

Tesis de Posgrado

Estudio sobre la biosíntesis de fosfatidil-dCMP en linfocitos humanos

Lauinger de Medrano, Estela E.

1979

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

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

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

Cita tipo APA:

Lauinger de Medrano, Estela E.. (1979). Estudio sobre la biosíntesis de fosfatidil-dCMP en linfocitos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1710_LauingerdeMedrano.pdf

Cita tipo Chicago:

Lauinger de Medrano, Estela E.. "Estudio sobre la biosíntesis de fosfatidil-dCMP en linfocitos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1710_LauingerdeMedrano.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**"ESTUDIO SOBRE LA BIOSINTESIS DE FOSFATIDIL-dCMP EN LINFOCITOS
HUMANOS"**

Autor; Estela E. Lauinger de Medrano

Director; Dr. José Mordoh

**Lugar de trabajo; Instituto de Investigaciones Bioquímicas-
Fundación Campomar**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

10
1979

I

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Mordoh por sus enseñanzas constante apoyo y crítica que posibilitaron este trabajo.

A los Dres. Luis Federico Leloir y Carlos E. Cardini por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

Al Dr. Carlos P. Lantos, por haber participado en mi formación en los comienzos de esta actividad.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo material brindado.

Al Dr. Marcelo Dankert por haberme orientado afectuosamente en distintas etapas del trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir y a mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su colaboración y críticas.

Al Dr. Héctor N. Torres, Consejero de Estudios.

A Soledad de Giménez y a Hilda Gasparino, por su abnegada colaboración.

II

A Jorge y a mis hijos

A mis padres

INDICE GENERAL

	<u>Página</u>
<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	32
<u>RESULTADOS</u>	41
<u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	105
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	116

ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo
Ag	antígeno
Ara-C	1- β -D arabinofuranosilcitosina
Ara-CTP	1- β -D arabinofuranosilcitosina-5' trifosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
C	Citidina
CMP	Citidina 5- monofosfato
CDP	Citidina 5' difosfato
CTP	Citidina 5' trifosfato
CPZ	Clorpromazina
Con-A	Concanavalina A
dATP	deoxiadenosina 5' trifosfato
dC	deoxicitidina
dCMP	deoxicitidina 5' monofosfato
dCDP	deoxicitidina 5' difosfato
dCTP	deoxicitidina 5' trifosfato
dGTP	deoxiguanosina 5' trifosfato
dTTP	timidina 5' trifosfato
dNTP _s	deoxirribonucleósidos trifosfatos
dT	timidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
1,2 DG	1,2 diglicérido
α -G ₁ -P	α -glicerol-fosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Ig	inmunoglobulina
MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
μ g	microgramos

PA	ácido fosfatídico
PBS	solución salina de Buffer de fosfato
PCA	ácido perclórico
PI	fosfatidil-inositol
PHA	fitohemaglutinina
Pi	fosfato inOrgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
pm	pico moles
"PM"	mitógenos "Pokeweed"
RNA	ácido ribonucleico
TCA	ácido tricloracético

INTRODUCCIONPágina

I. <u>Los linfocitos como modelo para el estudio de la transformación y división celular.</u>	
a) Naturaleza de los agentes blastogénicos.	4
b) Heterogeneidad de la población de linfocitos periféricos.	6
c) Secuencia de los eventos moleculares.	7
d) Interacciones del mitógeno con los linfocitos.	8
i) Mecanismos de la interacción receptor-ligando.	11
ii) Redistribución de los receptores inducida por el ligando.	12
iii) Comunicación intercelular.	15
iiii) Cambios inducidos en la membrana por el ligando.	16
e) Turnover del fosfatidilinositol.	17
i) Rol del Ca^{2+} en el turnover del fosfatidilinositol.	18
ii) Compuestos que modifican el metabolismo del fosfatidilinositol.	19
f) Cambio en los ácidos grasos de los linfocitos.	24
g) Correlación entre la activación del metabolismo de los fosfolípidos de membrana y la inducción de la mitosis.	25
II. <u>Antecedentes inmediatos y objetivos de la investigación</u>	27

INTRODUCCION

Los linfocitos como modelo para el estudio de la transformación y división celular.

El análisis de los procesos bioquímicos relacionados con la transformación y división celular requiere un sistema en el cual dichos cambios sean fácilmente inducibles. Los linfocitos humanos periféricos constituyen un excelente modelo para el estudio mencionado ya que cuando se aíslan de sangre periférica están en estado de reposo (no se dividen). La síntesis de proteínas, DNA y RNA es mínima y muy difícil de cuantificar cuando estas células se ponen en medio de cultivo. Los linfocitos, sin embargo, pueden ser inducidos a proliferar por el agregado de una variedad de sustancias que reciben el nombre genérico de mitógenos. Nowell en 1960 demostró que los linfocitos humanos normales son inducidos a dividirse cuando se cultivan en presencia de una lectina de plantas, la fitohemoaglutinina (PHA). La PHA se utilizaba originalmente para separar los leucocitos de la sangre entera, ya que tiene la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos dejando en solución a los leucocitos. Como consecuencia de la estimulación se producen una serie de eventos moleculares que culminan con la replicación del DNA, división celular y cambios morfológicos que caracterizan a las formas "blásticas" menos diferenciadas. Esta transformación recibe el nombre de "transformación blástica de los linfocitos" o "blastogénesis".

a) Naturaleza de los agentes blastogénicos.

