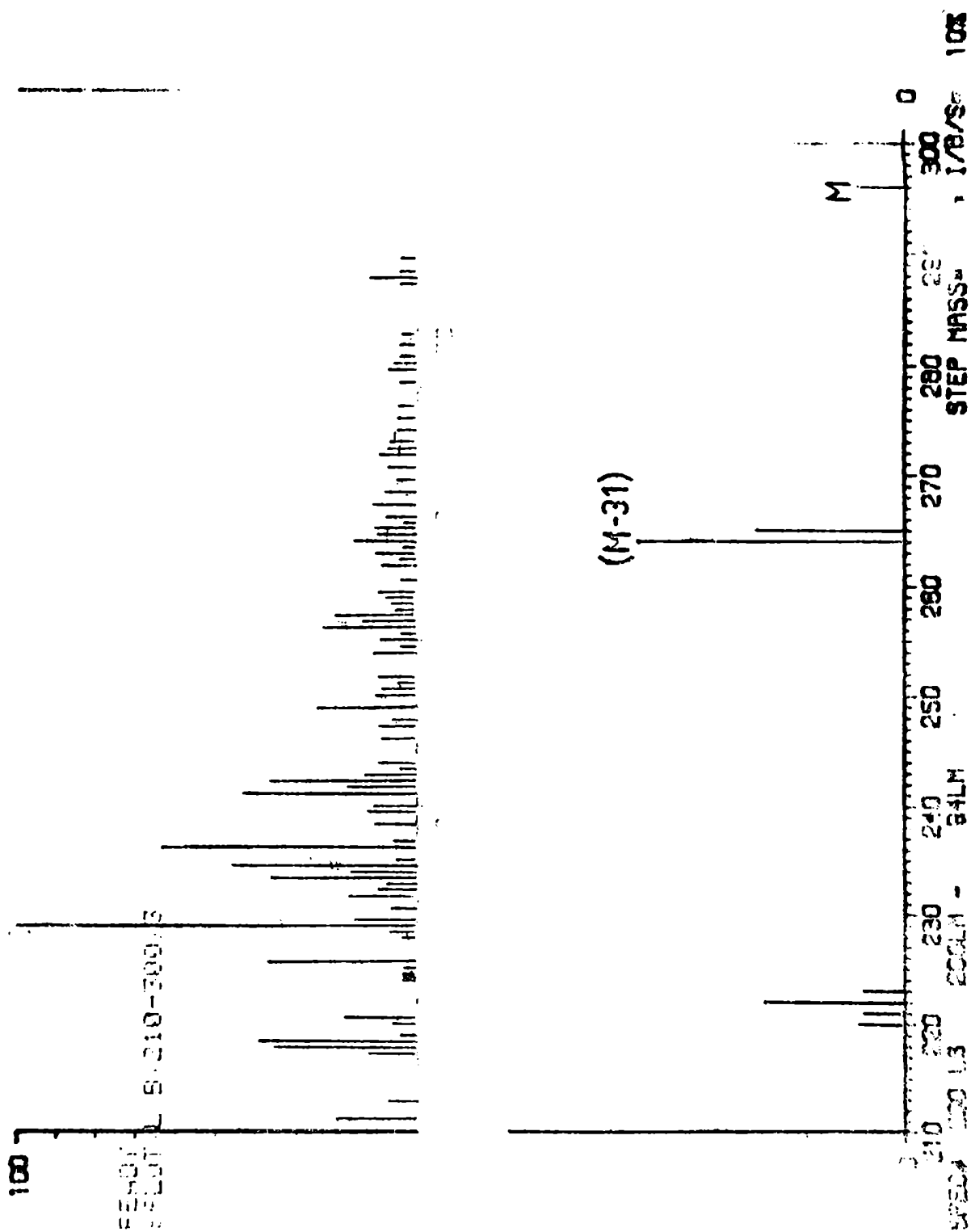


Figure 33 C: Acido oleico.

Otros iones característicos que aparecen son m/e 239, m/e 267 y m/e 265 que corresponden a la pérdida del grupo metoxi, es decir (M-31) (Fig. 34,b).

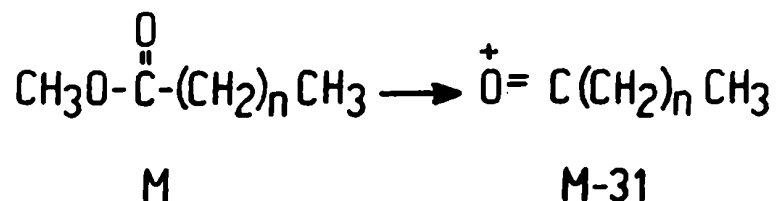


Figura 34,b

Los iones m/e 269 (M-29) en el ácido esteárico y m/e 227 y m/e 255 (M-43) en los ácidos palmítico y esteárico respectivamente se originan por un reordenamiento de la cadena más la transferencia de un H hacia el fragmento que retiene la carga seguido de la pérdida de un radical propílico. En el M-43 la ruptura se hace entre C₄ y C₅ y en M-29, la ruptura se hace entre C₃ y C₄ (319). (Figura 34,c).

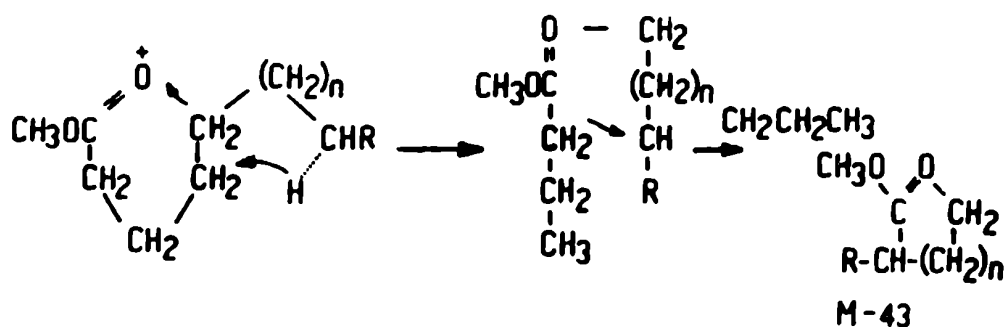
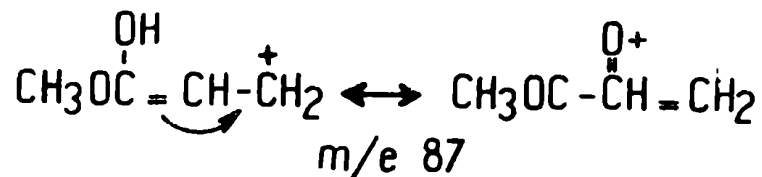
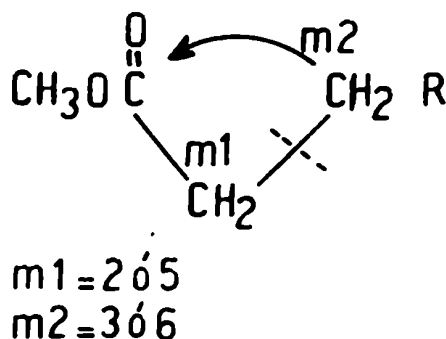


Figura 34,c

Otra característica de los espectros de los ésteres metílicos de los ácidos grasos es la aparición de los iones de la serie $\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)^+_n$ que se encuentran a $m/e (59 + 14 n)$. El ion más abundante de la serie es el $m/e 87$ aunque también aparecen el $m/e 143$ y $m/e 199$. En estos últimos hay expulsión de porciones intermedias de la cadena más un H. (320). (Fig. 34,d).

Figura 34,d

En el espectro EM 200 que corresponde al éster metílico del ácido oleico se observa la presencia de los iones m/e 222 (M-74) y m/e 180 (M-116) que corresponden a la pérdida de la fracción éster más un H que se reubica cuando se rompen las uniones entre C₂, C₃ y C₅, C₆ respectivamente. (321), (322), Fig. 34,e.

Figura 34,e

En el caso de ésteres monoinsaturados de cadena larga, la ubicación y estereoquímica de la doble ligadura no se puede determinar directamente por espectrometría de masa pues los espectros de todos los monoenos de C₁₈ con doble ligadura en posición 6,8,10,13 y 17 son semejantes.(320). Una posibilidad de identificar la doble ligadura sería trimetilsililar los deriva-

dos oxigenados de los ácidos grasos pues los trimetilsililderivados van a la doble ligadura y así se produce la ruptura de la molécula y la aparición de fragmentos característicos. (320). Para ello sería preciso aislar el ácido, transformarlo en epoxi, luego en glicol y finalmente derivatizarlo y ello está fuera de los objetivos de la presente tesis.

Tabla 9

Espectros de masa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del cerebrósido A y su abundancia relativa.

EM 166 (Palmítico)		EM 197 (Esteárico)		EM 200 (Oleico)	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
43	35	43	35		
55	30	55	8	55	40
69	5			69	40
74	100	74	100	74	100
87	60	87	65	87	65
143	10	143	10		
		199	5	180	15
227	5			222	15
239	4	255	8		
				264	28
		267	4	265	15
		269	2		
270	6	298	8	296	5

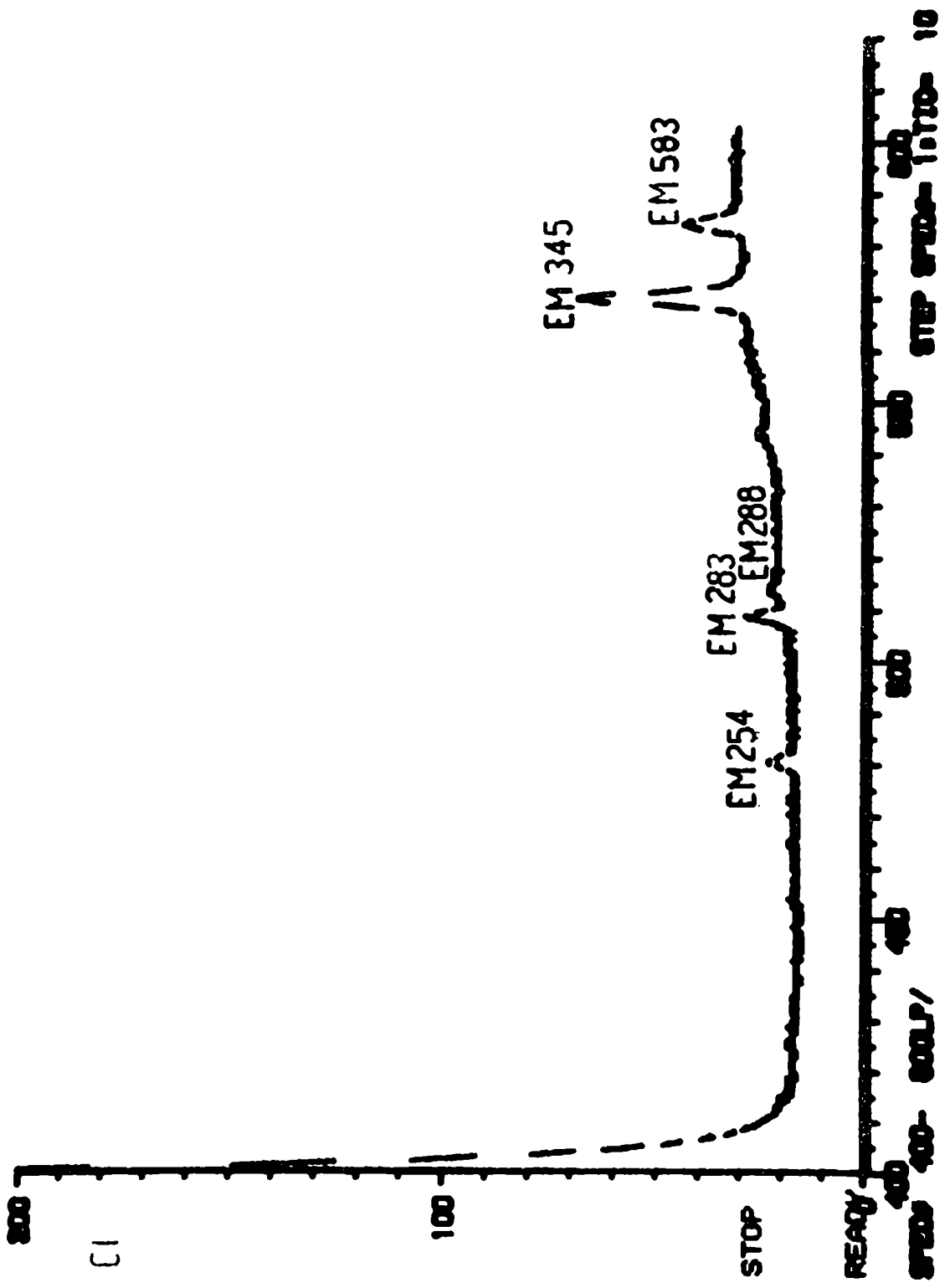


Figura 35: Cromatograma por corriente iónica total de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que constituyen el cerebrósido B.

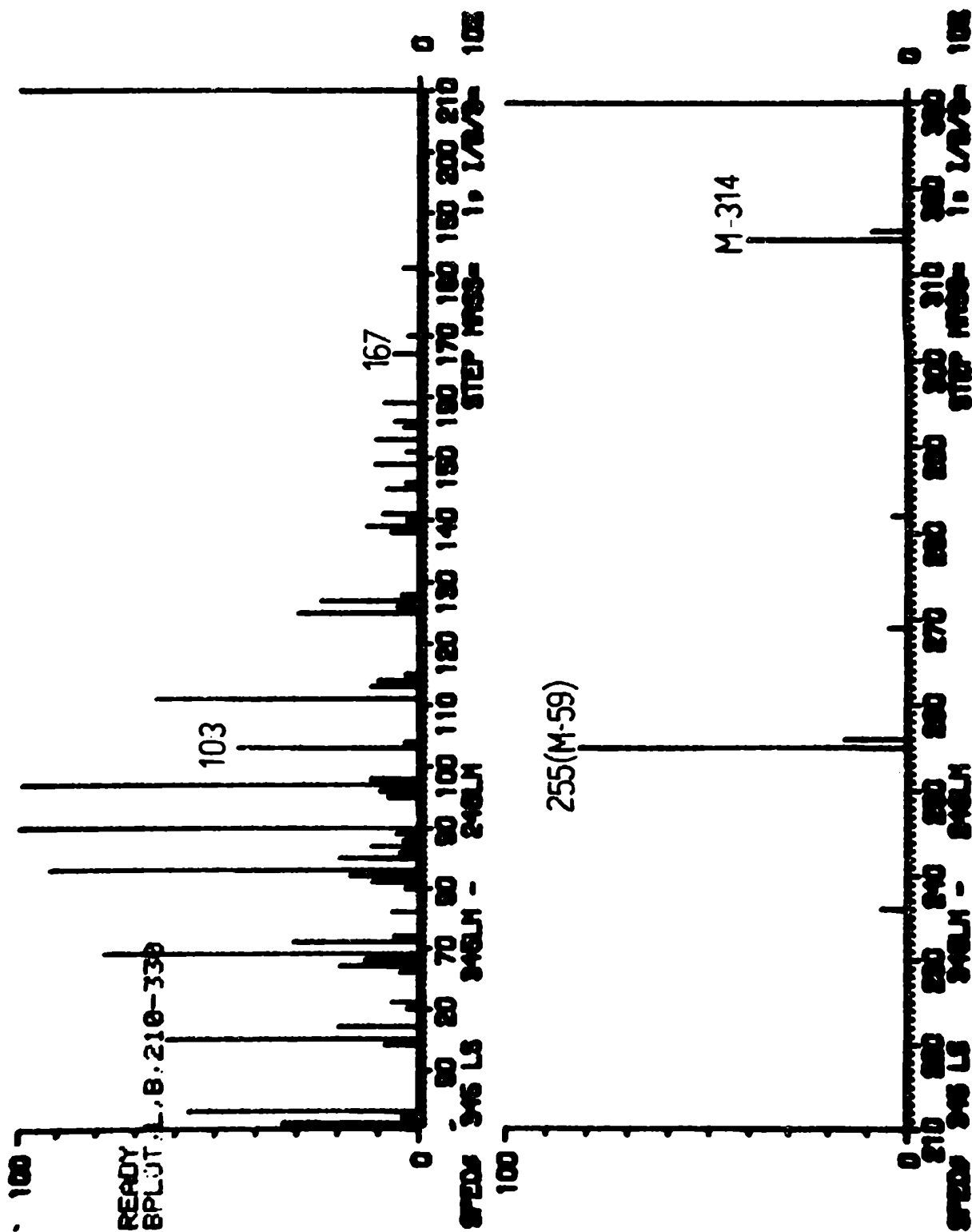


Figura 36: Espectros de masa de los ésteres metílicos que componen el cerebrósido B. A) Acido hidroxiesteárico.

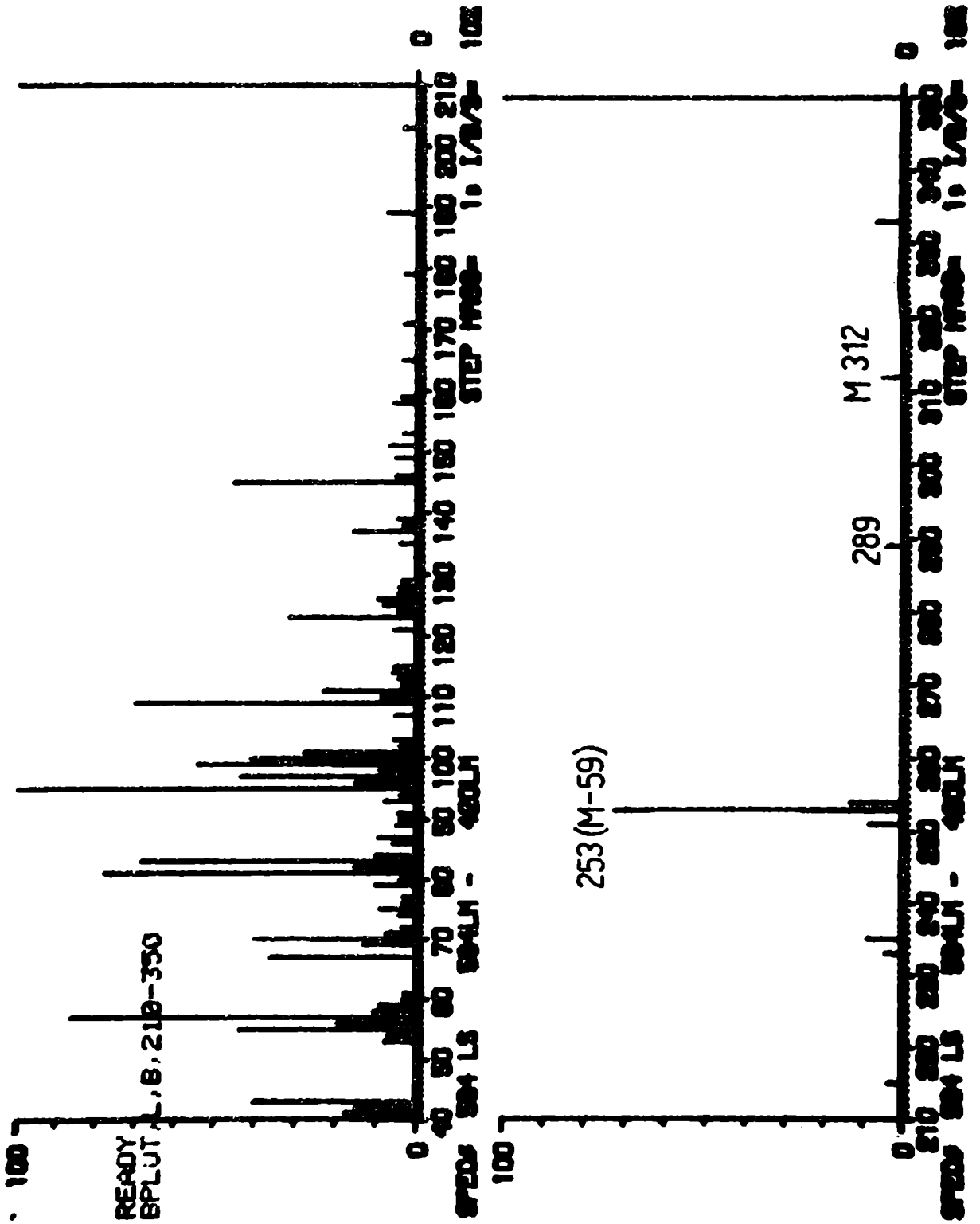


Figura 36 B: Acido hidroxioléico.