Los linfocitos humanos pueden ser estimulados por un amplio número de moléculas de diferente composición química. Algunas de ellas, tales como la fitohemoaglutinina (PHA), concanavalina A (Con-A) y "pokeweed mitogen" (P.M.), pertenecen

a la familia de las Leguminosae. Alrededor del 90 % de los linfocitos humanos circulantes pueden ser estimulados a dividirse por acción de dichas moléculas, que reciben el nombre genérico de lectinas.

Además de las lectinas, otras macromoléculas pueden tener actividad mitogénica: productos bacterianos, especialmente lipopolisacáridos de *Enterobacteriaceae*, Dextran-sulfato, enzimas proteolíticas, galactosa oxidasa, suero anti-linfocítico. También poseen dicha capacidad moléculas tales como el periodato de sodio, el ionóforo para el Ca^{2+} A23187, cationes metálicos pesados, y el acetato-miristato de forbol (Bazzei et al, 1966; Grasbeck et al, 1963; Kirschner et al, 1970; Pauly et al, 1969; Novoprodsky et al, 1971; Sharon, 1976; Hedner y Parker, 1976).

A pesar de la diferente naturaleza química de estas sustancias todas ellas comparten la propiedad de inducir la síntesis de DNA y desencadenar la expresión de funciones características del linfocito estimulado (T ó B como se verá más adelante). Estas propiedades no se manifiestan necesariamente en todas las especies animales; así, anticuerpos (Ab) contra inmunoglobulinas estimulan la transformación de linfocitos de conejo y de cerdo (Laino et al, 1975) pero no de células humanas o de ratón, mientras que los lipopolisacáridos activan células de bazo de ratón pero tienen mínimo efecto sobre linfocitos humanos y de cerdo.

El comportamiento "social" de una célula viviente (comunicación intercelular, regulación del crecimiento y diferenciación, la respuesta inmune, y quizás la malignidad) es mediado por la superficie de la célula, particularmente por los azúcares de sus glicoproteínas. Muchos de los conocimientos sobre la arquitectura y función de la superficie celular se deben al descubrimiento de estas lectinas que tienen como característica común la de unirse a los azúcares de dicha superficie. Cada molécula de lectina tiene dos o más regiones que son sitios de combinación que permiten a la misma "pegarse" a los azúcares mencionados. Esta unión de la lectina al azúcar es de tipo débil, no covalente pero sí reversible, como la de una enzima con su sustrato.

b) Heterogeneidad de la población de linfocitos periféricos.

En estos últimos años se han publicado numerosos trabajos que demuestran la heterogeneidad de los linfocitos (Katz, 1977).

Existen esencialmente dos tipos de linfocitos: el linfocito B, responsable de la inmunidad humoral, y el linfocito T (timo dependiente) responsable de la inmunidad celular.

En las aves, el sistema linfoideo consta de dos órganos primarios diferentes: la bursa de Fabricius y el timo, cuya influencia en la diferenciación de las "stem cells" que han migrado hacia ellos o derivan de los mismos, puede ser distinguida claramente basándose en las diferencias funcionales de tales células en el sistema inmune. La extirpación quirúrgica de la bursa en un pollo recién nacido produce la depresión de los niveles de inmunoglobulinas del suero y una marcada disminución en la capacidad de respuesta a la estimulación antigénica. En contraste, tiene muy poco efecto sobre la capacidad de rechazar los trasplantes (Cooper et al, 1966; Warner et al, 1964). Es evidente por lo tanto, que su actividad rige especialmente a los linfocitos B.

En los mamíferos también se ha establecido la existencia de dos sistemas linfoideos diferentes, responsables de la diferenciación de las células inmunocompetentes. Uno de dichos sistemas está influenciado por el timo, mientras que el otro no lo es. La timectomía en animales recién nacidos destruye la capacidad de rechazar en forma específica los trasplantes, mientras que los seres humanos con ausencia congénita del timo (síndrome de Di George) no pueden desarrollar las reacciones de hipersensibilidad retardada o rechazo a los injertos (Lischner et al, 1969; Di George, 1968). Estos pacientes presentan niveles normales de inmunoglobulinas séricas y pueden responder a ciertos antígenos con producción de anticuerpos humorales.