Tabla 10

Espectros de masa de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del cerebroáido B y su abundancia relativa.

EM 294 (Palmitico)		EM 293 (esteárico)		EM 298 (oleico)	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
43	25	43	25		
55	20	55	10	55	98
69	8	69	25	69	60
74	100	74	95	74	100
87	60	87	45	87	60
143	10	143	75		
		199	50	180	15
				222	15
227					
239					
253		255	80	254	26
				265	14
		267	40		
		269	20		
270				289	2
		296	100	296	4

EM 345 (Hidroxisteárico)		EM 383 (Hidrooleico)	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
		43	50
55	60	55	50
57	10	57	85
69	80		
		70	40
		83	70
87	10		
90	100	90	4
		95	100
97	98		
103	45	103	5
		109	70
111	65		
		123	40
125	30		
		137	20
		145	45
236	8	253	70
255	80		
269	8		
282	7		
		289	
		312	
314	40		

El cromatograma correspondiente a los ácidos grasos del cerebrósido B presenta cinco picos cuyos espectros de masa fueron determinados.(Figura 35). De estos picos, los denominados EM 254, EM 283 y EM 288 corresponden a los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, esteárico y oleico respectivamente.

Se observan iones moleculares a m/e 270, m/e 298 y m/e 296 con abundancia de los iones m/e 74 y m/e 87. Del mismo modo que en el cerebrósido A, aparecen también iones a m/e 269 (M-29), m/e 239, m/e 267, m/e 264 (M-31), m/e 227, m/e 255 (M-43), m/e 222 (M-74) y m/e 180 (M-116). (Tabla 10).

Los dos picos restantes corresponden a los espectros EM 345 y EM 583 con iones moleculares a m/e 314 y m/e 312 (Figura 36 A y B) lo cual indica la presencia de los ésteres metílicos de los ácidos hidroxiesteárico e hidroxioleico respectivamente con presencia de iones característicos a m/e 255 y m/e 253 (M-59) (tabla 10). La aparición del ion M-59 marca la posición del grupo hidroxilo en la molécula en el C α ya que su presencia facilita la ruptura entre C₂ y C₃ con la pérdida del grupo carbometoxi.(Figura 34f).

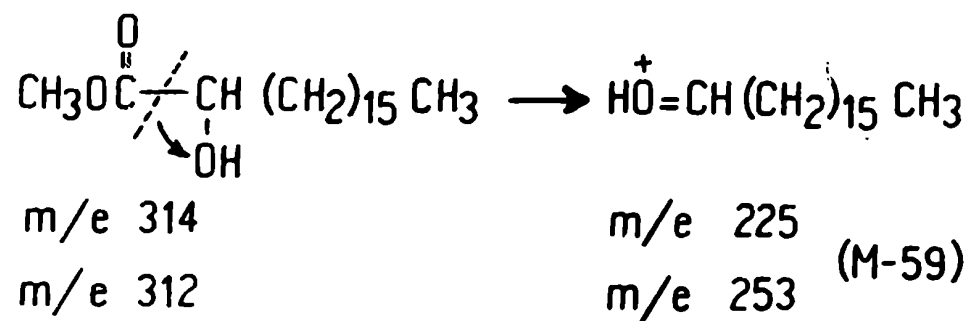


Figura 34, f

Otros iones que indican la posición del grupo OH⁻ en la cadena son los que están asociados con ruptura β a la función oxigenada, m/e 57, m/e 90 y m/e 60. (320). (Figura 34,g).

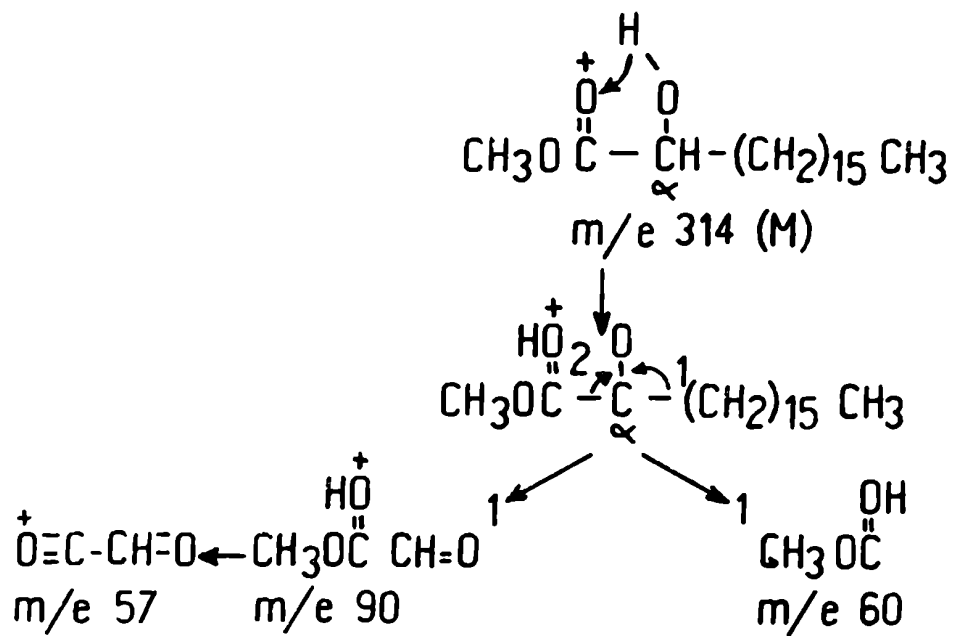
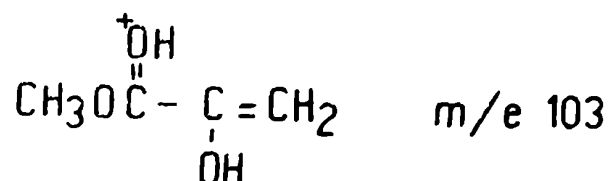


Figura 34,g

Por último la aparición del ion m/e 103 es otro indicio más de la posición del grupo OH^- cerca del extremo anterior de la cadena. (320). (Figura 34,h).

Figura 34,h

De los resultados obtenidos puede concluirse que los ácidos grasos hidroxilados en Neurospora crassa tienen el grupo OH⁻ en el C₂. La presencia de estos ácidos como constituyentes importantes de los cerebrósidos del hongo coincide con lo registrado en la literatura con respecto a los cerebrósidos en general (324) (325), y también a los cerebrósidos encontrados en hongos hasta el momento. (252), (243), (271), (136), (251), (191), (307), (250). Los α-hidroxiácidos mencionados son los únicos componentes hidroxilados que aparecen en cerebrósidos.

En cuanto a la longitud de la cadena, la variabilidad es mayor. En cerebrósidos de cerebro predominan los ácidos esteárico (18:0), lignocérico (24:0) (95) y nervónico (24:1) aunque también se encontraron desde palmítico (16:0) hasta hexacosanoico (26:0) en concentraciones variables (95) (323). En tejidos extraneurales (97) y en sangre (98) se encuentran concentraciones altas de lignocérico (24:0) y nervónico (24:1) seguida de palmítico (16:0) y cantidades menores de ácidos C₁₈ a C₂₃. (323). En el cerebro de la lamprea Lampetra fluviatilis, los cerebrósidos tienen ácidos

grasos que van de C₁₄ a C₂₇, predominando palmítico y esteárico. (326). En la estrella de mar, Acanthaster planci, los cerebrósidos tienen α -hidroxi ácidos de C₁₉ a C₂₄. (327).

En los hongos, la variedad de ácidos grasos que integran los cerebrósidos es grande aunque no son demasiadas las especies de hongos donde se han descrito hasta ahora estos compuestos. (ver Tabla 6). Entre los Phycomycetes, el ácido graso que constituye el cerebrósido de Phycomyces blakeesleanus es 2-hidroxipalmítico (2-h 16:0) (243). Entre los hongos imperfectos pueden citarse Fusarium lini con ácido esteárico (18:0) y 2-hidroxiesteárico (h 18:0) (243), Aspergillus oryzae con 16:0, 18:0, h18:0 y h 18:1 (271), Aspergillus niger con h18:1 (251) y Fusicoccum amigdali con h18:1 (191).

Entre los Ascomycetes, Hansenula ciferrii tiene 16:0, 16:1, 18:1, 18:2, 18:3 y h18:0 (252) Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis poseen h18:0 (136). Finalmente entre los Basidiomycetes se conoce la composición de ácidos grasos de los cerebrósidos de Lactarius deliciosus con 14:0, 16:0, 18:0, h16:0, h16:1 y h19:0 (307), de Amanita muscaria, A. rubescens y Agaricus bisporus con 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, h15:0, h16:0 y h18:0 (250). Si se comparan los ácidos grasos que componen los cerebrósidos de Neurospora con los encontrados en estos hongos puede decirse que estos ácidos grasos son componentes normales de los cerebrósidos en hongos

y que están distribuidos al azar entre los distintos grupos sin que se les pueda atribuir ninguna importancia filogenética.

IV. 3. 2. 2. Identificación por cromatografía en capa fina de las bases aminadas de cadena larga.

La presencia de bases aminadas de cadena larga se demostró en una cromatografía en capa fina de la fracción clorofórmica obtenida luego de la hidrólisis ácida de los cerebrósidos A y B. Aunque no se pudo determinar con precisión de que tipo de bases se trataba, el revelado con ninhidrina y fluorescamina confirmó la existencia de grupos amino en esas moléculas. El solvente usado fue cloroformo:metanol:agua:amoníaco concentrado, 48:14:1:1 y las movilidades cromatográficas variaron de 0,53 en la fracción correspondiente al cerebrósido A a 0,58 en la fracción del cerebrósido B, siendo el R_f de 0,60 para la esfingosina y de 0,56 para la dihidroesfingosina.

IV. 3. 2. 3. Identificación por cromatografía gaseosa - espectrometría de masa de las bases aminadas de cadena larga.

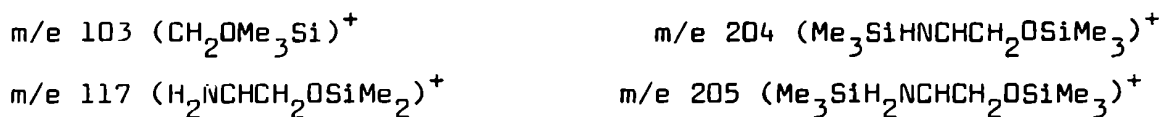
Los productos de la hidrólisis ácida de los dos cerebrósidos A y B de Neurospora crassa que se recogieron en cloroformo

de acuerdo a la metodología descrita, fueron sililados y analizados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa.

Cerebrósido A

De dos muestras diferentes de la fracción clorofórmica del cerebrósido A se obtuvieron los siguientes cromatogramas por corriente iónica total, A_1 y A_2 . El cromatograma de la fracción A_1 , (figura 37), presentó nueve señales o picos cuyos espectros de masa fueron determinados y comperados contra el banco de espectros de memoria. Los picos indicados como EM 58, EM 61 y EM 77 resultaron impurezas, mientras que los indicados como EM 157, EM 202, EM 237 y EM 261 aparentaron ser metilsilil derivados de ácidos grasos que pudieron ser arrastrados en el proceso de fraccionamiento.

Los espectros EM 171 y EM 183 resultaron corresponder a bases del tipo "esfingosinas" ya que mostraron un ión muy importante a m/e 204 (90 y 60 % respectivamente; ver tabla 11), esto indicó una sililación completa, es decir que el grupo amino también se sililó (Figura 38). Descontando el ión m/e 73 (Me_3Si^+) que es base en ambos espectros (100 %; figura 39, A y B y tabla 11), se destacaron los iones:



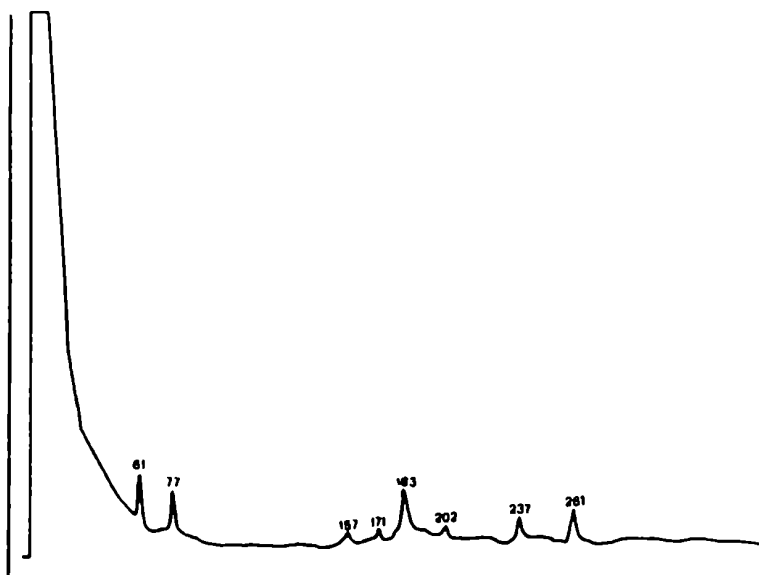
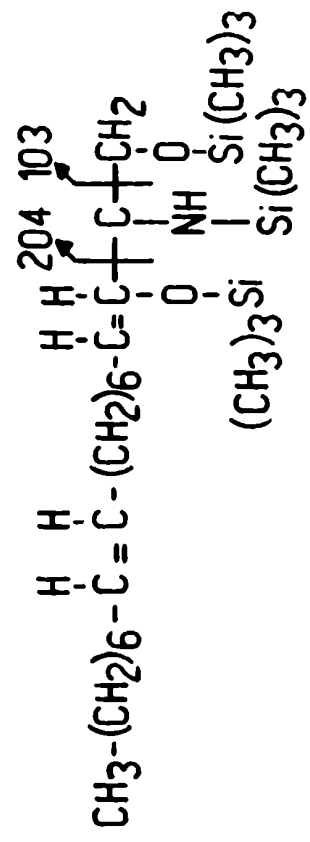
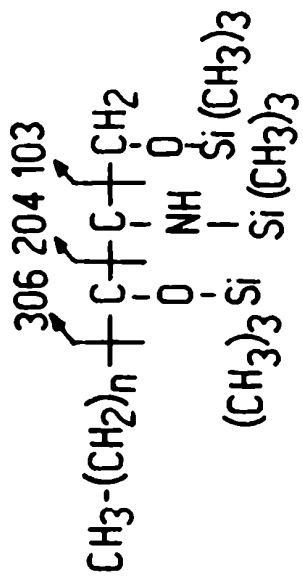


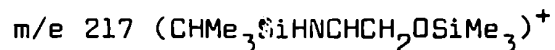
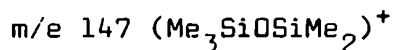
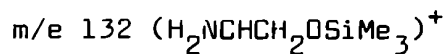
Figura 37: Cromatograma de la fracción A₁ del cerebrósido A de Neurospora crassa.



D) PM = 541

- A) n = 13 PM = 503
- B) n = 14 PM = 517
- C) n = 15 PM = 531

Figura 3B: Estructura probable de las bases aminadas de cadena larga que componen el cerebrósido A de Neurospora crassa.



m/e 299 y m/e 313. La abundancia relativa de estos iones se puede ver en la tabla 11. Como es habitual para los metil silil éteres de las bases de esfingolípidos, el ión molecular no fué detectado. (337).

Dado que se trata de bases totalmente sililadas, se podría suponer que, en EM 171, el mayor fragmento, m/e 299 podría resultar de la pérdida de 204 unidades de masa, siendo entonces la base de un peso molecular de 503. Dicho en otras palabras el fragmento m/e 299 sería equivalente a M-204, donde M es el ión molecular. Se trataría entonces de una dihidroesfingosina de 17 átomos de carbono como se ve en la figura 38, A.

Habría en cambio, dos interpretaciones posibles para el espectro EM 183:

A) Que se trate de una dihidroesfingosina de 18 átomos de Carbono si m/e 313 fuera M-204 ya que esto significaría que la molécula tiene un peso molecular de 517. (Figura 38,B).

B) También podría tratarse de una dihidroesfingosina de 19 átomos de Carbono si m/e 328 fuera igual a M-204, en este caso el peso molecular es de 531. (Figura 38,C). Debe tenerse en cuenta que, por el peso molecular obtenido, el m/e esperado en este último caso debería ser de 327; por lo tanto se puede suponer

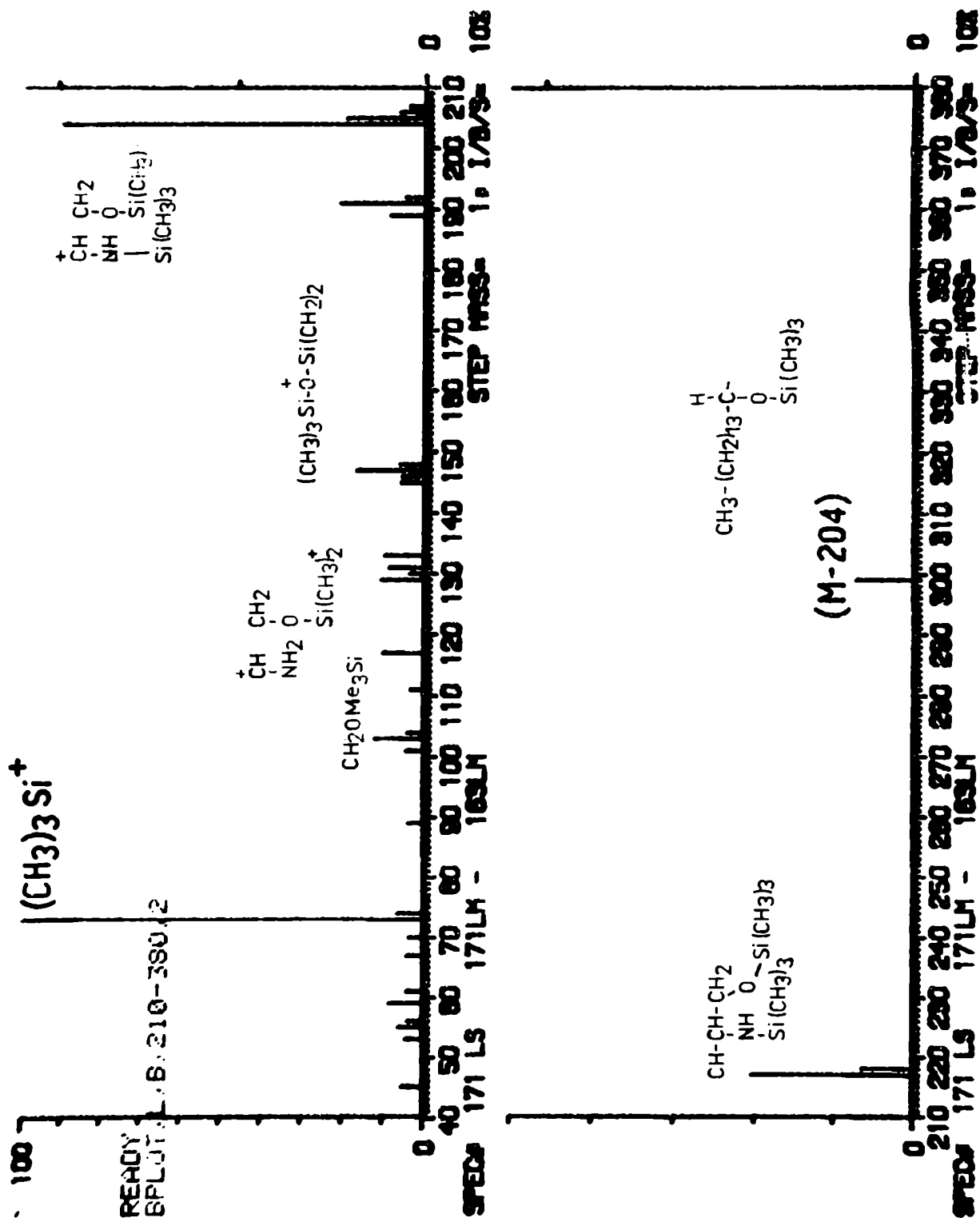


Figura 39: Espectros de masa de las bases aminadas que componen la fracción A₁ del cerebroside A.
 A) Dihidroesfingosina-C₁₈.

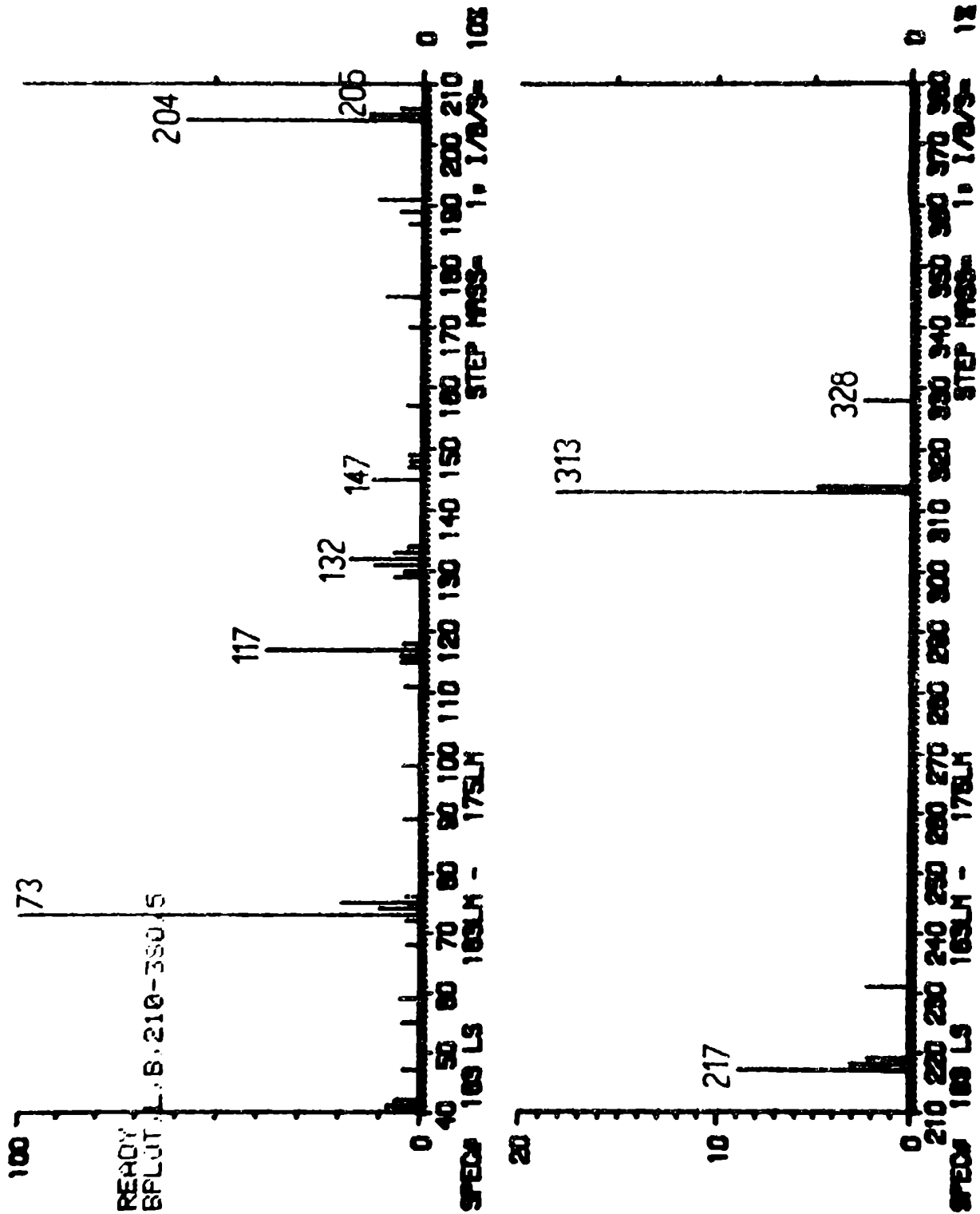


Figura 39,B: Dihidroesfingosina-C₁₉.

que el fragmento m/e 328 estaría protonado, fenómeno que no es extraño en los espectros de masa de estas bases.

TABLA 11

Abundancia relativa de los fragmentos que aparecen en los espectros de masa de las bases aminadas de la fracción A₁ del cerebro-sido A.

EM 171		EM 183	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
73	100	73	100
103	10		
117	10	117	40
129	10	129	8
132	10	132	20
147	15	147	15
189	10		
191	20	191	10
204	90	204	60
205	20	205	10
217	40	217	9
299	20		
		313	18
		328	3

En la fracción A₂, el cromatograma presentó siete señales (Figura 40), de las cuales se analizaron las dos más importantes, EM 187 y EM 200, ya que las otras dos, EM 90 y EM 103 parecieron ser derivados sililados de ácidos grasos. Los compuestos cuyos espectros se indican como EM 187 y EM 200 (Figura 40) parecieron ser también bases del tipo de las esfingosinas posiblemente iso-

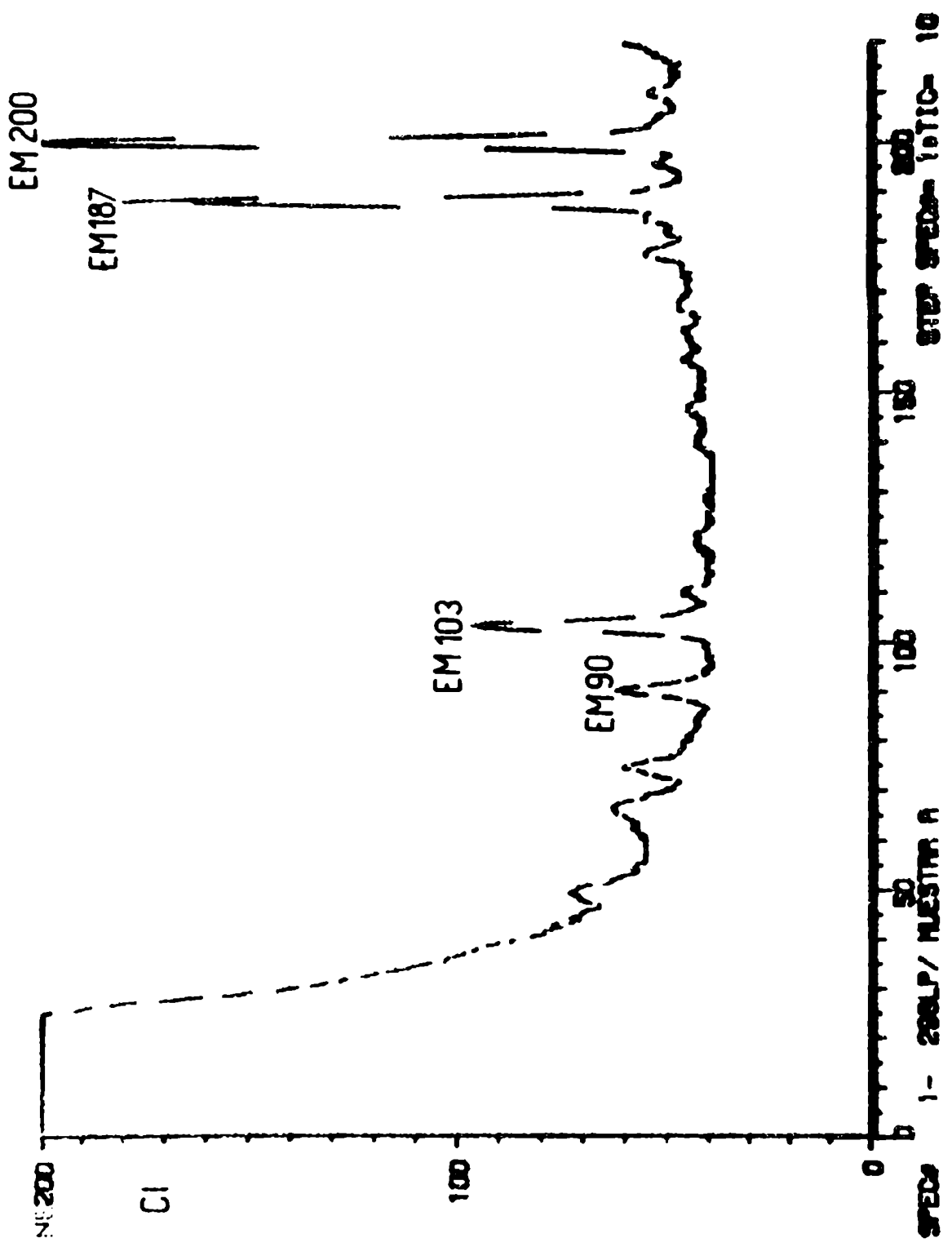


Figura 40: Cromatografía por corriente iónica total de la fracción A₂ del cerebrósido A de Neurospora crassa.

meros, con ión base a m/e 204 (100%) lo que indicaría una sililación completa y con iones a m/e 73, m/e 103, m/e 117, m/e 129, m/e 132, m/e 147, m/e 204, m/e 205, y m/e 306 cuyas abundancias relativas figuran en la tabla 12 y en la figura 41. El ión máximo en este caso es m/e 438. Si se considerara a m/e 438 como M-204, el ión molecular, M, sería de 642 y esto no coincide con el peso molecular de ninguna base conocida, ya que la fitoesfingosina de 20 átomos de Carbono tiene un peso molecular de 633 y la de 21 átomos de Carbono tiene un peso molecular de 647. Una dihidroesfingosina de 27 átomos de Carbono tendría un peso molecular de 643, pero es poco probable que exista una base de cadena tan larga. En cambio, si se supone a m/e 438 igual a M-103, el peso molecular sería de 541 y correspondería a una dihidroxi-base diinsaturada de 20 átomos de Carbono cuya estructura tentativa se puede observar en la figura 38 D).

Cerebrósido B

De tres muestras diferentes de la fracción clorofórmica del cerebrósido B se obtuvieron los siguientes cromatogramas por corriente iónica total, B₁, B₂ y B₃. El cromatograma correspondiente a la fracción B₁ presentó cinco señales, (Figura 42), dos de las cuales aparecen en muy pequeña cantidad por lo que los

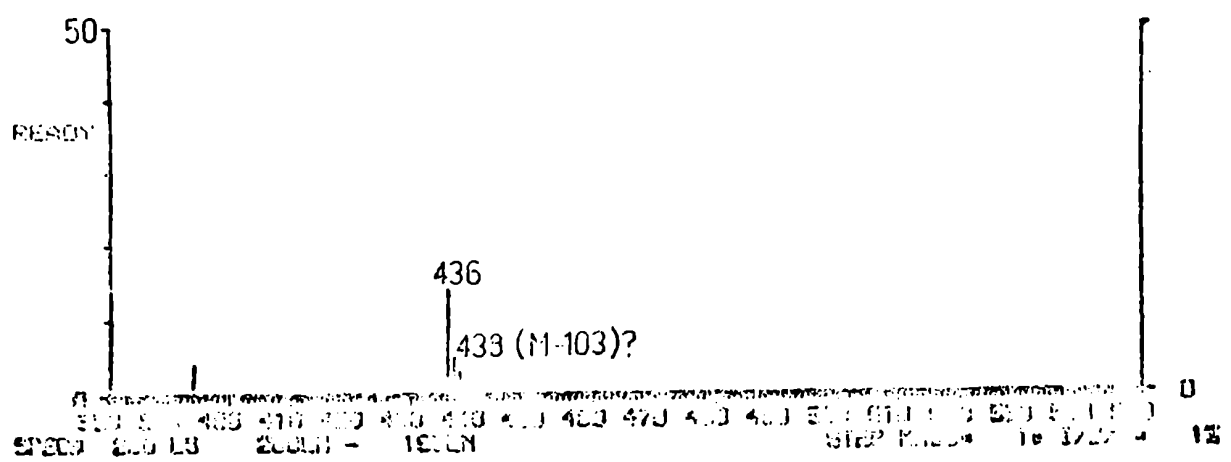
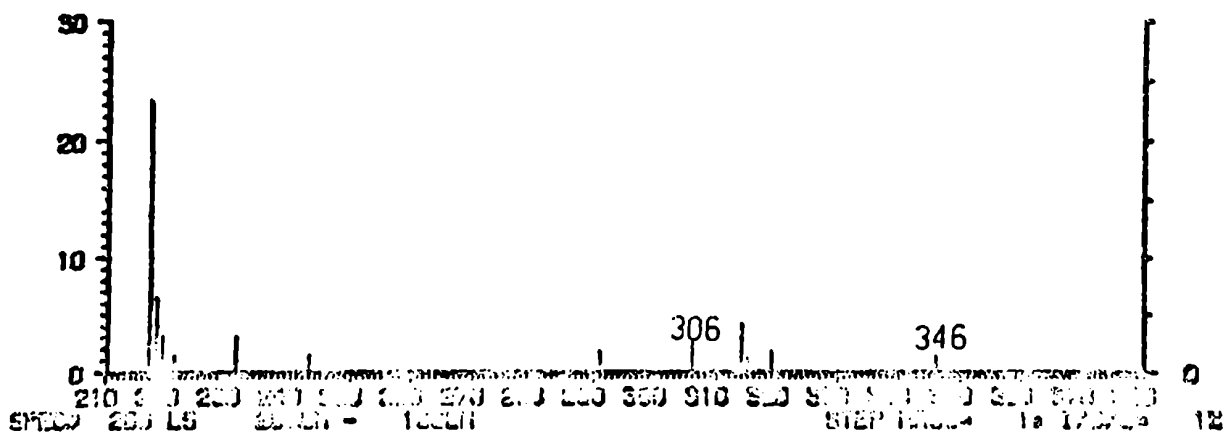
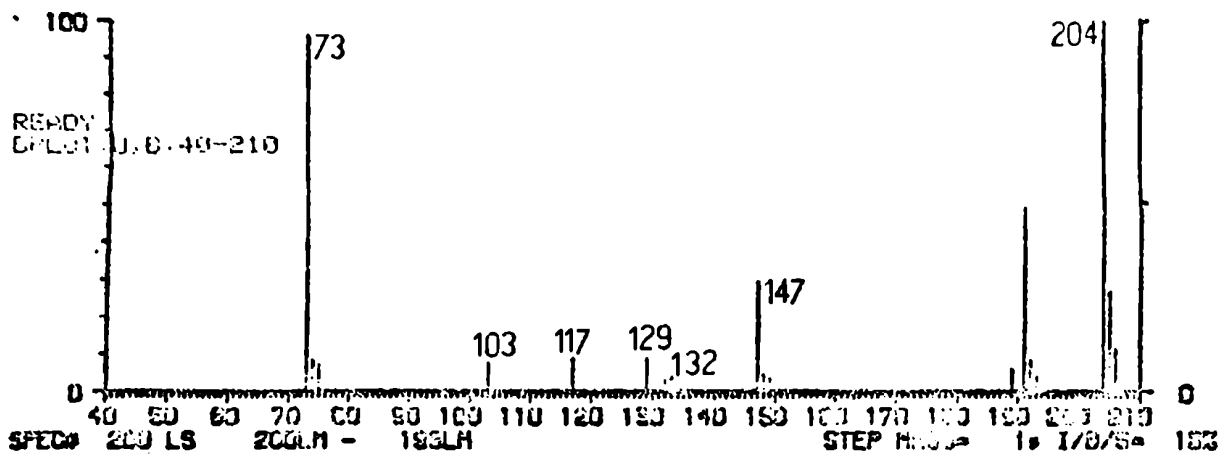


Figura 41: Espectro de masa de la base aminada de la fracción A₂ del cerebrósido A correspondiente a una probable dihidroxibase diinsaturada de C₂₀.

Tabla 12

Abundancia relativa (4º columna) de los fragmentos (5º columna) que aparecen en los espectros de masa de las bases aminadas de la fracción A₂ del cerebrósido A.

>>DATE<< SPEC# 187/LS/ 167LM - 57LM
 BASE SUM
 31434 119834

PE#	INT	I-BASE	I-FRASEL.C	MASS	TIC	PE#	INT	I-BASE	I-FRASEL.C	PE#	INT	I-BASE	I-FRASEL.C
1	100	1.11%	1.63%	41.0	73	25	249	0.00%	0.00%	1	100	1.00%	0.00%
2	333	1.03%	1.54%	43.0	71	24	14	0.00%	0.00%	2	333	1.03%	0.00%
3	333	2.02%	2.87%	45.0	75	26	130	0.00%	0.00%	3	333	1.03%	0.00%
4	333	1.03%	1.47%	45.0	73	26	130	0.00%	0.00%	4	333	1.03%	0.00%
5	333	0.01%	0.01%	53.0	73	29	1	0.00%	0.00%	5	333	1.03%	0.00%
6	333	0.41%	1.58%	53.0	79	30	119	0.00%	0.00%	6	333	1.03%	0.00%
7	333	1.29%	1.75%	53.0	81	31	119	0.00%	0.00%	7	333	1.03%	0.00%
8	333	0.27%	0.00%	53.0	83	32	119	0.00%	0.00%	8	333	1.03%	0.00%
9	126	0.00%	0.00%	57.0	83	32	119	0.00%	0.00%	9	126	0.00%	0.00%
10	106	0.00%	0.00%	71.0	83	32	119	0.00%	0.00%	10	106	0.00%	0.00%
11	212	0.00%	0.00%	71.0	83	32	119	0.00%	0.00%	11	212	0.00%	0.00%
12	212	0.00%	0.00%	71.0	83	32	119	0.00%	0.00%	12	212	0.00%	0.00%
13	174	0.00%	0.00%	71.0	87	35	141	0.00%	0.00%	13	174	0.00%	0.00%
14	174	0.00%	0.00%	73.0	87	36	149	0.00%	0.00%	14	174	0.00%	0.00%
15	174	55.80%	68.45%	73.0	87	36	149	0.00%	0.00%	15	174	0.00%	0.00%
16	174	4.43%	5.45%	74.0	87	37	163	0.00%	0.00%	16	174	0.00%	0.00%
17	199	2.01%	2.61%	75.0	87	39	239	0.00%	0.00%	17	199	0.00%	0.00%
18	199	0.26%	0.34%	75.0	87	39	239	0.00%	0.00%	18	199	0.00%	0.00%
19	199	0.00%	0.00%	81.0	87	41	281	0.00%	0.00%	19	199	0.00%	0.00%
20	199	0.00%	0.00%	82.0	87	42	282	0.00%	0.00%	20	199	0.00%	0.00%
21	216	0.00%	0.00%	83.0	87	43	285	0.00%	0.00%	21	216	0.00%	0.00%
22	216	0.45%	0.55%	85.0	87	45	459	0.00%	0.00%	22	216	0.00%	0.00%

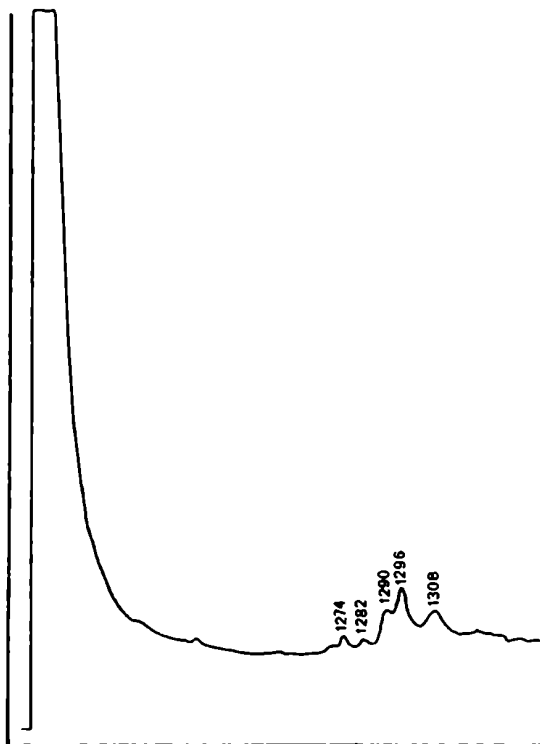


Figura 42: Cromatograma de la fracción B₁
del cerebrósido B de Neurospora
crassa.

valores de corriente iónica total resultaron tan reducidos que fue imposible registrar los respectivos espectros de masa. Los restantes tres picos corresponden a los espectros EM 1290, 1296 y 1308, cuyos fragmentos más importantes presentaron las características señaladas en la tabla 13.