En los mamíferos adultos las "stem cells" se originan en la médula ósea (Ford et al, 1966); de allí, parte de ellas migra hacia el timo donde, primero en la

corteza y luego en la médula de dicho órgano, maduran y se diferencian en timocitos. El timocito en este estado de diferenciación deja el timo y migra hacia los órganos linfoides periféricos y/o circula en la sangre (linfocitos T). La población de linfocitos T está compuesta de células heteropéneas con una variedad de funciones inmunológicas. Estas funciones implican fundamentalmente el reconocimiento de los antígenos (Ag) de histocompatibilidad y funciones regulatorias de la respuesta inmune.

De acuerdo a sus funciones, los linfocitos T se pueden dividir en linfocitos T regulatorios (que incluyen a las subpoblaciones de linfocitos T Helper y T supresores) y linfocitos T efectores, que incluyen a las células T involucradas en la reacción MLR (mixed lymphocyte reactions) y los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, el sistema linfoides mencionado anteriormente que es timo-independiente dará origen a los linfocitos B. Hasta el momento han sido numerosos los intentos para demostrar el origen de las células B en los mamíferos, pero no se ha hallado una única respuesta. En comparación con la naturaleza altamente compleja de los linfocitos T, el linfocito B parece relativamente poco sofisticado. Su función consiste en unirse al Ag vía sus receptores específicos y luego cooperar con el linfocito T y quizás también con otras células (macrófagos), sirviendo como precursores de las células plasmáticas que secretan los anticuerpos circulantes (Glick et al, 1956; Warner et al, 1962).

Cabe señalar, finalmente, que en esta breve síntesis sólo se ha pretendido señalar la heterogeneidad de la población de linfocitos circulantes y demostrar el alto grado de complejidad que presenta la misma.

Los linfocitos humanos aislados por las técnicas habituales consisten en aproximadamente un 95 % de las células T, y un pequeño número de células B, macrófagos y otras células sanguíneas contaminantes.

c) Secuencia de los eventos moleculares.

Desde el punto de vista morfológico los linfocitos humanos periféricos (en es-

tado de reposo) presentan un núcleo que se colorea densamente. La cromatina está condensada y se pueden visualizar muy pocos polisomas en el citoplasma. Cuando estas células son estimuladas la cromatina se hace menos densa, el nucleolo se hace visible al microscopio y el citoplasma aumenta de tamaño, existiendo un extenso desarrollo del retículo endoplásmico. Alrededor de las 30 horas de agregado el mitógeno, los linfocitos presentan cambios mitóticos y comienzan a dividirse. Si se usa PHA como mitógeno, alrededor del 80 - 90 % de las células responden a este agente, efectuando dos o tres divisiones consecutivas para volver finalmente al estado de reposo. Una de las preguntas más interesantes y que aún no tienen respuesta es la de cómo esta célula regula su división y vuelve al estado original de reposo. Cuando esta pregunta se pueda contestar es muy posible que también pueda entenderse el mecanismo por el cual un linfocito pasa al estado de división "descontrolada" que caracteriza a la célula leucémica.

Es posible predecir, en base a los cambios morfológicos observados en el microscopio, que los primeros eventos de la transformación blástica involucran el metabolismo de la membrana y la activación genética. Loeb (1974) dividió los cambios moleculares que ocurren durante la transformación blástica en cuatro períodos arbitrarios que se muestran en la Tabla I. Los sucesos tempranos después de la estimulación mitogénica se caracterizan tanto por alteraciones en la estructura y función de la membrana como por cambios en el metabolismo del núcleo. Los eventos intermedios involucran principalmente el incremento en la síntesis de RNA y el ensamblado de los ribosomas para la síntesis de proteínas. En los eventos tardíos la replicación del DNA ocupa el lugar más importante, alcanzándose el máximo de incorporación de timidina al DNA entre las 70 y 80 horas, para luego declinar y al cabo de 5 ó 6 días se detienen la síntesis de DNA y la división celular.

d) Interacciones del mitógeno con los linfocitos.

Tabla I: Secuencia de los eventos moleculares durante la transformación blástica.

Etapa temporal

1.- Eventos tempranos (dentro de las 2 horas)

A. Incremento de procesos asociados con la membrana

Turnover de fosfolípidos

Incorporación de prolina a lípidos

Captación de ácido α -amino-isobutírico

Transporte de amino-ácidos

Difusión facilitada de 3-O-metil-glucosa

Captación de $^{42}\text{K}^+$

Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

B. Incremento de eventos asociados con el núcleo

Incorporación de acetato a histonas

Fosforilación de histonas y proteínas nucleares

Incremento de la velocidad de síntesis de RNA, particularmente 4S y RNA-polidisperso.

C. Eventos asociados con el citoplasma

Incremento de la utilización de glucosa

Glicolisis aumentada

Incremento en el consumo de oxígeno

Redistribución de enzimas lisosomales

2.- Eventos intermedios (2 a 14 hs.)