Tabla 13

Abundancia relativa de los fragmentos que aparecen en los espectros de masa de las bases aminadas de la fracción B₁ del cerebro-sido B.

EM 1290		EM 1296		EM 1308	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
43	10				
45	10	45	8	45	--
56	84	56	16	56	17
67	13	67	13	67	11
73	56	73	84	73	4
84	20	84	18	84	18
103	100	103	64	103	34
117	11	117	6	117	6
121	24	121	25	121	9
125	27	125	28	125	22
129	28	129	54	129	32
132	15	132	19	132	8
143	16	143	62	143	31
155	9	155	44	155	100
187	19	187	8	187	--
204	70	204	100	204	39
205	11	205	12	205	6
221	1	221	17	221	53
225	16	225	--	225	--
243	--	243	7	243	31
257	12	257	6	257	23
295	8	295	24	295	39
323	20	323	60	323	17
355	6	355	8	355	16
		369	9	369	20
				397	1

En el espectro 1290, el valor de m/e 204 indicaría la presencia de una base totalmente sililada y considerando que el mayor fragmento, m/e 355 podría producirse por la pérdida de 204 unidades de masa resultaría una base de peso molecular de 559, pudiendo asimilarse a una dihidroesfingosina de 21 átomos de Carbono. (Figura 43, A).

El EM 1296 correspondería también a una base persililada dado que su ion más importante es el m/e 204. Razonando de manera análoga a la anterior, si el mayor fragmento, m/e 369 resultó de la pérdida de 204 unidades de masa entonces el peso molecular del compuesto sería de 573, esto correspondería a la dihidroesfingosina de 22 átomos de Carbono. (Figura 43, B).

El tercer producto, correspondiente a EM 1308, aparentó no ser una base aminada de tipo simple. En la tabla 13 puede observarse la presencia de los iones m/e 397, 369, 296, 204, 155, 132, 113 y 103. De esto puede deducirse que se trataría de una base sililada pero con particularidades que hacen aparecer al ion m/e 155 como ión base, (100%). Ahora bien, si se considera al ion m/e 397 como resultante de la pérdida de 204 unidades de masa, (M-204), el producto tendría un peso molecular de 601 indicando una fitoesfingosina de 18 átomos de Carbono con dos insaturaciones o una dihidroesfingosina de 24 átomos de Carbono.

De las dos posibilidades planteadas, los restantes fragmentos del espectro señalarían a la segunda como la más probable, pero para explicar el ión m/e 155 debería plantearse la posibilidad de una ramificación en C₁₄ respecto a la dihidroesfingosina de C₂₂ presentada anteriormente. (Figura 43, C).

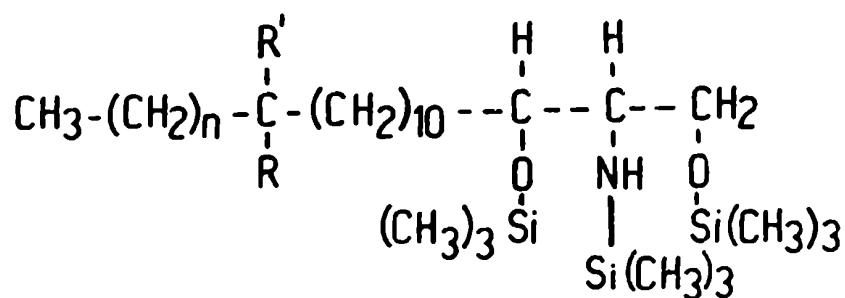


Figura 43: Estructura probable de las bases de cadena larga que componen el cerebrósido B de Neurospora crassa.

- A) n = 6 R=R' = H
 B) n = 7 R=R' = H
 C) n = 7 R=R' = CH₃

El cromatograma de la fracción B₂ presentó cinco picos, (figura 44), dos parecieron ser impurezas y de los tres restantes sólo uno proporcionó cantidad suficiente para obtener un espectro. (Figura 45). En la tabla 14 se observa la abundancia relativa de los iones más abundantes de la fracción B₂. En este caso, parecería tratarse de una base totalmente sililada, ya que apareció el ion m/e 204. De tal forma considerando al ion m/e 313 como M-204, la base tendría un peso molecular de 517 correspondiendo de ese modo a una dihidroesfingosina de

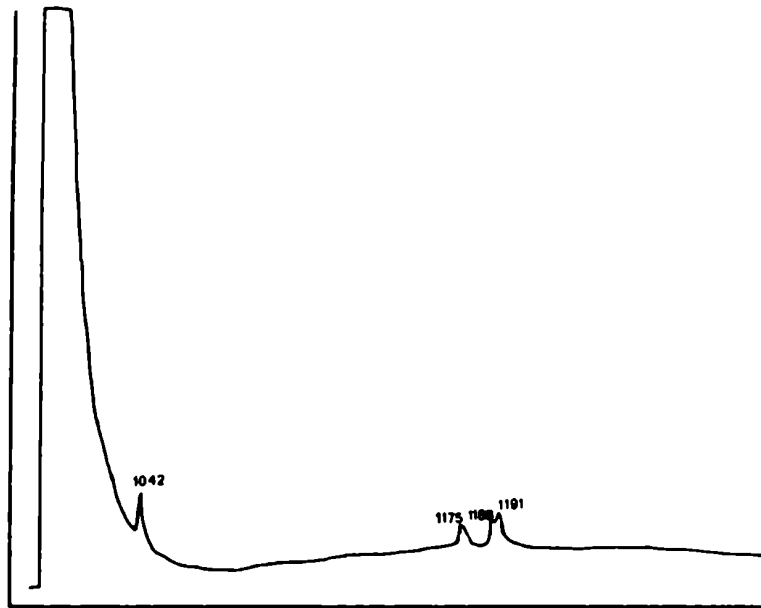


Figura 44: Cromatograma de la fracción B_2 del cerebrósido B.

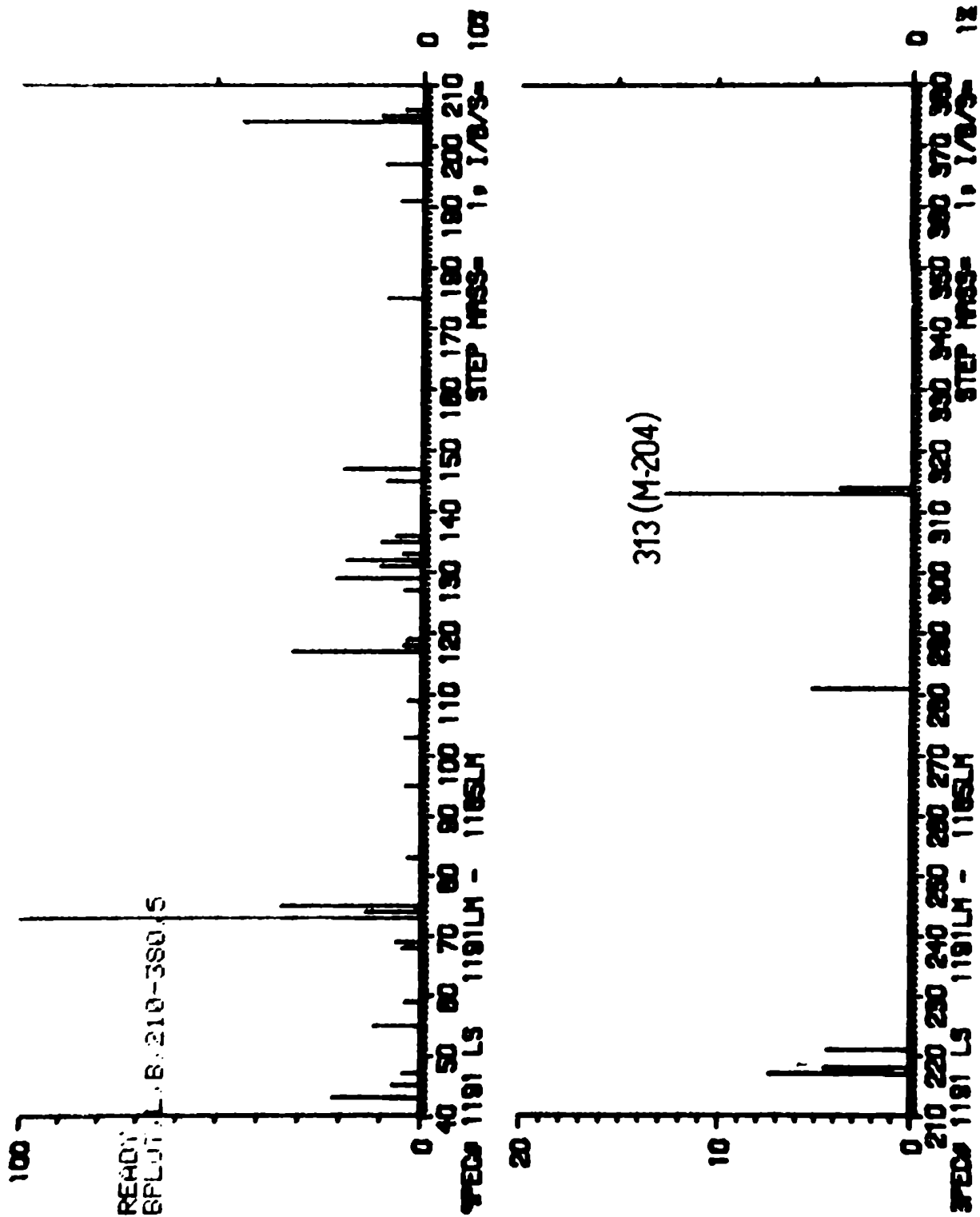


Figura 45: Espectro de masa de la base aminada de la fracción B_2 del cerebrósido B.

C_{16} , semejante a la descrita para el fragmento A_1 del cerebrósido A. (Figura 38, B).

Tabla 14

Abundancia relativa de los fragmentos que aparecen en el espectro de masa de la base aminada de la fracción B_2 del cerebrósido B.

EM 1191

m/e	Abundancia %
43	20
55	10
73	100
75	35
117	30
129	20
132	20
147	20
204	45
217	7
313	13

El cromatograma de la fracción B_3 presentó dos señales cuyos espectros fueron EM 773 y EM 786. (Figura 46). Como puede verse en la tabla 15 y en la figura 47, ambos espectros presentaron iones semejantes, por lo que podrían considerarse como isómeros. La presencia de m/e 204 indicaría que las bases están totalmente sililadas, pero los fragmentos de mayor peso molecular detectados, m/e 361 y m/e 521 no son asimilables a fórmulas de estructuras de esfingosinas descritas en la literatura.

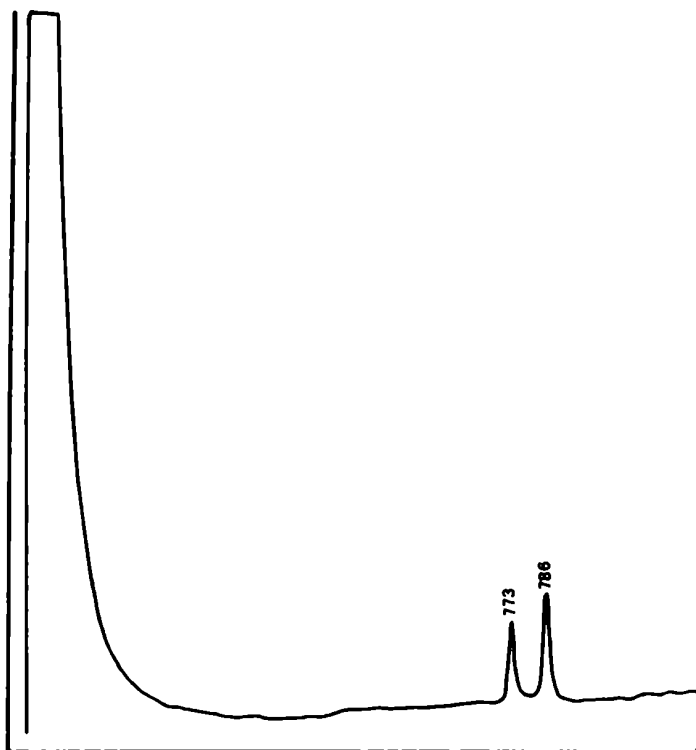


Figura 46: Cromatograma de la fracción θ_3 del cerebrósido B.

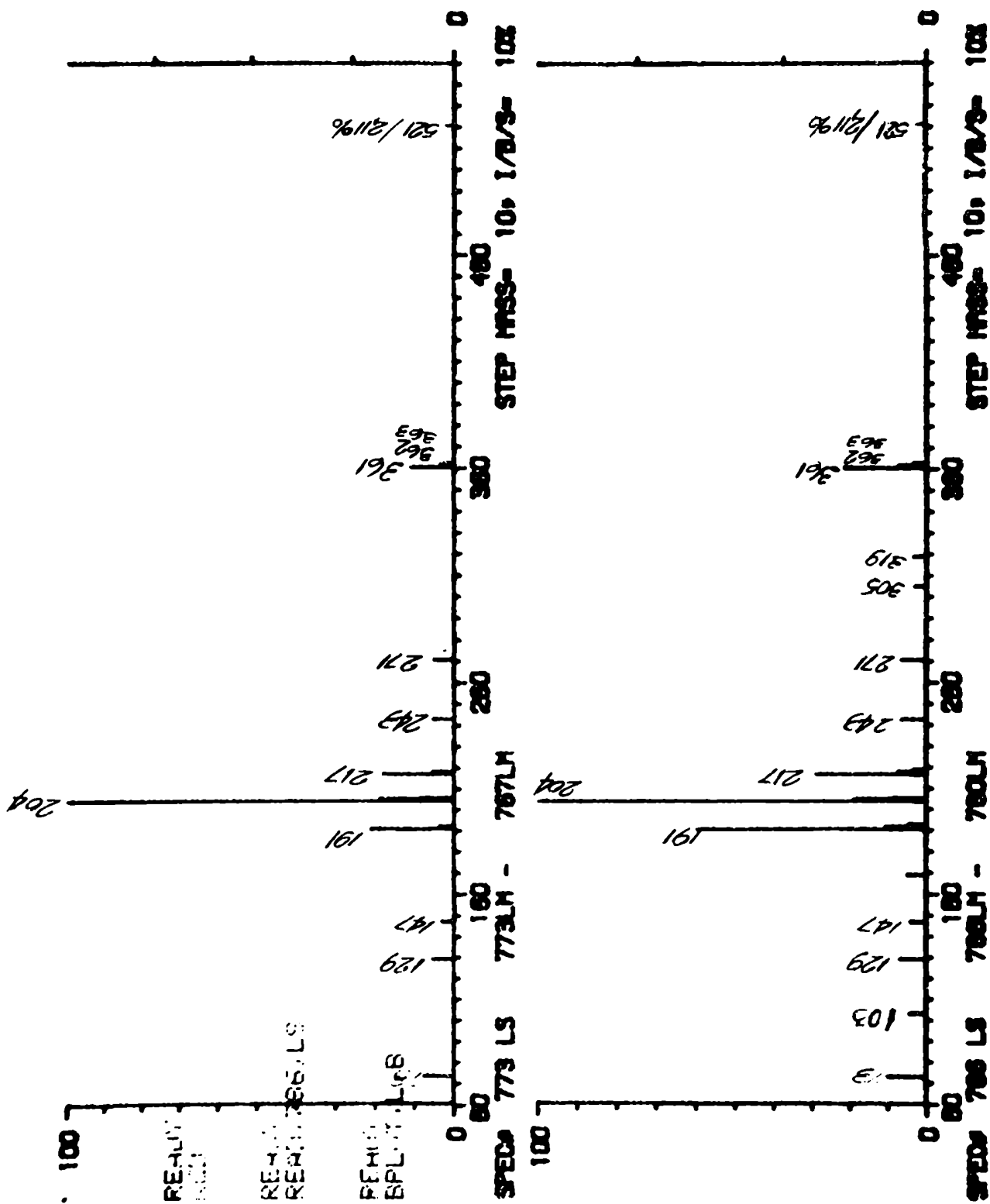


Figura 47: Espectro de masa de la base aminada de la fracción B₃ del cerebrósido B.

Si se considera a m/e 521 como un fragmento parcial, los valores razonables a sumarle para llegar al ion molecular serían 204,132,103,89 y/o 14 y en ningún caso se llega a un valor coincidente con un peso molecular asimilable a bases esfingosina, dihidroesfingosina o fitoesfingosina conocidas.

Tabla 15

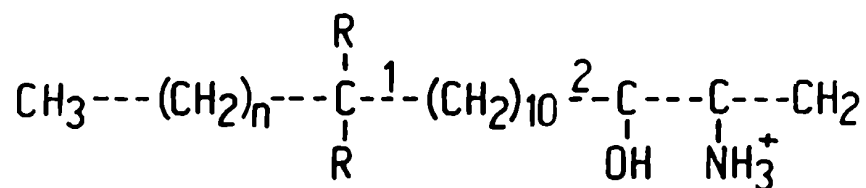
Abundancia relativa de los fragmentos que aparecen en los espectros de masa de las bases aminadas de la fracción B₃ del cerebrósido B.

EM 773		EM 786	
m/e	Abundancia %	m/e	Abundancia %
73	10	73	10
103	--	103	5
129	8	129	8
147	5	147	5
191	20	191	70
204	100	204	100
217	20	217	30
243	5	243	5
271	5	271	5
361	10	361	20
521	2	521	2

En la tabla 16 se presentan las estructuras tentativas de las bases aminadas de cadena larga de los cerebrósidos A y B.

Tabla 16

Estructuras tentativas de las bases aminadas que componen los cerebrósidos A y B de N.crassa.



Cerebrósido	nº C	n	R	1,2
A	17	2	H	
	18	3	H	
	19	4	H	
	20	5	H	insaturados
B	21	6	H	
	22	7	H	
	24	7	CH ₃	

La composición de las bases aminadas que integran los cerebrósidos es bastante variable. En el cerebro de los mamíferos predominan las esfingosinas (4-esfinguenina) y las dihidroesfingosinas de C₁₈ y C₂₀ (4-esfinganina y 4-eicosasfinganina) (311). La fitoesfingosina (4-hidroesfinganina) que al principio se creía que aparecía sólo en las plantas (93) es la base más importante de los glicoesfingolípidos del plasma sanguíneo

(115), de los riñones de mamíferos (328) y del intestino delgado (329). En los riñones de bovinos se detectaron pequeñas cantidades de esfingosinas de cadena ramificada, como 16-metil-dl7:1⁴-esfingosina (330).

En cuanto a los hongos, también se pensó que la fitoesfingosina era la única base que constituía a los cerebrósidos, y esto parece ser cierto en los Basidiomycetes, tales como Lactarius deliciosus, Amanita y Agaricus(307) (250), donde las fitoesfingosinas presentan sus cadenas de longitud variable, entre 17 y 22 átomos de C y también ramificadas. En Phycomices y Fusarium (243), también abundan estas bases, a pesar de ser estos hongos más primitivos que los anteriores. En Neurospora, de acuerdo con nuestros resultados, la fitoesfingosina no constituye a los cerebrósidos, esto coincide con lo que sucede en otros Ascomycetes como Hansenula (252) ó Candida (136) en los cuales, las bases más abundantes son también la esfingosina de C₂₀ y la dihidroesfingosina de C₁₈ y C₁₆, igual que en Neurospora. Sin embargo, Lester (141), cuando aisló la tetrahexosiceramida de Neurospora crassa, encontró que las fitoesfingosinas de C₁₈ y C₂₀ eran las bases que componían la ceramida en este glicoesfingolípido. También un estudio más profundo que el de Wagner (136) en la levadura del pan, hecho por Soumalainen (4) muestra que además de las esfingosinas y dihi-

droesfingosinas de C_{18} y C_{20} hay tambien fitoesfingosinas de C_{20} y C_{18} y dihidroesfingosinas de C_{20} en la mezcla de lípidos obtenida de una fracción de la columna de acido silícico, donde sólo eluyen cerebrósidos, esterilglucósidos y sulfátidos.

En todos los hongos imperfectos, a excepción de *Fusarium*, no existen las fitoesfingosinas como integrantes de los cerebrósidos, pero sí una variedad de esfingosinas y dihidroesfingosinas de cadena lineal y ramificada de longitud variable (271) (251) (191).

Es de hacer notar que en ninguno de los casos estudiados hasta el momento, aparece la 14-dimetil-dihidroesfingosina- - C_{22} (14-di- CH_3 -docosaesfinganina) propuesta en esta tesis para el cerebrósido B de *Neurospora crassa*.

V. GLICOESFINGOLÍPIDOS DE MAS DE UN AZUCAR

Los glicoesfingolípidos que tienen más de un azúcar en su molécula, son, como ya se ha dicho comunes en los tejidos animales, donde alguno de ellos cumplen funciones definidas. En la fig. 48 están representadas las relaciones estructurales de los glicoesfingolípidos según una clasificación hecha por Wiegandt (304). Las oligohexosiceramidas predominantes en riñones (199) (331) (332) y pulmones (312) (333) de mamíferos

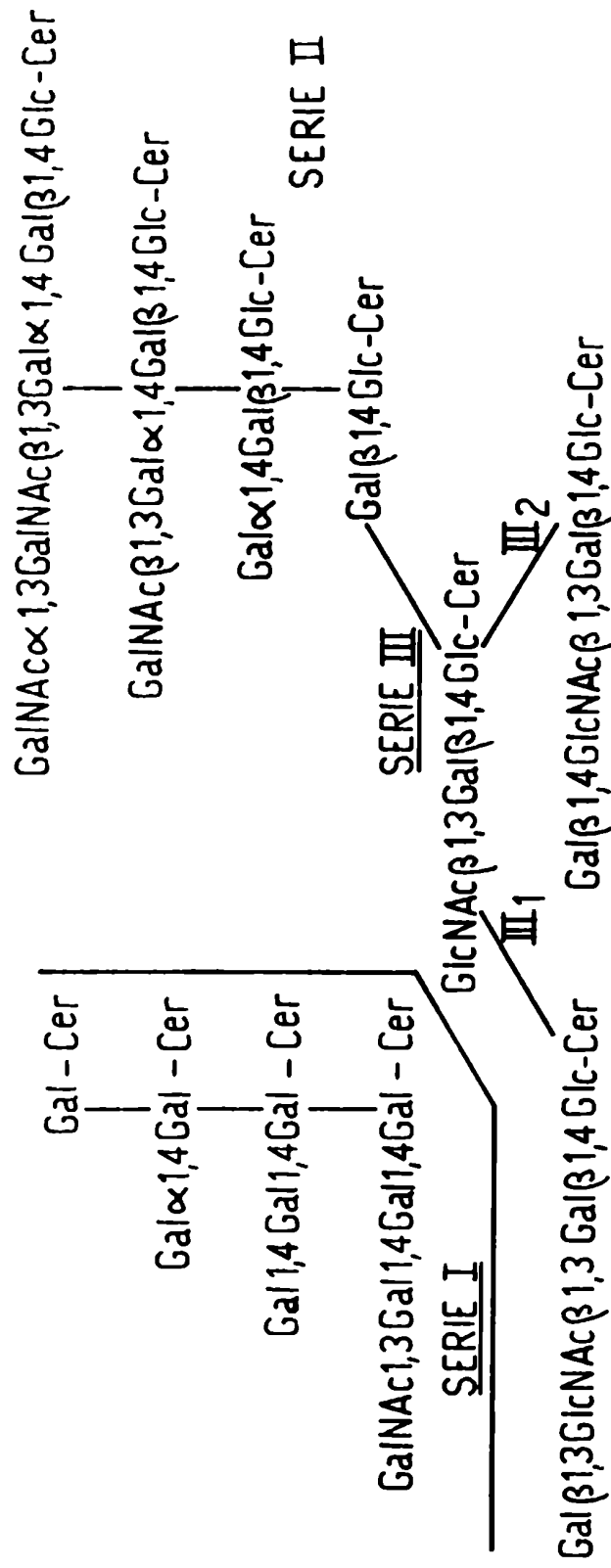


Figura 48: Relaciones estructurales entre glicosfingolipidos. (Tomado de Wiegandt, H. (304)).

pertenecen a las series I y II de dicha figura. En bazo, hígado y sangre la mayoría de los glicolípidos pertenecen a la serie II, pero es probable que existan componentes que pertenezcan también a la serie I (304). Los oligosacáridos semejantes a la porción de carbohidratos de los glicoesfingolípidos de la serie III (fig. 48) fueron aislados en principio como azúcares libres de leche humana y orina (334). La presencia de oligohexosiceramidas en el plasma humano fue estudiada por primera vez por Svennerholm y col. en 1963 (111) y Vance y Sweeley las caracterizaron posteriormente como glucosilceramida, lactosilceramida, galactosil galactosilglucosilceramida y globósido (N-acetilgalactosaminil galactosilgalactosilglucosilceramida) (115). Entre los invertebrados, se aisló recientemente una ceramida octasacárido, que contiene manosa 6-fosfato entre sus azúcares, en Corbicula sandai (molusco bivalvo) (336). En las plantas, en cambio, los glicoesfingolípidos encontrados presentan los oligosacáridos unidos a las ceramidas por un puente fosfodiéster (335), pero no se han descrito hasta el momento oligohexosiceramidas con unión de tipo glicósidica. En los hongos, fue Lester en 1974 (141) el primero que aisló precisamente en Neurospora crassa una tetrahexosiceramida identificándola como (gal₃glu) N-hidroxitetracononil-hidroxiesfinganina. (Tabla 6).

Ondrusék y Próstenik en 1978 (307) hacen referencia a la existencia de oligohexosiceramidas en los cuerpos de fructificación de Lactarius deliciosus, pero hasta el presente no hay otras evidencias en la bibliografía de la presencia de estas sustancias en hongos. Por eso, la aparición en las fracciones acetona y acetona:metanol, 1:1, de las columnas de ácido silícico y cloroformo:metanol, 7:3 de las columnas de DEAE celulosa, de compuestos no saponificables, con reacción positiva al orcinol, más polares que los cerebrósidos y con movilidad cromatográfica semejante a la de oligohexosiceramidas patrones, no sólo confirmaría lo descrito por Lester y col. (141), sino que aportan una prueba más en favor de la existencia de n-hexosiceramidas en hongos.

V. 1. Cromatografía en capa fina

La recromatografía en columnas de ácido silícico de estos compuestos, eluidos con un gradiente de metanol en cloroformo permitió separar por lo menos cuatro picos que se tiñeron positivamente con fenol-sulfúrico. (fig. 27). En la figura 49 se ve la cromatografía en capa fina de las sustancias aisladas de la columna de ácido silícico. Lamentablemente la escasez del material disponible impidió, hasta ahora la identificación exacta de los azúcares que componen estas sustancias. Por la movilidad cromatográfica en el solvente empleado se podrían tratar de por

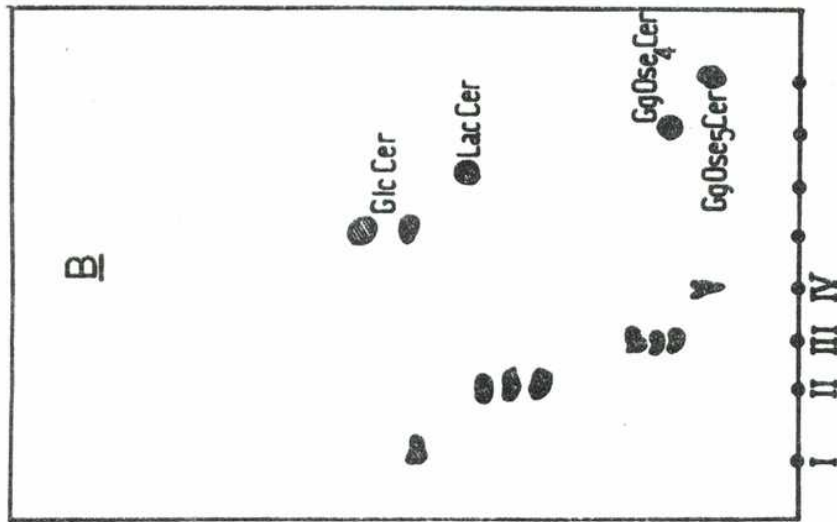
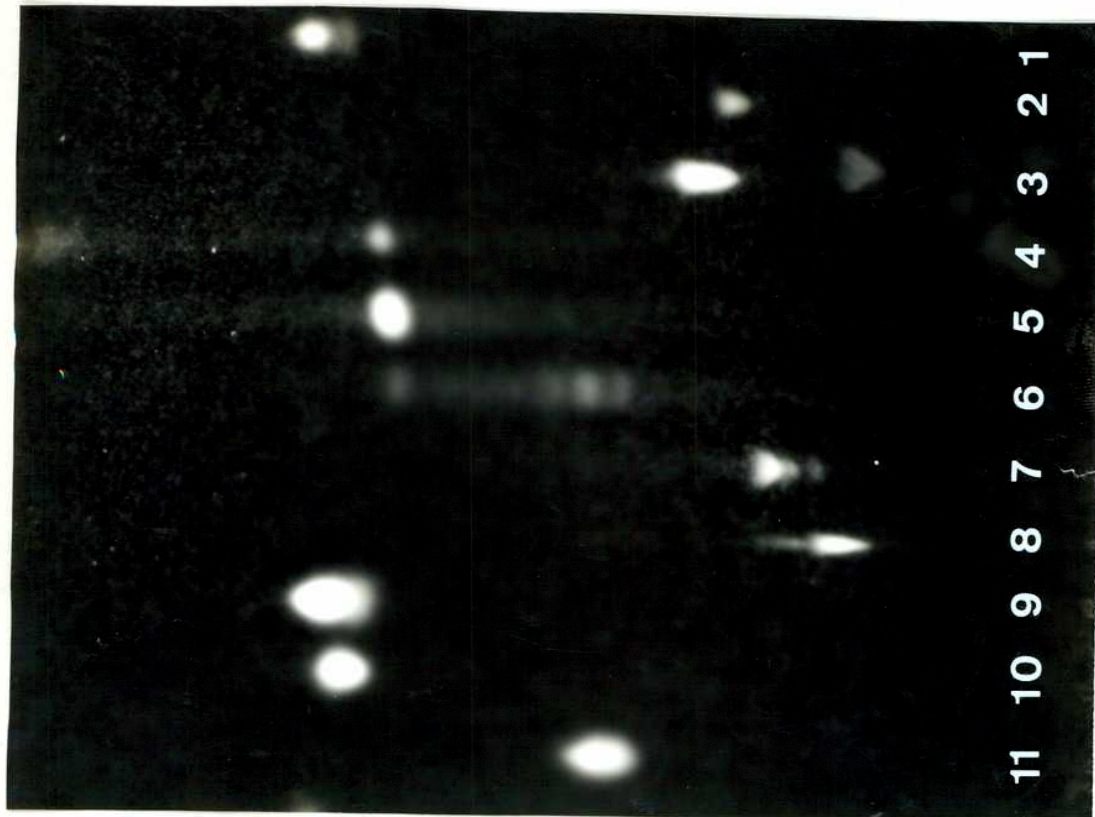


Figura 49: Cromatografía en capa fina de las fracciones eluídas de la columna de Unisil (fig.27). Solvente:C:M:A, 65:25:4. Coloración:orcinol-sulfúrico. I,II,III y IV corresponden a los respectivos picos de la fig.27. Patrones: GlcCer=glucosilceramida. Lac Cer= lactosilceramida. GgOse₄Cer y GgOse₅Cer = tetra y pentahexosiceramida patrón; 2= tetrahexosicer.; 3=pentahexosicer.; 4=fracción clorofórmica; 5=pico I de la columna; 6=pico II; 7= pico III, 8=pico IV; 9=glucosilceramida patrón; 10=esterilglucósido; 11=sulfátido.

lo menos una tri y una tetrahexosiceramidas esta última podría ser la descrita por Lester.

VI. ESTERILGLICOSIDOS

Los esterilglicósidos son lípidos no saponificables y los encontrados hasta el momento son 3-O- β -glucopiranosidos derivados de esteroides, principalmente del tipo del colesterol, sitosterol y estigmaesterol. Por otro lado también se conoce el 6-palmitoil- β -D-glucósido del β -sitosterol (34).

Son compuestos característicos de plantas como lo demuestran los trabajos de Eichemberg, Hou, Lavitmann y Cardini (35), (36), (37) y recientemente se los encontró en algas (45) y en el afrecho del arroz (338), pero en hongos sólo han sido identificados en Saccharomyces cerevisiae como componentes de las membranas plasmáticas por Baraud y col. (2) y por Työrinoja y col. (4). La biosíntesis de estos compuestos por una fracción particulada de la misma levadura ha sido descrita por Parodi (32).

En Neurospora no se había detectado hasta ahora la presencia de estos compuestos, ya que son difíciles de separar por los métodos cromatográficos usados comúnmente, de los glicoesfingolípidos del tipo de los cerebrósidos. Además estos dos tipos de compuestos eluyen juntos de las columnas de ácido silícico

con la fracción cloroformo:acetona,1:1, y acetona. Por otro lado en las columnas de intercambio iónico como DEAE-celulosa (forma acetato), no son retenidos, debido a sus propiedades neutras o de zwitterion y eluyen con la fracción cloroformo:metanol,9:1.

VI. 1. Cromatografía en capa fina

En las cromatografías en capa fina los esterilglicósidos cocromatografían también junto con los cerebrósidos en los solventes comunmente usados para identificar a estos últimos.

En la tabla 17 figuran las movilidades cromatográficas (R_f) de los esterilglicósidos aislados hasta el presente en hongos y los R_f de los cerebrósidos.

En *Neurospora*, la primera evidencia que se tuvo de la existencia de estos compuestos apareció en una cromatografía en capa delgada de rutina de identificación de los productos de la fracción cloroformo:acetona de una columna de ácido silícico. En dicha placa apareció una sustancia con R_f en la zona de los cerebrósidos (0,55-0,60) que se teñía con orcinol-sulfúrico de un color borravino semejante al del patrón de esterilglucósidos utilizado, en lugar de tomar el color lila-violáceo característico de los cerebrósidos. Además el color aparecía en los primeros minutos de calentamiento, en cambio en los cerebrósidos aparece más tarde.

Tabla 17

Movilidades cromatográficas (Rf) de esterilglicósidos y cerebrósidos.

SOLVENTE	ESTERILGLICOSIDO	CEREBROSIDO	REFERENCIA
cloroformo:metanol	0,32	0,21	(4)
9:1	0,37	0,31	
<hr/>			
cloroformo:metanol:agua 65: 25 : 4	0,73	0,70 0,76	(277)
	0,58	0,61 0,54	<u>Neurospora</u> <u>crassa</u> experimental
<hr/>			
cloroformo:metanol:agua:ácido fórmico 65:25:4:2			
a) muestras sin tratar	0,69	0,69	(32)
	0,575	0,60 0,545	<u>N.crassa</u> experimental
b) muestras hidrolizadas con KOH 1,5 N	0,78	0,36	(32)
	0,57	0,24	<u>N.crassa</u> experimental

Otra cromatografía en capa delgada, desarrollada en el solvente cloroformo:metanol, 9:1, de la fracción C:A de la columna de Unisil, reveló la presencia de sustancias que se teñían dife-

rencialmente de los cerebrósidos con ácido sulfúrico 50% (294). En este caso, el esterilglucósido patrón y algunas sustancias de la fracción C:A:,cloroformo:acetona tomaron color rojo-fucsia con el ácido a los pocos segundos de calentar las placas (menos de un minuto), mientras que los cerebrósidos patrón y aún los de *Neurospora* aparecían mucho después (5 min) y de color violeta. Para confirmar los resultados obtenidos, se aislaron por cromatografía preparativa, las sustancias que parecían ser esterilglicósidos y se sometieron a dos tipos de hidrólisis.

a) Hidrólisis alcalina. Se sabe que los tratamientos alcalinos fuertes deacilan los cerebrósidos sin afectar a los esterilglicósidos (313). La ceramida glucosa genera un compuesto, esfingosina-glucosa que en ciertos solventes, por ejemplo cloroformo:metanol:agua:ácido fórmico, 65:25:4:2, migra relativamente poco, mientras que el esterilglucósido aparentemente no es afectado por esta hidrólisis. Este es uno de los procedimientos que se siguieron para caracterizar los supuestos esterilglicósidos de *N. crassa* y cuyos resultados figuran en la tabla 17. El procedimiento seguido se encuentra descripto en Materiales y Métodos.

b) Hidrólisis ácida. El tratamiento con HCl 2 N durante 3-4 hs, permite en cambio la liberación de los esteroides, ácidos grasos y azúcares que constituyen la molécula. Los esteroides pueden entonces ser identificados en capa delgada por sus propiedades de

coloración y su movilidad cromatográfica comparándolas con muestras patrón. Las fracciones clorofórmicas obtenidas de esta hidrólisis que se suponía contenían a los esteroides fueron cromatografiadas en placa delgada y corridas en dos solventes diferentes, éter isopropílico: éter de petróleo (1:4) y en diclorometano junto con patrones de colesterol, β -sitosterol, geraniol y escualeno.

Las placas fueron rociadas con ácido sulfúrico 50% de acuerdo a Heftmann (294) y con un cronómetro se midió el tiempo de aparición de los colores, cuando las placas se colocaron sobre una plancha caliente a 78-80°C. Cada tipo de esteroide, según el estudio hecho por Heftmann, presenta un color característico con el calentamiento, 10 min. después otro hasta alcanzar el color definitivo. También presentan una fluorescencia determinada al UV a 365 nm.