A. Relacionados con la síntesis de RNA

1. Incremento de la actividad de uridina quinasa

2. Incremento de la actividad de la RNA polimerasa-DNA dependiente

3. Incremento de la síntesis de RNA ribosomal

4. Utilización más eficiente del RNA ribosomal de 18S.

B. Relacionados con la síntesis de proteínas

1. Incremento en la incorporación de amino ácidos a proteínas
2. Incremento de la proporción de ribosomas que sintetizan proteínas

C. Otros cambios metabólicos

1. Incorporación aumentada de glucosamina a membranas
2. Actividad aumentada de S-adenosil-metionina decarboxilasa
3. Actividad aumentada de ornitina decarboxilasa

3.- Eventos tardíos (16 a 72 hs.)

A. Incremento en la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de DNA

1. DNA polimerasa (30 a 200 veces)
2. Timidina quinasa (2 a 10 veces)
3. Timidilato quinasa (2 a 10 veces)
4. Deoxicitidina quinasa
5. Deoxicitidina deaminasa

B. Eventos que reflejan la replicación del DNA

1. Incorporación de timidina a DNA
2. Incorporación de ^{32}P a DNA
3. Incremento de DNA por célula

C. Cambios en la actividad de otras enzimas

1. Alteración en el perfil de las isoenzimas de la láctico-dehidrogenasa
2. Incremento de la actividad de glucosa-6-fosfatasa
3. Incremento de la actividad de α y β -glucosidasas

4.- Eventos finales

- A. Disminución de la incorporación de timidina
- B. Disminución de la incorporación de amino-ácidos
- C. Disminución de la actividad de DNA polimerasas

La activación de los linfocitos es un fenómeno que ha suscitado considerable interés ya que su importancia no se limita a la función del linfocito sino que es además fundamental para entender el mecanismo por el cual una célula en estado de reposo se transforma en una célula en estado replicativo. El paso inicial en la transformación parece ser la unión del mitógeno con la membrana plasmática, que actuaría como mecanismo de "disparo" de la activación. Greaves et al (1972) demostraron que la PHA acoplada covalentemente a gránulos de Sefarosa es capaz de inducir la blastogénesis; este resultado demuestra que no es necesario que el mitógeno penetre a la célula para ser activo. Más aún, Hardy et al (1969, 1970) encontraron que las células linfoideas tienen que estar vivas para poder estimular a los linfocitos alogeneicos, sugiriendo esto que los antígenos deben interactuar sólo con la membrana plasmática para inducir la proliferación.

En los linfocitos activados por mitógenos se han descrito numerosos cambios en la membrana plasmática que contribuyen al mecanismo que inicia la expresión genética.

i) Mecanismos de la interacción receptor-ligando.

Greaves et al (1972 b) demostraron que los mitógenos capaces de activar a un linfocito por unión con los receptores de la superficie, requieren más de una valencia de unión. Lindahl-Kiessling (1972) propone que la PHA acidificada y extensamente dializada es incapaz de disparar el mecanismo de activación en los linfocitos, probablemente por su monovalencia. De manera que el entrecruzamiento de los receptores sería de crucial importancia en la iniciación de la activación. La remoción de cargas de la superficie facilita la formación de "agregados" de receptores; ya que se ha demostrado que el tratamiento con neuraminidasa aumenta la respuesta mitótica a la Con-A y PHA (Novogrodsky, 1974). El hecho de que se necesite por lo menos bivalencia del ligando, permite que existan dos posibilidades: a) existencia de "agregados" di- o multivalentes de

receptores de ligando en una misma célula; b) la agregación de los receptores involucra a dos células vecinas causando cierto tipo de comunicación celular.

ii) Redistribución de los receptores inducida por el ligando.

Cuando los linfocitos se marcan in vivo con anticuerpos anti-Ig conjugados con fluoresceína o ferritina se pueden observar tres diferentes tipos de marcación, dependiendo de las condiciones del experimento (Raff et al, 1974). En la Fig. 1 es posible observar las tres formas mencionadas. La Fig. 1 (A) corresponde a la "marcación difusa de superficie" obtenida cuando se usan fragmentos univalentes Fab de moléculas de anti-Ig (obtenidos por digestión con papaína de la molécula anti-Ig), o por tratamiento con anti-Ig multivalentes pero incubadas estrictamente a 0° C (Taylor et al, 1971). La Fig. 1 (B) corresponde a la "marcación focal" (patchy labelling) obtenida usando anticuerpos anti-Ig a temperaturas entre 4° C y 15° C (de Petris y Raff, 1971), o a cualquier temperatura superior a 4° C en presencia de ázida sódica o dinitrofenol (Taylor et al, 1971). Es importante destacar que este proceso depende de la difusión de los receptores en el plano de la superficie de la membrana pero no del metabolismo celular (Taylor et al, 1971).