En la tabla 18 se resumen los resultados obtenidos.

De los resultados obtenidos, se podría sugerir que los componentes esteroides de *Neurospora* podrían pertenecer al grupo de colesterol, β -sitosterol o escualeno.

VII. SULFOLIPIDOS

Estos compuestos han sido muy estudiados y se encuentran distribuidos ampliamente en los tejidos neurales y extraneurales de mamíferos. Ejemplos típicos de los mismos son los sulfá-

TABLA 18

RESULTADOS OBTENIDOS DE UNA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDROLISIS ACIDA DE LOS SUPUESTOS ESTERILGLICOSIDOS. SOLVENTE= DICLOROMETANO. TINCION= ACIDO SULFURICO 50%.

a: tiempo en segundos que tarda en aparecer el color. b: color inicial. c: color a los 10 min. de iniciado el calentamiento (80°C). d: color definitivo. e: fluorescencia al UV a 365 nm.

COMPUESTO	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>R_f</u>
colesterol	27	rosa	lila púrpura	verde	rosa fuerte	0,12
β -sitosterol	52	rosa	violeta púrpura	marrón	violáceo	0,12
geraniol	30	naranja	marrón	marrón	marrón	0,18
escualeno	47	castaño amarillo	lila	borra-vino	lila	
<u>Neurospora</u>	20	rosa	marrón	verde		0,12
<u>crassa</u>	50	amarillo	rojizo amarillo		verde	0,15
	65	rosa amarillento	violeta	marrón	violeta	0,72

tidos de cerebro (102) y los sulfogalactoglicerolípidos de testículos de rata, (25) (27). Los sulfolípidos están también asociados a receptores de opiáceos (177) y a la actividad ATPasa de membranas dependiente de Na^+ y K^+ (149). En hongos sólo han sido descritos en Saccharomyces cerevisiae como componentes de la pared celular (4) y de membranas (2).

En el presente trabajo se hicieron dos tipos de estudios con el objeto de detectar la presencia de estos compuestos en Neurospora crassa. En uno de ellos se cultivó el hongo en presencia de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ según las condiciones descritas en Materiales y Métodos y por medio de técnicas cromatográficas, autoradiografías e hidrólisis, se intentó detectar la existencia de los mismos. En el otro caso se trató de detectar directamente su presencia en fracciones provenientes de cromatografías en columnas de ácido silícico de extractos lipídicos del hongo.

VII. 1. Biosíntesis de sulfolípidos con S^{35} .

Una vez obtenido, el micelio que fue previamente marcado al tiempo cero con S^{35} se liofilizó y extrajo según el método de Folch y col. (273). El material soluble en la fase orgánica fue fraccionado en una columna de ácido silícico y se lo eluyó secuencialmente con cloroformo, (10 vol.), acetona (30 vol.)

y metanol (10 vol.). La metodología seguida está descrita en Materiales y Métodos.

Alícuotas de las fracciones acetona y metanol junto con alícuotas patrones de sulfátidos y sulfogalactoglicerolípidos obtenidos en nuestro laboratorio a partir de extractos de cerebro y de testículos de rata respectivamente, se sometieron a tres tipos de hidrólisis.

a.- Saponificación: KOH 0,1 N en metanol dos horas a 37°C.

Se neutralizó con ácido perclórico.

b.- Hidrólisis a pH 2: HCl 0,01 N en propanol:agua,1:1, a 100°C por 10 min.

c.- Metanólisis: HCl 0,5 N, 65°C, 30 min.

La manera en que se realizaron las hidrólisis están descritas en Materiales y Métodos. Los productos de estas hidrólisis junto con muestras sin hidrolizar se cromatografiaron en placas de silicagel G y cada una fue corrida en un sistema de solventes diferente:

a.- Cloroformo:metanol:agua,65:25:4 (290).

b.- Cloroformo:metanol:amoníaco,66:30:5 (289).

c.- Cloroformo:metanol:acetona:ácido acético:agua,10:2:4:2:1. (290).

Luego de ello las placas se autoradiografiaron durante 14 días y las autoradiografías se revelaron según la técnica descrita en Materiales y Métodos. (Figura 50).

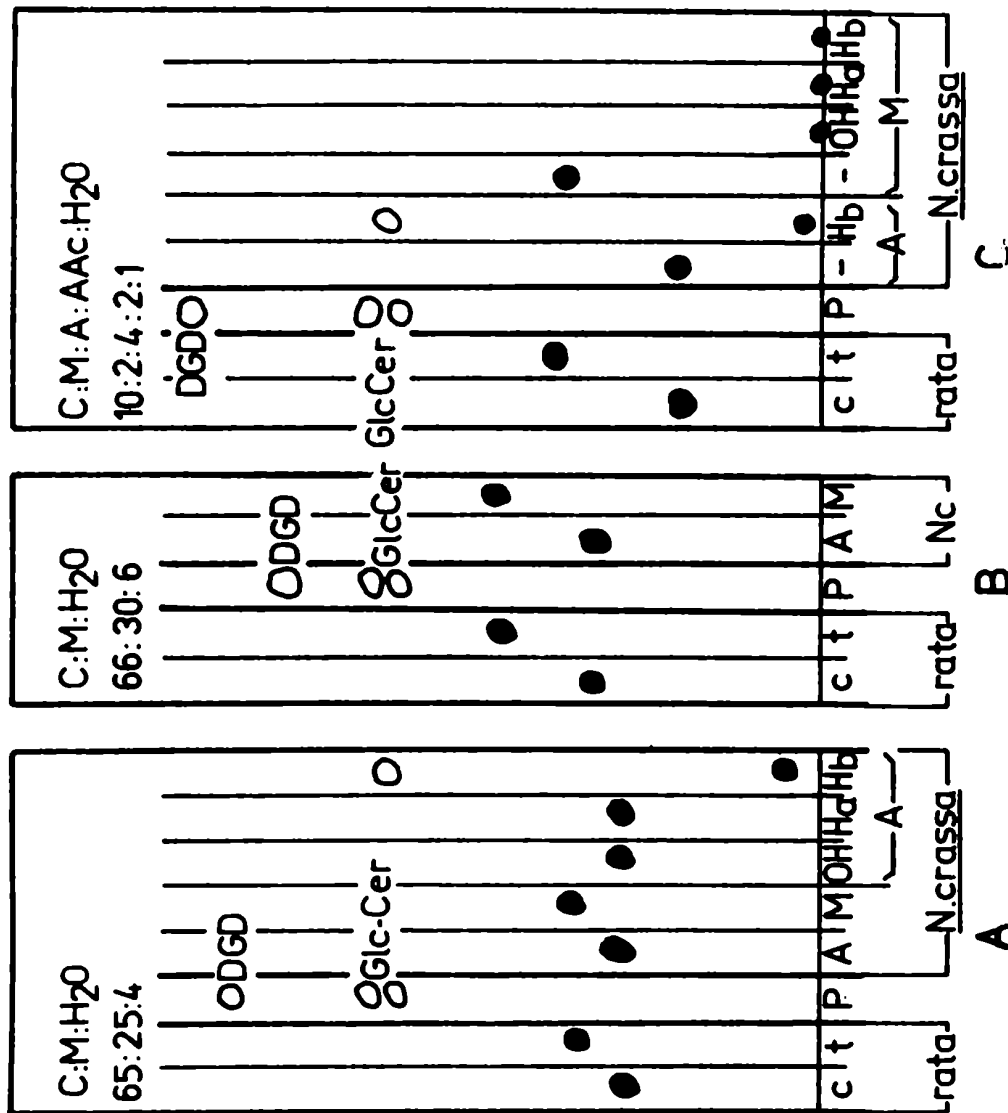


Figura 50: Cromatografía en capa fina de sulfolípidos patrones y de N.crassa corridos en tres sistemas de solventes diferentes. Las referencias están en la tabla 19.

SOLVENTE	Revelado	rata		Patrones			N. crassa							
		c	t	GlcCer	DGD	GalCerS	A				B			
							-	OH	H _a	H _b	-	OH	H _a	H _b
CM:H ₂ O	Or	.25	.31	.57	.75	.23	.25			.57				
65:25:4	AR	.25	.31				.25	.25	.25	.01	.31	0	0	0
CM:H ₂ O	Or	.30	.43	.57	.71	.28	.30			.57				
66:30:6	AR	.30	.43				.30	.30	.30		.43			
C.M.A:AAc:H ₂ O	Or	.18	.34	.57	.82		.18			.57				
10:2:4:2:1	AR	.18	.34				.18	.18	.18		.34			

Tabla 19: Movilidad cromatográfica de sulfolípidos en tres sistemas diferentes de solventes. Solventes: C:M:H₂O=cloroformo:metanol:agua. C:M:A:AAc:H₂O=cloroformo:metanol:acetona:ácido acético:agua. c=sulfátido de cerebro de rata. t=sulfogalactoglicerolípidos de testículo de rata. Patrones: GlcCer=glucosilceramida. GalCer-S=galactosilceramida sulfato. DGD=digalactosildiglicérido. Or=coloración de orcinol-sulfúrico. Ar=autoradiografía. A=fracción acetona. M=fracción metanol. OH⁻ = saponificación. Hb=hidrólisis a pH 2. Hc=metanólisis ClH 0,5 N.

Posteriormente, las placas fueron teñidas con orcinol y se calcularon los R_f .

Del revelado de las autoradiografías y del teñido de las placas (Fig. 50) puede concluirse que en los tres sistemas de solventes empleados, tanto la fracción acetónica como la metanólica de Neurospora crassa, presentan manchas radiactivas cuyo R_f coincide con el correspondiente a las marcas radiactivas de sulfolípidos de cerebro y testículo de rata respectivamente. (Fig. 50 b y tabla 19). Las hidrólisis de estos compuestos muestran que en la fracción acetónica de Neurospora crassa, la sustancia que cocromatografía con el sulfátido de cerebro de rata es insensible a la saponificación y también a la hidrólisis ácida débil, mientras que una hidrólisis más fuerte determina que la mancha radiactiva se desplace cercana al origen. (Fig. 50a). En la fracción metanólica en cambio puede observarse que la radiactividad desaparece o es desplazada hacia el origen con cualquiera de las hidrólisis empleadas, esto implica la existencia de un compuesto mucho más sensible, típico de un sulfoglicoglicerolípido. (Fig. 50c).

VII. 2. Detección directa en cromatografía antes y después de la hidrólisis ácida fuerte.

De la fracción acetona y/o acetona:metanol de las muestras

no radiactivas de N.crassa se pudo identificar un compuesto con las mismas características cromatográficas del sulfátido patrón (Supelco) y del sulfátido del cerebro de rata. Esa sustancia fue purificada de la fracción acetona o acetona:metanol por medio de cromatografías preparativas en capa delgada y una vez purificada se sometió, junto con el sulfátido patrón a una hidrólisis ácida fuerte, a saber, HCl 0,5 N, 30 min., 65°C. El producto de estas hidrólisis fue cromatografiado, luego de eliminar el HCl por evaporación repetida bajo presión de N₂, en el solvente cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. La cromatografía fue posteriormente teñida con orcinol-sulfúrico y el resultado puede verse en la figura 51. Evidentemente la hidrólisis fue suficiente para romper la unión éster con el sulfato y cambió la movilidad de la sustancia que ahora se comporta como una glicosilceramida.

Como conclusión puede decirse que en Neurospora crassa hay por lo menos dos compuestos con características de sulfolípidos, uno sería del tipo de los sulfátidos y el otro se asemeja a un sulfoglicoglicerolípido.

VIII. Biosíntesis de glicolípidos con glucosa C¹⁴.

El micelio liofilizado después de la incubación con glucosa C¹⁴ fue procesado de modo semejante al micelio frío y la fase

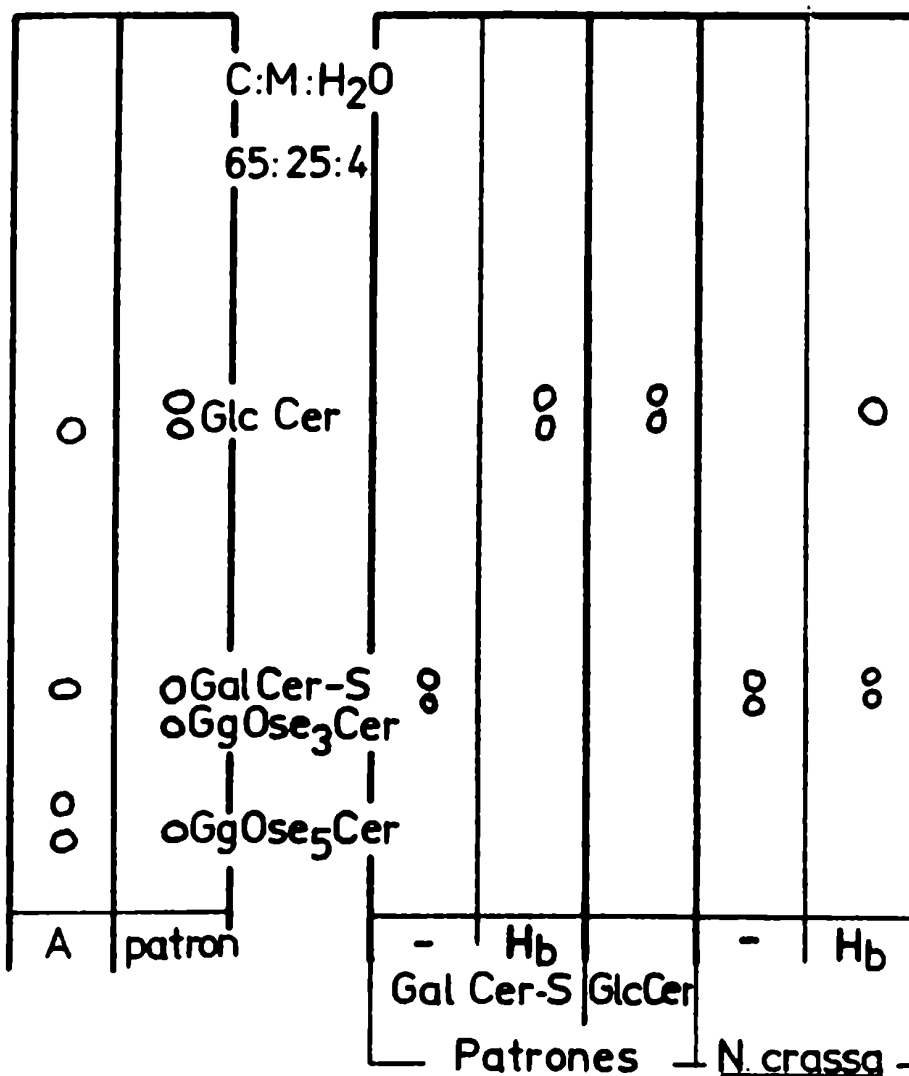


Figura 51: Cromatografía en capa fina de sulfátidos patrón (GalCer-S) y de *Neurospora crassa*, fracción acetónica (A), sometidos a hidrólisis ácida (Hb). Coloración: orcinol-sulfúrico. Patrones: GlcCer=glucosilceramida. GgOse₃Cer=trihexosilceramida. GgOse₅Cer=pentaglicosilceramida.

inferior de la partición de Folch se pasó por una columna de Unisil y se eluyó con cloroformo, cloroformo:acetona, acetona, acetona:metanol y metanol.

La fracción acetona y acetona:metanol fueron evaporadas y sembradas junto con patrones fríos en placas Merck de silica-gel G y corridas en cloroformo:metanol:agua, 65:25:4. Posteriormente las placas se autoradiografiaron de la manera usual descrita, durante 7 a 10 días. Una vez transcurrido el plazo, la autoradiografía se reveló y la placa se tizó con orcinol-sulfúrico.

La aparición de radiactividad en las placas coincidió con la región en la cromatografía en capa fina que daba reacción positiva con el orcinol y cuya movilidad cromatográfica en el solvente usado era semejante a la de los cerebrósidos usados como patrón. (Fig.23).

Aparentemente la biosíntesis de estos glicolípidos es un proceso metabólico normal en los cultivos exponenciales de Neurospora crassa, y seguiría uno de los dos caminos metabólicos de biosíntesis propuesto para este tipo de compuestos, a saber: acilación de una base de cadena larga seguida de glucosilación o glucosilación de una base aminada para formar gluco-esfingosina seguida de acilación (Fig. 18).

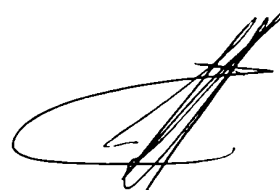
CONCLUSIONES

De los experimentos realizados en esta Tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- El análisis de los lípidos totales del micelio de Neurospora crassa corroboró la existencia de lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos y la ausencia de gangliósidos.
- 2.- Se demostró por primera vez en Neurospora la existencia de glicolípidos neutros del tipo de las mono y oligohexosiceramidas.
- 3.- Las monohexosiceramidas se identificaron
 - a) en capa fina por su movilidad cromatográfica en distintos solventes, utilizando como patrones cerebrósidos conocidos;
 - b) por ser insaponificables;
 - c) por su colorabilidad con orcinol-sulfúrico y fenol-sulfúrico y
 - d) por la formación del compuesto esfingosina-glucosa cuando se las sometió a hidrólisis alcalina fuerte.
- 4.- Analizada por cromatografía en papel y cromatografía gaseosa, la fracción glicosídica de los cerebrósidos demostró ser la glucosa.

- 5.- Las determinaciones por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa de los ácidos grasos que constituyen los cerebrósidos de Neurospora crassa evidenciaron la presencia de ácidos palmítico, esteárico y oleico en el cerebrósido A y ácidos palmítico, esteárico, oleico, hidroxiesteárico e hidroxioleico en el cerebrósido B.
- 6.- El análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa de las bases aminadas de cadena larga indicaron la existencia de dihidroesfingosinas de cadena lineal y ramificada cuya longitud varía entre 17 y 24 átomos de Carbono.
- 7.- Los distintos pasos de purificación de glicolípidos neutros seguidos en esta tesis llevaron a demostrar la existencia en este hongo de un grupo de compuestos que, por su movilidad cromatográfica comparando con patrones conocidos, su sensibilidad al orcinol-sulfúrico y fenol-sulfúrico y su resistencia a la saponificación, pueden considerarse ceramidas unidas glicosídicamente a más de un azúcar.
- 8.- La probable existencia de esterilglicósidos en N.crassa ha sido evidenciada sometiendo a estos compuestos a hidrólisis alcalinas y ácidas y tiñendo diferencialmente los componentes lipídicos.
- 9.- Se presentaron además evidencias de la existencia en N.crassa

de glicolípidos sulfatados. El enfoque experimental utilizado fue la marcación con precursores radiactivos y su posterior detección por autoradiografía.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Aueff'.A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by several diagonal strokes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Carter, H.E.; Mc Cluer, R.H.; Slifer E.D. (1956). J. Am. Chem. Soc. 78: 3735.
- 2.- Baraud, J.; Maurice, A.; Napias C. (1970). Bull. Soc. Chim. Biol. 52: 421.
- 3.- Mills, G.L.; Cantino E.C. (1974), J. Bact. 118: 192.
- 4.- Työrinoja R.K.; Nurminen, T.; Suomalainen, H. (1974). Biochem. J. 141: 133.
- 5.- Brennan, P.J.; Lösel, D. (1978). Physiology of Fungal Lipids: Selected Topics. En Advances in Microbial Physiology. 17: 47-179.
- 6.- Stein, J.M.; Benson, A.A. (1963). Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 22: 299.
- 7.- Norton, W.T.; Brotz, M. (1963). Biochem. Biophys. Res. Commun. 12: 198.
- 8.- Rouser, G.; Kritchevsky, G.; Yamamoto, A. (1967). En Lipid Chromatographic Analysis. (G.V. Marinetti, ed.) 1: 99-162. Dekker, New York.
- 9.- Rumsby, M.G. (1967). J. Neurochem. 14: 733.
- 10.- Rumsby, M.G.; Rossiter, R.J. (1968). J. Neurochem. 15: 1473.
- 11.- Wells, M.A.; Dittner, J.C. (1966). Biochemistry (N.Y.) 5: 3405.