Finalmente la Fig. 1 (C) muestra la "marcación en casquete" (cap labelling), que es el tipo más común que se obtiene cuando se utilizan ligandos multivalentes (anticuerpos Anti-Ig) a temperaturas alrededor de 15° C. Toda la marca que estaba inicialmente en forma difusa sobre la superficie se acumula en uno de los polos de la célula (aquél que contiene el aparato de Golgi y la mayoría de las organelas de la célula (Taylor et al, 1971; de Petris y Raff, 1971). La formación del casquete está acompañada por pinocitosis de la membrana marcada y ocurre pocos minutos después de que la célula tratada en frío, y donde presenta una marcación de tipo focal, es calentada a 37° C. Después de permanecer varias horas a 37° C es posible encontrar la marca en el citoplasma,

habiendo perdido además en forma temporaria las Ig de la superficie celular, las que reaparecen después de 12 a 24 horas de cultivo. La formación del casquete depende del metabolismo celular, ya que inhibidores metabólicos como la azida sódica inhiben su formación, pero sin afectar la formación de la marcación focal (Yahara y Edelman, 1972).

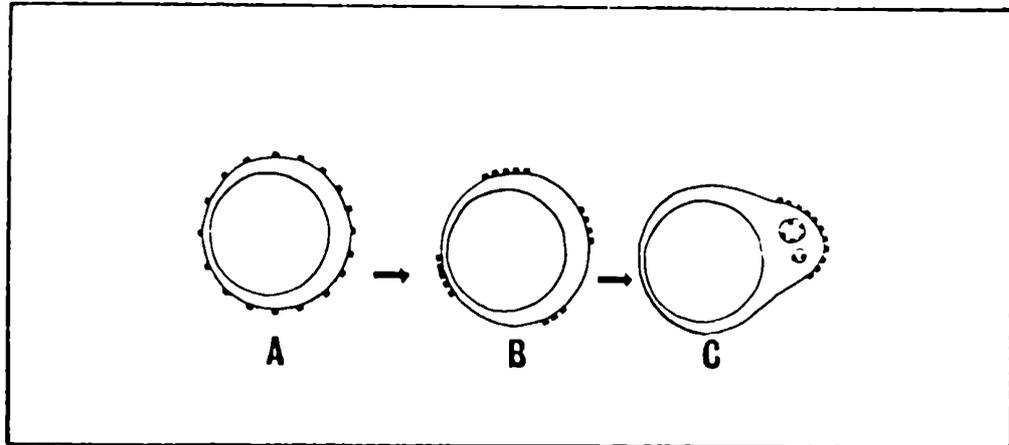


Fig. 1. Representación esquemática de los tres diferentes "tipos" de marcación cuando se usan anticuerpos anti-Ig conjugados con ferritina o fluoresceína para demostrar las Ig sobre la superficie de los linfocitos B (extraído de Raff et al, 1974).

La Con-A o PHA utilizadas en dosis óptimas para inducir la síntesis de DNA, pueden redistribuir sus receptores en forma de casquetes (Loer, 1974). A estas dosis, el suero anti-Ig forma casquetes en sitios diferentes al inducido por la Con-A, indicando ésto que los receptores para mitógenos e Ig son independientes (Loer, 1974).

Publicaciones recientes (Yahara y Edelman, 1975) sugieren que los microtúbulos y/o estructuras relacionadas regulan la movilidad de los receptores de la superficie de los linfocitos, así como el movimiento global de la célula. Más aún, estos autores postulan la hipótesis de que los receptores de la superficie celular deben tener en e debajo de la membrana plasmática un sistema de

anclaje que interactúa con otras estructuras celulares, sugiriendo a los microtúbulos como uno de los componentes de este sistema.

El efecto de la Con-A sobre la movilidad de los receptores ha permitido el estudio de la naturaleza del sistema de anclaje, así como su interacción con los receptores. Si la Con-A se agrega a linfocitos en dosis mayores que 5 µg/ml antes de tratar a los mismos con anti-Ig, se inhibe no sólo la formación del casquete sino también de los focos. Este efecto, que es dosis-dependiente, puede ser revertido por el agregado de α -metil-manósido, un inhibidor competitivo de la Con-A. El sistema responsable de la inhibición de la movilidad de los receptores puede así recuperarse de los efectos de la unión de la Con-A, siendo importante destacar que las células linfoideas no mueren por interacción con la lectina en las condiciones de dicho experimento (Yahara y Edelman, 1975).

La restricción en la movilidad de los receptores por la Con-A es además revertida por agentes que interfieren con los microtúbulos, por ejemplo; colchicina y vinblastina (Oliver et al, 1975). Estas drogas, conocidas desde hace tiempo como agentes antimitóticos, previenen la polimerización de los microtúbulos (Olmsted et al, 1973; Snyder et al, 1976).

La formación del "casquete" también puede ser prevenida por la citocalasina B (Cito-B) droga que destruye los microfilamentos citoplasmáticos (Unanue et al, 1973; Nicolson et al, 1976), sugiriendo ésto que dichas estructuras juegan también un importante rol en la formación del "Casquete".

Cuando los microfilamentos y microtúbulos se rompen por la combinación de Cito-B más colchicina (De Petris, 1975; Poste et al, 1975) se produce el bloqueo de la formación del "casquete", demostrándose así que tanto los microtúbulos como los microfilamentos están involucrados en el control transmembranoso de dicho proceso, siendo los microfilamentos los responsables de las actividades contráctiles, mientras los microtúbulos constituyen el sistema esquelético de anclaje. Recientemente Yahara et al (1978) sugirieron que la modulación de la organización microtubular en los linfocitos está asociada con eventos en la

superficie de la célula y con el crecimiento celular.

Poste et al (1975) y Ryan et al (1974) demostraron que ciertas aminas terciarias de efecto anestésico local o tranquilizantes del sistema nervioso como la clorpromazina, xilocaína, nupercaina, etc., afectan el control transmembranoso de la movilidad y distribución de los receptores de superficie, probablemente a través de un mecanismo semejante al mencionado para la colchicina y Cito-B.

iii) Comunicación intercelular

Quando los linfocitos son activados por mitógenos policlonales como la PHA tienden siempre a aglutinarse y formar agregados (Ling et al, 1975). La aglutinación inducida por lectinas en varios tipos de células parece deberse a la formación de puentes entre los receptores de las células aglutinadas (Nicolson, 1972; Noonan et al, 1973). Para que sea posible la formación de dichos puentes, los receptores deben moverse en el plano de la membrana para permitir el alineamiento de los mismos (Rutishauser et al, 1974). Drogas que inhiben la formación del "casquete" como la colchicina, vinblastina y Cito-B inhiben la aglutinación (Loor, 1973; Yin et al (1972). Estas sustancias también inhiben la transformación por lectinas o antígenos (Medrano et al, 1974; Yoshinaga et al, 1972). Esto sugeriría que el contacto célula-célula efectuado por el mitógeno es necesario para que ocurra la transformación; más aún, se ha demostrado en cultivos estimulados por PHA que la separación mecánica de los linfocitos impide la transformación.

Algunos autores como Hüber et al (1972) sugieren que se produce comunicación intracelular permitiendo el intercambio de factores citoplasmáticos que actuarían como segundos mensajeros. El intercambio de un segundo mensajero es de gran importancia cuando las células que se comunican no son idénticas, como es el caso de los macrófagos cuya presencia es necesaria para que la estimulación blástica sea óptima (Rosensteich, 1975). Desde otro punto de vista, ciertos

autores postulan que el contacto celular permite la distribución de los receptores en el orden correcto interviniendo para esto último varios procesos de la membrana como ser; a) repulsiones electrostáticas, b) interacciones entre partes de la membrana mediada por carbohidratos y/o fosfolípidos (Rosemann, 1970).

Todos los hechos anteriormente señalados sugieren fuertemente que, aún cuando no se conoce el mecanismo detallado de la activación mitogénica, la membrana celular y estructuras conexas desempeñan un rol prioritario en dicho proceso celular.

iiii) Cambios inducidos en la membrana por el ligando

La fluidez de la membrana celular es una propiedad característica de la misma, controlada por el "empaquetamiento" de las cadenas lipídicas de los fosfolípidos. En linfocitos se ha podido demostrar que dicha fluidez se incrementa durante la transformación blástica. Existen sin embargo discrepancias entre distintos autores, ya que para algunos el aumento en la fluidez es observable dentro de la hora de agregado el mitógeno (Barnett et al, 1974 a) mientras que otros observan cambios detectables recién a las 24 horas de la estimulación (Inbar y Schinitzky, 1975).

Es interesante señalar que la fluidez de la membrana externa de los linfocitos normales es dos veces menor que en los linfomas malignos (Schinitzky, 1974). Además, en otros sistemas celulares como los fibroblastos 3T3 inhibidos por contacto, la fluidez de la membrana es mucho menor que cuando se la estudia en las mismas células pero transformado por virus (Barnett et al, 1974 b). Resch (1976) propone que estos cambios en la fluidez se deben a dos cambios lipídicos separados; a) modulación en la cantidad relativa de colesterol, b) alteración en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana.

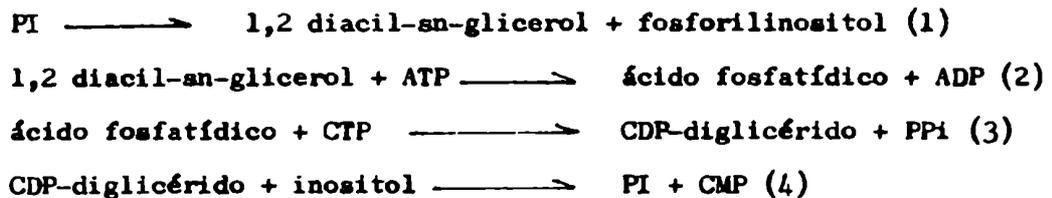
Por otra parte la transformación blástica implica la síntesis de nuevos cons-

tituyentes celulares, incluyendo la membrana celular.