- 12.- Sidman,R.L.; Dickie,M.M.; Appel,S.H. (1964). Science. (N.Y.)
144: 309.
- 13.- Deshmukh,D.S.; Inoue,T.; Pieringer,R.A. (1971). J.Biol.Chem.
246: 5695.
- 14.- Deshmukh,D.S.; Flynn,T.J.; Pieringer,R.A. (1974).J.Neurochem.
22: 479.
- 15.- Benson,A.A.; Wiser,W.;Ferrari,R.A.; Miller,J.S. (1958).J.
Am. Chem. Soc. 80: 4740.
- 16.- Benson,A.A.; Ferrari,R.A. (1959). Fed. Proc. 18: 159.
- 17.- Benson,A.A.; Wiser,W. (1959). Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A.
45: 1582.
- 18.- Greenwood,A.D.; Leech,R.M.; Williams, J.P. (1963). Biochim.
Biophys. Acta. 78: 148.
- 19.- Bailey,J.L.; Whyborn,A.G. (1963). Biochim.Biophys. Acta 78:
163.
- 20.- Benson,A.A. (1963). Adv. Lipid.Res. 1: 387.
- 21.- Davies,W.H.; Mercer,E.J.; Goodwin,T.W. (1963). Biochem. J.
88: 63 P.
- 22.- Kates,M.; Palameta,B.; Perry,M.B.; Adams,G.A. (1967).
Biochim.Biophys. Acta. 137: 213.
- 23.- Kates,M.(1972). En The Ether Bond in Lipids.(F.Snyder,ed.)
Acad. Press, New York. pg. 351-398.
- 24.- Goren,M.B. (1970). Biochim. Biophys. Acta 210: 127.

- 25.- Kornblatt, M.J.; Schachter, H.; Murray, R.K. (1972). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 1489.
- 26.- Ishizuka, I.; Suzuki, M.; Yamakawa, T. (1974). *J. Biochem. (Tokio)* 73: 77.
- 27.- Murray, R.K.; Levine, M.; Kornblatt, M.J. (1976). Cap. XIV pg. 305-329. En *Glycolipid Methodology* (L.A. Witting, ed.) Am. Oil Chemists' Soc. Champaign, Illinois.
- 28.- Levine, M.; Kornblatt, M.J.; Murray, R.K. (1974). *Fed. Proc.* 33: 1226.
- 29.- Mentaberry, A. (1981). Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.
- 30.- Levine, M.; Kornblatt, M.J.; Murray, R.K. (1975). *Canad. J. Biochem.* 53: 679.
- 31.- Esders, T.W.; Light, R.J. (1972). *J. Biol. Chem.* 247: 7494.
- 32.- Parodi, A. (1976). *Acta Physiol. Latin.* 26: 430.
- 33.- Power, F.B.; Salway, A.H. (1913). *J. Chem. Soc.* 103: 339.
- 34.- Le Page, M. (1964). *J. Lipid Res.* 5: 587.
- 35.- Eichenberger, W.; Newman, D.W. (1968). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32: 366.
- 36.- Hou, C.T.; Umemura, Y.; Nakamura, M.; Funahashi, S. (1968). *J. Biochem. (Tokio)*. 63: 351.
- 37.- Lavintman, N.; Cardini, C.E. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 201: 508.
- 38.- Katamaya, M.; Kato, H. (1973) *Plant. and Cell Physiol.* 14: 681.

- 39.- Galliard, T. (1968). *Phytochem.* 2: 1907.
- 40.- Grunwald, C. (1970). *Plant Physiol.* 45: 663.
- 41.- Bush, P.B.; Grunwald, C.; Davis, D.L. (1971) *Plant Physiol.* 47:
745.
- 42.- Adler, G.; Kasprzyk, Z. (1975). *Phytochem.* 14: 527.
- 43.- Grunwald, C. (1968). *Plant Physiol.* 43: 484.
- 44.- Eichenberger, W.; Menke, W. (1966). *Naturforsch.* 216: 859.
- 45.- Sakamoto, N.; Enomoto, N. (1978). *Saga Daigaku Nogaku Iho* 45:
127.
- 46.- Haskins, R.H.; Thorn, J.A.; Boothroyd, B. (1955). *Can. J.*
Microbiol. 1; 749.
- 47.- Boothroyd, B.; Thorn, J.A.; Haskins, R.H. (1956). *Can. J. Biochem.*
Physiol. 34: 10.
- 48.- Fluharty, A.L.; O'Brien, J.S. (1969). *Biochemistry* 8: 2627.
- 49.- Esders, T.W.; Light, R.J. (1972 b) *J. Biol. Chem.* 247: 1375.
- 50.- Laine, R.A.; Griffin, P.F.; Sweeley, C.C.; Brennan, P.J. (1972).
Biochemistry, 11: 2267.
- 51.- Byrne, P.F.; Brennan, P.J. (1974) *Biochem. Soc. Trans.* 2: 1346.
- 52.- Kates, M. (1972). *Techniques of Lipidology. En Laboratory*
Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 3,
part II (T.S. Work, E. Work, ed) pg. 320-329. North Holland-
Amsterdam.
- 53.- Op den Kamp, J.A.; Bosen, P.P.; Van Denen, L.L. (1969). *Biochim.*
Biophys. Acta. 176: 298.

- 54.- Lee, Y.C.; Ballou, C.E. (1964). *J. Biol. Chem.* 239: 1316.
- 55.- Beytia, E.D.; Porter, J.W. (1976). *Ann. Rev. Biochem.* 45: 113.
- 56.- Hemming, F.W. (1974). En *Biochemistry of Lipids* (Goodwin, ed.)
4: 39. Butterworths and University Park Press; Londres,
Baltimore.
- 57.- Stone, J.J.; Butterworth, P.A.; Hemming, F.W. (1967). *Biochem.*
J. 102: 443.
- 58.- Dunphy, P.J.; Kerr, J.B.; Pennock, J.F.; Whittle, K.J.; Feeney, J.
(1967). *Biochim. Biophys. Acta.* 136: 136.
- 59.- Horecker, B.L. (1972). Pan-American Association of Biochemical
Soc. *Revista* 1: 47.
- 60.- Lennarz, W.J.; Scher, M.G. (1972). *Biochim. Biophys. Acta.* 265:
417.
- 61.- Anderson, J.S.; Matsushashi M.; Haskin, M.A.; Strominger, J.L.
(1965). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53: 881.
- 62.- Wright, A.; Dankert, M.; Fennesey, P.; Robbins, P.W. (1967). *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57: 1798.
- 63.- Wright, A.; Dankert, M.; Robbins, P.W. (1965). *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U.S.A. 54: 235.
- 64.- Robbins, P.W.; Bray, D.; Dankert, M.; Wright, A. (1967). *Science* 158:
1536.
- 65.- Lennarz, W.J. (1975). *Science* 188: 986.
- 66.- Parodi, A.J.; Leloir, L.F. (1979). *Biochim. Biophys. Acta.* 559: 1.

- 67.- Behrens,N.H.;Leloir,L.F. (1970). Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.
66: 153.
- 68.- Burgos,J.;Hemming,F.W.;Pennock,J.F.;Morton,R.A. (1963).
Biochem.J. 88: 470.
- 69.- Behrens,N.H.;Parodi,A.J.;Leloir,L.F.;Krisman,C.R. (1971).
Arch.Biochem. Biophys. 143: 375.
- 70.- Tetas,M.;Chao,H.;Molnar,J. (1970).Arch.Biochem.Biophys.
138: 135.
- 71.- Behrens,N.H.;Carminatti,H.;Staneloni,R.J.;Leloir,L.F.;
Cantarella,A.I. (1973). Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.70: 3390.
- 72.- Levy,J.A.;Carminatti,H.;Cantarella,A.;Behrens,N.;Leloir,L.F.;
Tabora,E. (1974). Biochem.Biophys.Res.Commun. 60: 118.
- 73.- Lehle,L.;Tanner,W. (1975). Biochim.Biophys. Acta. 399: 364.
- 74.- Nakayama,K.;Araki,Y.;Ito,E. (1976). FEBS Letters 72: 287.
- 75.- Parodi,A.J. (1978). Eur.J.Biochem. 83: 253.
- 76.- Li,E.;Tabas,I.;Kornfeld,S. (1978). J.Biol.Chem. 253: 7762.
- 77.- Schachter,H. (1981) en Lysosomes and Lysosomal Storage
Diseases (J.W.Callahan,J.A.Lowden,ed.) Raven Press,New York,
pg.73-93.
- 78.- Thudichum,J.L. (1874).Rep.Med.Officer,(Londres) 3: 113.
- 79.- Klenk,E. (1935). Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 235: 24.
- 80.- Landsteiner,K.;Levene,P.A. (1925). J.Immunol. 10; 731.
- 81.- Walz,E. (1927 a).Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 166: 210.

- 82.- Walz,E. (1927 b). Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 166: 223.
- 83.- Blix,G. (1939). Scand.Arch.Physiol. 80: 46.
- 84.- Klenk,E. (1942).Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 273: 76.
- 85.- Yamakawa,T.;Suzuki,S.(1951).J.Biochem.(Tokio) 38: 199.
- 86.- Svennerholm,L. (1962). Biochem.Biophys. Res. Commun. 9: 436.
- 87.- Kuhn,R.;Wiegandt,H.(1964). Z. Naturforsch.Teil 3: 19: 80.
- 88.- Korey,S.R.;Gonates,J. (1963). Life Sci. 2: 296.
- 89.- Klenk,E.;Lauenstein,K. (1952). Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 291: 249.
- 90.- Yamakawa,T.;Suzuki,S. (1952). J. Biochem. (Tokio) 39: 383.
- 91.- Rapport,M.M.;Graf,L.;Schneider,H. (1964).Arch.Biochem.
Biophys. 105: 431.
- 92.- Carter,H.E.;Glick,F.J.;Norris W.P.; Phillips,G.E. (1947).
J. Biol. Chem. 170: 285.
- 93.- Carter,H.E.;Cilmer,W.H.;Lands,W.E.;Müller,K.L.;Tomisawa,
H.H. (1954). J.Biol.Chem. 206: 613.
- 94.- Karlsson,K.A. (1964) Acta Chem.Scand. 18: 2397.
- 95.- Radin.N.S.; Akohori,Y. (1961). J. Lipid Res. 2: 335.
- 96.- Klenk,E.;Gielen,W. (1961). Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.
326: 144.
- 97.- Rapport,M.M.;Skipski,V.P.;Sweeley,C.C. (1961). J.Lipid Res.
2: 148.
- 98.- Dawson,G.;Sweeley,C.C. (1970), J.Biol.Chem. 245: 410.
- 99.- Karlsson,K.A. (1970). Lipids 5: 878.

- 100.- Kuhn,R.;Wiegandt,H. (1963). Z.Naturforsch,Teil B. 18: 541.
- 101.- Kuhn,R. Wiegandt,H. (1963). Chem. Ber. 96: 866.
- 102.- Norton,W.T.;Autilio,L.A. (1966).J.Neurochem. 13: 213.
- 103.- O'Brien,J.S.;Sampson,E.L. (1965). J.Lipid Res. 6: 537.
- 104.- Martensson,E. (1966). Biochim.Biophys. Acta 116: 521.
- 105.- Folch,J.;Le Baron,F.W. (1957). En Metabolism of the Nervous System. (D.Richter ed.) pg. 67.Pergamon Press.Oxford..
- 106.- Halliday,N.;Denel,H.J.;Tragerman,L.J.;Ward,W.E. (1940). J.Biol.Chem. 132: 171.
- 107.- Klenk,E.;Rennkamp,F.(1942). Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 273: 253.
- 108.- Klenk,E.;Lauenstein,K. (1953),Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 295: 164.
- 109.- Sweeley,C.C.;Klionsky,B.(1963).J.Biol.Chem. 238: PC 3148.
- 110.- Makita,A. (1964). J.Biochem. (Tokio) 55:269.
- 111.- Svennerholm,E.;Svennerholm,L. (1963). Biochim.Biophys. Acta.70: 432.
- 112.- Yamakawa,T. (1966). Colloq.Ges.Physiol.Chem. 16: 87.
- 113.- Siyama.Y.;Yamakawa,T. (1974). J.Biochem. (Tokio) 75: 837.
- 114.- Klenk,E.;Lauenstein,K.(1951). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 288: 220.
- 115.- Vance,D.E.;Sweeley,C.C. (1967).J.Lipid Res. 8: 621.
- 116.- Rapport,M.M.;Schneider,H.;Graf,L. (1967). Biochim.Biophys. Acta.137: 409.

- 117.- Suzuki,K.;Chen,G. (1967). J.Lipid Res. 8: 105.
- 118.- Forssman,J. (1911). Biochem.Z. 34: 78.
- 119.- Gahmberg,C.G.;Hakomori,S. (1975). J. Biol.Chem. 250: 2438.
- 120.- Thudichum,J.L.W., (1884). The Chemical Constitution of the Brain. Bailliere. Londres, Archon.Books, Hamden Connecticut.pag. 1962.
- 121.- Martensson,E. (1963) Acta Chem. Scand. 17: 1174.
- 122!.- Slomiany,B.L.;Slomiany,A.;Horowitz,M.I. (1974). Biochim. Biophys.Acta 348: 398.
- 123.- Blix,G.(1933) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.219: 82.
- 124.- Ledeen,R.;Yu,R.K.;Eng,L.F. (1973). J.Neurochem. 21: 829.
- 125.- Booth,D.A.;Goodwin,H.;Cummings,J.N. (1966).J.Lipid Res. 7: 337.
- 126.- Ledeen,R.;Salsman,K.;Cabrera,M.(1968). Biochemistry 7: 2287.
- 127.- Tao,R.V.P.; Sweeley,C.C.;Jamieson,G.A, (1973). J.Lipid Res. 14: 16.
- 128.- Puro,K. (1969). Biochim.Biophys. Acta. 189: 401.
- 129.- Klenk,E.;Naoi,M. (1968) Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.349: 288.
- 130.- Svennerholm,L. (1963). J. Neurochem. 10: 613.
- 131.- Wiegandt,H.(1973). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.354: 1049.
- 132.- Tao,R.V.P.;Sweeley,C.C. (1970).Biochim.Biophys. Acta 218: 372.
- 133.- Dawson,G.;Krusky,A.W.;Scanu,A.M. (1976). J.Lipid Res.17: 125.
- 134.- Stein,K.;Marcus,D. (1977).Biochemistry 16: 5285.

- 135.- Carter, H.E.; Strobach, D.R.; Hawthorne, J.N. (1969). *Biochemistry* 8: 383.
- 136.- Wagner, H.; Zofcsik, W. (1966 b). *Biochem. Z.* 346: 343.
- 137.- Steiner, M.R.; Lester, R.L. (1969). *Biochemistry* 9: 63.
- 138.- Smith, S.W.; Lester, R.L. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 3395.
- 139.- Nurminen, T.; Suomalainen, H. (1971). *Biochem. J.* 125: 963.
- 140.- Trevelyan, W.E. (1968). *J. Inst. Brewing.* 74: 365.
- 141.- Lester, R.L.; Smith, S.W.; Wells, G.B.; Rees, D.C.; Angus, W.W. (1974), *J. Biol. Chem.* 249: 3388.
- 142.- Hackett, J.A.; Brennan, P.J. (1977). *FEBS Letters* 74: 259.
- 143.- Byrne, P. F. S.; Brennan, P.J. (1976). *Biochem. Soc. Trans.* 4: 893.
- 144.- Dearborn, D.G.; Smith, S.; Korn, E.D. (1976). *J. Biol. Chem.* 251: 2976.
- 145.- Lederkremer, R.M.; Casal, O.L.; Tanaka, C.; Colli, W. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 1268.
- 146.- Adams, G.; Singh, P.P. (1970). *Biochim. Biophys. Acta.* 202: 553.
- 147.- Singer, S.J. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43: 805.
- 148.- Renooij, W.; van Golde, L.M.; Zwaal, R.F.; van Deenen L.L.M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61: 53.
- 149.- Karlsson, K.A. (1976) *Structure of Biological Membranes* (Abrahamsson S.; Pascher, I. ed). Plenum Press. New York. pag. 245-274.
- 150.- Yamakawa, T.; Nagai, Y. (1978). *TIBS* 3: 128.

- 151.- Lee,A.G. (1977). TIBS 2: 231.
- 152.- Karlsson, K.A.;Samuelsson,B.E.;Steen,G.O. (1974) Eur.J. Biochem.46: 243.
- 153.- Glynn,I.M.;Karlsh,S.J.D. (1975). Ann.Rev.Physiol. 37: 13.
- 154.- Jorgensen,P.L. (1975). Quart. Rev.Biophys. 7: 239.
- 155.- Elbein,A.D.;Forsee,W.T. (1976).Cap. XVI en Glycolipid Methodology(L.A. Witting ed.)AM.Oil.Chem. Soc. Champaign. Illinois.pgs.345-391.
- 156.- Okaya,Y. (1964). Acta Cryst. 17: 1276.
- 157.- Nagai,Y.; Hoshi,M. (1975). Biochim.Biophys Acta. 388: 146.
- 158.- Levine,M.;Narasimhan,R;Yates,A.;Bain,J.;Murray,R.K. (1975) Proc. Canad. Fed.Biol.Soc. 18: 143.
- 159.- Yanagimachi,R.;Noda,Y.D.;Fujimoto,M.;Nicolson,G. (1972).Am. J.Anat. 135: 497.
- 160.- Bedford,J.M. (1970).Biol. Reprod. 2: 128.
- 161.- Yang,C.H.; Srivastava,P.N. (1974). Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 145: 721.
- 162.- Van Heyningen,W.E.; (1974). Nature 249: 415.
- 163.- Craig,S.W.; Cuatrecasas,P. (1975). Proc. Natl. Acad.Sci. USA 72: 3844.
- 164.- Sedlacek,H.H.; Stärk,J.; Seiler,F.R.; Ziegler,W.; Wiegandt,H. (1976). FEBS.Letters 61: 272.
- 165.- Cuatrecasas,P. (1974). Ann.Rev.Biochem. 43: 169.
- 166.- Van Heyningen,W.E. (1963). J. Gen.Microbiol. 31: 375.