Fiacher y Mueller (1969) demostraron que se observa síntesis neta de los fosfolípidos después de 6 horas de estimulación por PHA; más aún, demostraron que la incorporación de (³H)-mio-inositol a fosfatidilinositol se incrementa entre 5 y 20 veces a los 20 minutos de agregada la PHA.

e) Turnover del fosfatidilinositol (PI)

El estudio del turnover del PI merece ser considerado en forma separada del contexto de los demás fosfolípidos de membrana, ya que es el que está íntimamente involucrado en la mediación por la membrana plasmática de muchos estímulos extracelulares. Su turnover aumentado se observa no sólo en linfocitos por la acción estimuladora de la PHA, sino también en una enorme variedad de tejidos, como ser la corteza cerebral por acción de la acetilcolina, en el tejido adiposo luego del estímulo de la insulina, en la tiroides por la acción de la hormona TSH, etc. Se acepta que el punto donde ocurre el turnover por el efecto estimulador es en el clivaje del PI para dar lugar a 1,2 diacil-sn-glicerol y fosforilinositol. La secuencia de reacciones que ocurriría es:



La enzima que cataliza la reacción (1) es una fosfolipasa de tipo C, y su presencia ha sido demostrada en varios tejidos (Dawson, 1959; Thompson, 1967; Palmer, 1973; etc.) y en linfocitos (Allan et al, 1974). Más aún, se ha demostrado que su actividad en cerebro se encuentra localizada fundamentalmente en la membra-

na plasmática (Lapetina et al, 1973). La enzima responsable de la reacción (2), la 1,2 diacilglicerol quinasa, se ha encontrado localizada en la membrana plasmática de los eritrocitos (Hokin et al, 1963) y de los linfocitos (Fisher et al, 1971); habiéndose hallado también en preparaciones de microtúbulos de diferentes tejidos (Daleo et al, 1974).

Michell (1975) postula que el 1,2 diacilglicerol producido por ruptura del fosfatidilinositol se usaría para la resíntesis del mismo y no para la síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y triacilgliceroles, mientras que el producido por acción de la enzima fosfatídico fosfohidrolasa estaría destinado para la síntesis de los fosfolípidos mencionados en último termino. Respecto a las enzimas responsables de los pasos (3) y (4) se ha encontrado que están asociadas con membranas intracelulares. No obstante, es un hecho conocido que los fosfolípidos se intercambian entre distintos sistemas membranosos intracelulares. Este proceso sería mediado por proteínas específicas que, por ejemplo, transportan ácido fosfatídico al retículo endoplásmico y PI a la membrana plasmática (Harrison, 1975). Si bien son numerosos los trabajos que estudian el turnover del PI, no se ha podido hallar una correlación satisfactoria entre la inducción de la proliferación y el turnover incrementado del inositol-fosfato del PI. La activación de los linfocitos por acción de las lectinas produce un rápido incremento en la permeabilidad para varias sustancias; nucleósidos, azúcares, aminoácidos y cationes. Se ha sugerido como una posibilidad que la permeabilidad esté alterada en aquellos sitios donde ocurra turnover incrementado de este fosfolípido, debido a que por el mecanismo de ruptura y resíntesis se abran y cierren secciones específicas de la membrana (Harrison et al, 1975).

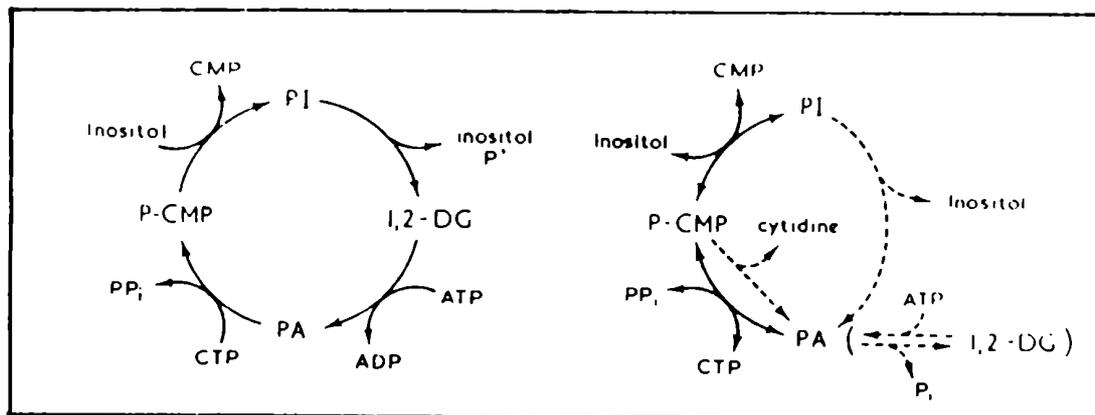
i) Rol del Ca^{2+} en el turnover del PI