- 167.- Simpson,L.L.;Rapport,M.M. (1971). J.Neurochem. 18: 1341.
- 168.- Kato,I.; Naiki,M. (1976). Infect. Immunol. 13: 289.
- 169.- Tiffany,J.M. (1977).En Virus Infection and the Cell Surface. Cell Surface Rev. Vol. 2. Poste,(G. Nicolson, G.L. ed.)North Holland. Amsterdam. pg. 157-194.
- 170.- Bensancon,F.;Ankel,H. (1974). Nature (Londres) 252: 478.
- 171.- Fischman,P.H.; Brady,R.O. (1976). Science 194: 906.
- 172.- Shur,B.D.; Roth,S. (1975). Biochim.Biophys.Acta. 415: 473.
- 173.- Hakomori,S.; Kobata,A. (1974). En The Antigens (M.Sela, ed.) Acad. Press. New York.
- 174.- Rovis,L.;Anderson,B.; Kabat, E.A.; Gruezo,F.; Liao,J. (1973). Biochemistry 12: 5340.
- 175.- Reitherman, R.W.; Rosen, S.D.; Frazier, W.A.; Barondes, S.H. (1975). Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 72: 3541.
- 176.- Hakomori,S. (1975). Biochim.Biophys. Acta. 417: 55.
- 177.- Law, O.Y.; Harris,R.; Loh,H.; Way,E.L. (1978). J. Pharmac. Exp.Ther. 207: 458.
- 178.- Loh,H.H.;Cho, T.M.; Gu,Y.C.; Harris,R.A.; Way, E.L. (1975) Life Sci. 16: 1811.
- 179.- Loh,H.H.;Cho,T.M.; Gu,Y.C.; Harris,R.A.; Way, E. L. (1974). Life Sci. 14: 2231.
- 180.- Cho,T.M.; Cho,J.S.; Law, H.H. (1976). Life Sci. 19: 117.
- 181.- Beckett,A.H.; Casy,A.F. (1954). J.Pharm.Pharmacol. 6: 968.
- 182.- Portoghese,P.S. (1965). J.Med.Chem. 8: 609.

- 183.- Lowney,L.I.;Schultz,K.;Lowery,P.J.Goldstein,A. (1974).
Science 183: 749.
- 184.- Terenius,L. (1973). Acta Pharmacol.Toxicol. 32: 317.
- 185.- Pert,C.B.;Snyder,S.H. (1973). Science 179: 1011.
- 186.- Smith,A.P.;Loh,H.H. (1976). Res. Commun. Chem. Pathol.
Pharmacol. 15: 205.
- 187.- Kuhar,M.J.; Pert,C.B.; Snyder,S.H. (1973) Nature 245: 447.
- 188.- Hiller, J.M.; Pearson,J.; Simon,E.J. (1973). Res. Commun.
Chem. Pathol. Pharmacol. 6: 1052.
- 189.- Zalc,B.; Craves,F.B.; Mange,M.;Loh,H.H.; Baumann,N. (1979).
Colloq. Inst.Natl. Sante Rech. Med. 86: 423.
- 190.- Tao R.V.P.;Cotlier,E.(1975)Biochim.Biophys.Acta 409:329.
- 191.- Ballio,A.;Casinovi,C.G.;Framondino,M.;Marino,G.;Nota,G.;
Santurbano,B.(1979) Biochim.Biophys.Acta 573: 51 .
- 192.- Smith,E.L.;McKibbin,M.;Karlsson,K.A.;Pascher,I.;Samuelsson,
B.E. (1975) Biochim.Biophys.Acta 388: 171.
- 193.- Dawson,G. (1978). Glycolipid Biosynthesis en The
Glycoconjugates vol. II. (Horowitz,M.I.;Pigman,W. ed.)
Academic Press.New York pg. 256-280.
- 194.- Burton,R.M.; Sodd,M.A.;Brady,R.O. (1958). J. Biol. Chem.
233: 1056.
- 195.- Morell,P.;Radin,N.S. (1969).Biochemistry 8: 506.
- 196.- Basu,S.; Schultz,A.M.;Basu,M.;Roseman,S.(1971). J. Biol.
Chem. 246: 4272.

- 197.- Neskovic, N.M.; Nussbaum, J.L.; Mandel, P. (1970). FEBS Letters 8: 213.
- 198.- Shah, S.N. (1971). J. Neurochem. 18: 395.
- 199.- Coles, L.; Gray, G.M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 520.
- 200.- Hammarstrom, S., Samuelsson, B. (1970). Biochem. Biophys. Res. Commun. 41: 1027.
- 201.- Morell, P.; Costantino-Ceccarini, E.C.; Radin, N.S. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 141: 738.
- 202.- Hammarstrom, S. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45: 468.
- 203.- Cleland, W.W.; Kennedy, E.P. (1960) J. Biol. Chem. 234: 45.
- 204.- Neskovic, N.M.; Nussbaum, J.L.; Mandel, P. (1969). FEBS. Letters 3: 199.
- 205.- Hildebrand, J.; Stoffyn, P.; Hauser, G. (1970). J. Neurochem. 17: 403.
- 206.- Curtino, J.A.; Caputto, R.; (1972). Lipids 7: 525.
- 207.- Brady, R.O. (1962). J. Biol. Chem. 237: PC 2416.
- 208.- Hammarstrom, S. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 45: 459.
- 209.- Mc Khann, G.M.; Levy, R.; Ho, W. (1965). Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 109.
- 210.- Cumar, F.A.; Barra, H.S.; Maccioni, H.J.; Caputto, R. (1968). J. Biol. Chem. 243: 3807.
- 211.- Mc Khann, G.M.; Ho, W. (1967). J. Neurochem. 14: 717.
- 212.- Stoffyn, A.; Stoffyn, P. Martensson, E. (1968). Biochim. Biophys Acta 152: 353.

- 213.- Farrell, D.F.; Mc Khann, G.M. (1971). J. Biol. Chem. 246:
4694.
- 214.- Stoffyn, P.; Stoffyn, A.; Hauser, G. (1971). J. Lipid Res. 12: 318.
- 215.- Morell, P.; Braun, P. (1972) J. Lipid Res. 13: 293.
- 216.- Basu, S.; Kaufman, B.; Roseman, S. (1968). J. Biol. Chem. 243: 5802.
- 217.- Brenkert, A.; Radin, N.S. (1972) Brain Res. 36: 183.
- 218.- Yamakawa, T.; Nichimura, S.; Kamimura, M. (1965). Jap. J. Exp.
Med. 35: 201.
- 219.- Hakomori, S. I.; Siddiqui, B. (1971). J. Biol. Chem. 246: 2271.
- 220.- Hakomori, S. I. (1970). Chem. Phys. Lipids. 5: 96.
- 221.- Hauser, G. (1967). Biochem. Biophys. Res. Commun. 28: 502.
- 222.- Hildebrandt, J.; Hauser, G. (1969) J. Biol. Chem. 244: 5170.
- 223.- Hay, J. B.; Gray, G. M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 527.
- 224.- Basu, S.; Basu, M.; Den, H.; Roseman, S. (1970) Fed. Proc. 29: 410. Abstr.
- 225.- Basu, M.; Basu, S.; (1971), Fed. Proc. 30: 1133. Abstr.
- 226.- Handa, S.; Burton, R. M. (1969) Lipids. 4: 589.
- 227.- Yip, M. C. M.; Dain, J. A. (1969) Lipids 4: 270.
- 228.- Cumar, F. A.; Fishman, P. H.; Brady, R. O. (1971). J. Biol. Chem. 246:
5075.
- 229.- Roseman, S. (1970). Chem. Phys. Lipids. 5: 270.
- 230.- Basu, S.; Moskal, J. R.; Gardner, D. A. (1976) en Ganglioside
function: Biochemical and Pharmacological Implications.
(G. Porcellati, B. Ceccarelli, G. Tettamanti, Ed.) Plenum, Nueva
York. pg. 45.

- 231.- Fishman, P.H. (1974) Chem. Phys. Lipids. 13: 305.
- 232.- Cumar, F.A.; Tallman, J.F.; Brady, R.O. (1972) J. Biol. Chem. 247: 2322.
- 233.- Kaufman, B.; Basu, S.; Roseman, S. (1968) J. Biol. Chem. 243: 5804.
- 234.- Mestrallet, M.G.; Cumar, F.A.; Caputto, R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59: 1.
- 235.- Arce, A.; Maccioni, H.J.; Caputto, R. (1971) Biochem. J. 125: 483.
- 236.- Maccioni, H.J.; Arce, A.; Caputto, R. (1971) Biochem. J. 125: 1131.
- 237.- La Bach, J.P.; White, D.C. (1969) J. Lipid Res. 10: 528.
- 238.- Lev, M.; Millford, A.F. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45: 358.
- 239.- Stoffel, W.; Le Kim, D.; Heyn, G. (1970) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 351: 875.
- 240.- Stoffel, W.; Le Kim, D. (1971) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352: 501.
- 241.- Greenfield, S.; Norton, W.T.; Morell, P. (1971) J. Neurochem. 18: 2119.
- 242.- Benjamins, J.A.; Herschkowitz, N.; Robinson, J.; Mc Khann M. (1971) J. Neurochem. 18: 729.
- 243.- Weiss, B.; Stiller, R.L.; (1973) Lipids 8: 25.
- 244.- Brennan, P.J.; Roe, J. (1975) Biochem. J. 147: 179.
- 245.- Landsiedel, A.; Bamberger, M. (1905) Monatsh. Chem. 26: 1109.
- 246.- Zellner, J. (1911) Monatsh. Chem. 32: 133.
- 247.- Rosenthal, R. (1922) Monatsh. Chem. 43: 237.
- 248.- Hartmann, E.; Zellner, J. (1928) Monatsh. Chem. 50: 193.

- 249.- Wagner,H.; Zofcsik,W. (1966) Biochem.Z. 346: 333.
- 250.- Weiss,B;Stiller,R.L.(1972) Biochemistry, 11: 4552.
- 251.- Wagner,H.Fiegert,E.(1969) Naturforsch. Z.24: B:359.
- 252.- Kaufmann,B.;Basu,S.;Roseman,S(1971) J.Biol.Chem.246: 4266.
- 253.- Prostenik,M.;Cosovic,C.;(1974) Chem. Phys. Lipids 13: 117.
- 254.- Roe,J.(1976).Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Irlanda. University College, Dublin.
- 255.- Turner,R.S.;Burger,M.M.(1973) Nature,Londres,244: 509.
- 256.- Yen,P.H.;Ballou,C.E.(1973) J.Biol.Chem. 237: 681.
- 257.- Mc Lean,R.J.;Bossmann,H.B.(1975) Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 72: 310.
- 258.- Loomis,W.F.(1975) En Dictyostelium discoideum.A Developmental System. Acad.Press,N.York.pg.53.
- 259.- Mc Mahon,J. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.USA.70: 2396.
- 260.- Roseman,S.(1974). En The Cell Surface in Development.(A. Moscana,ed.)Wiley,N.York.Pg.255.
- 261.- Frazier,W.A.;Rosen,S.D.;Reithman,R.W.;Barondes,S.N. (1975) J. Biol. Chem. 250: 7714.
- 262.- Wilhelms,O.H.;Luderitz,O.;Westphal,O.;Gerish,G. (1974) Eur.J.Biochem. 48: 89.
- 263.- Korn,E.D.;Dearborn,D.G.;Wright,P.L. (1974) J. Biol.Chem. 249: 3335.
- 264.- Steiner,S.;Lester,R.L.(1972) J. Bacteriol. 109: 81.

- 265.- Hakomori, S.; Kijimoto, S.; Siddiqui, B. (1972). En Membranes Research. (C.F. Fox, Ed.) Acad. Press, N. York. Pg. 253.
- 266.- Kushwaha, S.C.; Kates, M.; Kramer, J.K.; Subden, R.E. (1976) Lipids, 11: 778.
- 267.- Alexopoulos, C.J. (1979). Introductory Mycology. (J. Willey & Sons, Ed.) N. York. Pgs. 323-342.
- 268.- Dodge, B.O.; (1927) J. Agric. Res. 35: 289.
- 269.- Fontana, J.D. (1980). Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- 270.- Backus, M.P. (1939). Bull. Torrey Bot. Club 66: 63.
- 271.- Fujino, Y.; Ohnishi, M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 486: 161.
- 272.- Vogel, H.J. (1956) Microb. Genet. Bull. 13: 42.
- 273.- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226: 497.
- 274.- Kates, M. (1972). Techniques of Lipidology. En Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 3. Part II. (T.S. Work and E. Work, ed.) North Holland. Amsterdam. pgs. 398-404.
- 275.- Kates, M. (1972) *ibid.* pg. 429.
- 276.- Kates, M. (1972) *ibid.* pg. 438.
- 277.- Kates, M. (1972) *ibid.* pg. 526.
- 278.- Makita, A.; Yamakawa, T. (1964) J. Biochem. (Tokio) 55: 365.
- 279.- Morrison, W.A. (1974) Biochim. Biophys. Acta 350: 225.
- 280.- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956). Anal. Chem. 28: 350.

- 281.- Rouser, G.;Kritchevsky,G.;Yamamoto,A.;Simon,G.;Galli,C.;
Bauman,A.J. (1969) en Methods of Enzimology. Vol XIV.
Lipids.(Ed.por Lowenstein, J.M.)Academic Press, Nueva York.
pg. 255-267.
- 282.- Wagner,H.;Hörhammer,L.;Wolff,P. (1961).Biochem.Z.334: 175.
- 283.- Macher,B.;Klock,J. (1980).J.Biol.Chem. 255: 2092.
- 284.- Rouser,G.;Galli,C.;Kritchevsky,C. (1965). J.Amer.Oil Chem.
Soc. 42: 404.
- 285.- Stone,K.J.;Wellburn,A.R.;Hemming,F.W.;Pennock,J.F. (1967).
Biochem.J. 102: 325.
- 286.- Churáček,J.;Pechová,H. (1970) J. Chromat. 48: 250.
- 287.- Coles,C.;Foote,J.L.(1969).J.Chromat. 39: 229.
- 288.- Weiss,B. (1967) en Lipid chromatographic Analysis.(Ed. por
C.Marinetti)Vol. 1.Cap.11.Pg.434.Marcel Dekker Inc.Nueva
York.
- 289.- Farrell,D.F.;Mc Khann,C.M. (1971) J. Biol.Chem. 246: 4694.
- 290.- Ishizaka,Y.(1978) J.Biol.Chem. 253: 828.
- 291.- Böhlen,P.;Stein,S.;Dairman,W.;Udenfriend,S.(1973).Arch.
Biochim. Biophys. 155: 213.
- 292.- Clamp,J.R.;Bhatti,T.;Chamber,R. (1971) en Methods of
Biochemical Analysis . Vol. 19.(Ed. D.Glik.) pg: 229-344.
- 293.- Svennerholm, L.; (1965),J.Neurochem. 1: 42.
- 294.- Heftmann,E.;Ko,S.I.;Bennett,R. (1966). J. Chromat. 21: 490.
- 295.- Jeanes,A. Wise,D.S. Dimler, R.J. (1951) Anal.Chem.23: 415.

- 296.- Trevelyan,W.F.;Procter,D.P. Harrison J.S. (1950) Nature,
166: 444.
- 297.- De Ferrari,J.O.;Muchnik de L.R.;Matsuhira,B.;Sproviero,J.F.
(1962) J.Chromat. 9: 283.
- 298.- Dankert,M.;Wright,A.;Kelley,W.S.;Robbins,P.W. (1966).
Arch.Biochem. Biophys. 116: 425.
- 299.- Van den Heuvel,W.J.A.;Morning,E.C. (1963) Biochim.Biophys.
Acta 74: 560.
- 300.- Sweeley,C.C.;Bentley,R.;Makita,M.;Wells,W.W. (1963) J.Amer.
Chem.Soc. 85: 2497.
- 301.- Horii Z.; Makita,M.;Tamura,Y. (1965) Chem. Ind. (London):
1494.
- 302.- Lau,H.L.(1966) J.Gas Chromatography 4: 136.
- 303.- Chambaz,E.M.; Horning,E.C. (1969).Anal.Biochem.30: 7.
- 304.- Wiegandt,H. (1971). Glycosphingolipids. En Advances in
Lipid Research.(Ed.R.Paoletti y D. Kritchevsky). Vol.9.
Academic Press, Nueva York. pg.249-289.
- 305.- Isono,Y.;Nagai,Y.(1966),Jap.J.Exp.Med. 36: 461.
- 306.- Hanson,B.A.; Lester,R. (1980) J.Lipid Res. 21: 309.
- 307.- Ondrusěk,V.; Průstenik,M. (1978) Exp.Mycol. 2: 156.
- 308.- Miras,J.L.;Mantzou,J.D.;Levis,G.M. (1966) Biochem.J. 98: 782.
- 309.- Marinetti,G.V.;Ford,T.;Stotz,E. (1960) J. Lipid Res. 1: 203.
- 310.- Higashi,S.; Hori,T.(1968).Biochim.Biophys.Acta.152:568.
- 311.- Karlsson,K.A. (1970) Chem.Phys.Lipids.5: 6.

- 312.- Adams E.P.;Gray,G.M. (1967) Chem.Phys.Lipids,1: 368.
- 313.- Morrison,W.R.;Hay,J.D. (1970) Biochim.Biophys.Acta 202: 460.
- 314.- Carter,H.E.;Koob,J.L. (1969) J.Lipid Res. 10: 363.
- 315.- Carter,H.E.;Hendry,R.A.;Nojima,S.;Stanacev,Z.;Ohno K.
(1961) J. Biol. Chem.,236,(7): 1912.
- 316.- Sweeley,C.C.;Siddiqui,B.(1977) Chemistry of Mammalian
Glycolipids. En The Glycoconjugates . Vol. I (Horowitz,M
y Pigman,W.Ed.).Acad.Press,Nueva York.Pgs. 507-529.
- 317.- Brock,T.(1978) Biology of Microorganisms.3 thd.Ed. Prentice-
Hall. pg.215-217.
- 318.- Mc Lafferty,F.W. (1959)Anal.Chem.,31: 82.
- 319.- Budzikiewicz,H.;Djierassi,C.;Williams,D.H. (1964)
Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds.
Holden-Day, San Francisco,14.
- 320.- Mc Closkey, J.A. (1970). Mass Spectrometry of fatty acid
derivatives. En Topics in Lipid Chemistry.(Editor F.D.
Gunstone.) Logos Press Limited, Gran Bretaña, pgs. 387-439.
- 321.- Hallgren,B.;Ryhage,R.;Stenhagen,E. (1959). Acta Chem.Scand.
13: 845.
- 322.- Ryhage,R.;Stenhagen,E.(1963) Mass Spectrometry of Organic
Ions.(edited by Mc Lafferty,F.W.)Academic Press, New York,
Capitulo 9.
- 323.- Martensson,E.(1969) Prog.Chem.Fats Other Lipids 10,Part 4:
365.

- 324.- Kishimoto, Y.; Radin, N.S. (1963). *J. Lipid Res.*, 4: 139.
- 325.- Downing, D.T.; Kranz, Z.H.; Murray, K.E. (1960) *Austral. J. Chem.*,
13: 80.
- 326.- Levitina, M.V.; Abramova, L.N. (1979) *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 15 (3): 307.
- 327.- Komori, T.; Sanechika, Y.; Ito, Y.; Matsuo, J.; Nohara, T.;
Kawasaki, T.; Schulten H. (1980) *Liebigs Ann. Chem.* (5): 653.
- 328.- Karlsson, K.A.; Martensson E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*,
152: 230.
- 329.- Okabe, K.; Keenan, R.W.; Schmidt, G. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 137.
- 330.- Carter, H.E.; Hirschberg, C.B. (1968) *Biochemistry*, 7: 2296.
- 331.- Martensson, E. (1966). *Glycolipids of human kidney*. Elander Bockdryckeri Aktiebolag, Göteborg, Suecia.
- 332.- Adams, E.P.; Gray G.M. (1968). *Chem. Phys. Lipids*. 2: 147.
- 333.- Gallai-Hatcherd J.J.; Gray, G.M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 116: 532.
- 334.- Wiegandt, H.; Egge, H. (1971) *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*
28: 184.
- 335.- Carter, H.E.; Brooks, S.; Gigg, R.H., Strobach, D.R.; Suami, T.
(1964) *J. Biol. Chem.* 239: 743.
- 336.- Itasaka, O.; Hori, T. (1979) *J. Biochem. (Tokio)* 85 (6): 1469.
- 337.- Karlsson, K. (1965) *Acta Chem. Scand.* 19: 2425.
- 338.- Ohnishi, M.; Fujino, Y. (1980). *Agric. Biol. Chem.* 44: 333.