Se ha demostrado que para activar los linfocitos es necesaria la presencia de cationes divalentes, especialmente el Ca^{2+} , ya que agentes quelantes con alta

afinidad por el Ca^{2+} inhiben en forma dosis-dependiente la proliferación inducida por leotinas (Kay, 1971; Whitney et al, 1972; Diamantstein, 1975). Cationes como el Sr^{2+} y Mg^{2+} son capaces de sustituir en algún grado el efecto del Ca^{2+} , pero a concentraciones mucho mayores. Otros cationes como el Zn^{2+} o Mn^{2+} no son efectivos, sugiriendo Resch (1976) que el tamaño del catión es crítico para permitir la activación por lectinas. Freedman et al (1975) sugieren que el paso crucial en la activación inducida por mitógenos en linfocitos T es la apertura de canales para el Ca^{2+} . Esto implicaría que el Ca^{2+} ejerce en cierta manera el rol de segundo mensajero que actúa en forma temprana en la secuencia de eventos que conducen a la proliferación celular (Crumpton et al, 1975). Mitchell et al (1977), postulan que los receptores que "disparan" el mecanismo de ruptura del PI presentan tres características comunes;

- a) no estimulan la adenilato-ciclasa,
- b) incrementan la permeabilidad de la superficie celular al Ca^{2+} , y
- c) pueden elevar los niveles intracelulares de GMP cíclico.

De tal modo, la ruptura del PI podría tener una importancia clave en el control de la permeabilidad de la superficie celular para el Ca^{2+} (Mitchell et al, 1976). Sin embargo, el mecanismo de dicha ruptura no está aún suficientemente aclarado. Por una parte, Mitchell (1975) postula el esquema 1 (de la Fig. 2) para la ruptura estimulada del PI, siguiendo el mecanismo de reacciones básico propuesto en el ítem e) de este trabajo. Por otra parte, Hokin-Neaverson (1977), propone el esquema 2 (Fig. 2) de acuerdo al cual como consecuencia de la ruptura del PI por una fosfolipasa de tipo D, aparecería inositol libre y no fosforilinositol. Otra alternativa que propone este autor es que el PI se degrada a CDP diglicérido e inositol mediante la síntesis inversa catalizada por la enzima CDP diglicérido; inositol transferasa, si bien objeciones de tipo energético han sugerido que este esquema puede no ser válido en distintos tejidos (Mitchell, 1975).



ESQUEMA I

ESQUEMA II

Fig. 2. Dos esquemas alternativos propuestos para la ruptura y resíntesis de PI en tejidos expuestos a estímulos apropiados. Abreviaciones; PA, ácido fosfatídico; 1,2-DG, 1,2-diacilglicerol; P-CMP, CDP-diacilglicerol.

La pregunta que surge en última instancia es cómo se relaciona la ruptura del PI con el control del proceso de permeación del Ca^{2+} en la membrana plasmática. Si bien hasta el momento no es posible contestar en forma fehaciente esta pregunta, parecería que existen tres mecanismos fundamentales, estando involucrado en ellos fundamentalmente el PI o el PA. Un mecanismo consistiría en que las moléculas de PI proveen sitios de unión a la entrada de los canales para el Ca^{2+} y que cuando las moléculas de PI se rompen el Ca^{2+} es liberado, abriéndose los canales para un subsiguiente flujo de iones Ca^{2+} hacia la célula estimulada. Otra posibilidad que puede observarse en la Fig. 2 (esquema 1) es que el PI se convierta en PA que puede actuar como ionóforo para el Ca^{2+} (Tyson et al, 1976). Finalmente, existe la posibilidad de que la variación lipídica local producida por la ruptura del PI determine modificaciones en las

estructuras responsables de la permeación del Ca^{2+} .

Para concluir, es interesante mencionar que en un trabajo reciente, Hart (1978) presentó evidencias de que el Mn^{2+} inhibe los eventos tempranos de la transformación de los linfocitos por mitógenos. Si bien no se conoce la naturaleza bioquímica del sitio o sitios de acción del Mn^{2+} , no es posible descartar la existencia de un mecanismo que implique la interferencia en la actividad del Ca^{2+} , a través de un proceso que involucre al PI.

ii) Compuestos que modifican el metabolismo del PI.

Se sabe desde hace varios años que un derivado de las fenotiazinas, la clorpromazina, aumenta la incorporación de ^{32}P a ácido fosfatídico y PI en cortes de cerebro (Magee et al, 1963). Posteriormente se ha demostrado que derivados de la fenotiazina, antidepresivos de imipramina, anestésicos locales, fenfluramina y sus derivados, propranolol y otros bloqueantes β -adrenérgicos, morfina y levorfanol, modifican la síntesis de fosfolípidos acídicos, probablemente a través de un mecanismo que implica la inhibición de la enzima fosfatídico-fosfohidrolasa (Brindley y Bowley, 1975). En la Fig. 3 se observa que dicha enzima actúa en un punto de ramificación donde la síntesis de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y triacil-glicerol diverge de los lípidos derivados del CDP diglicérido.

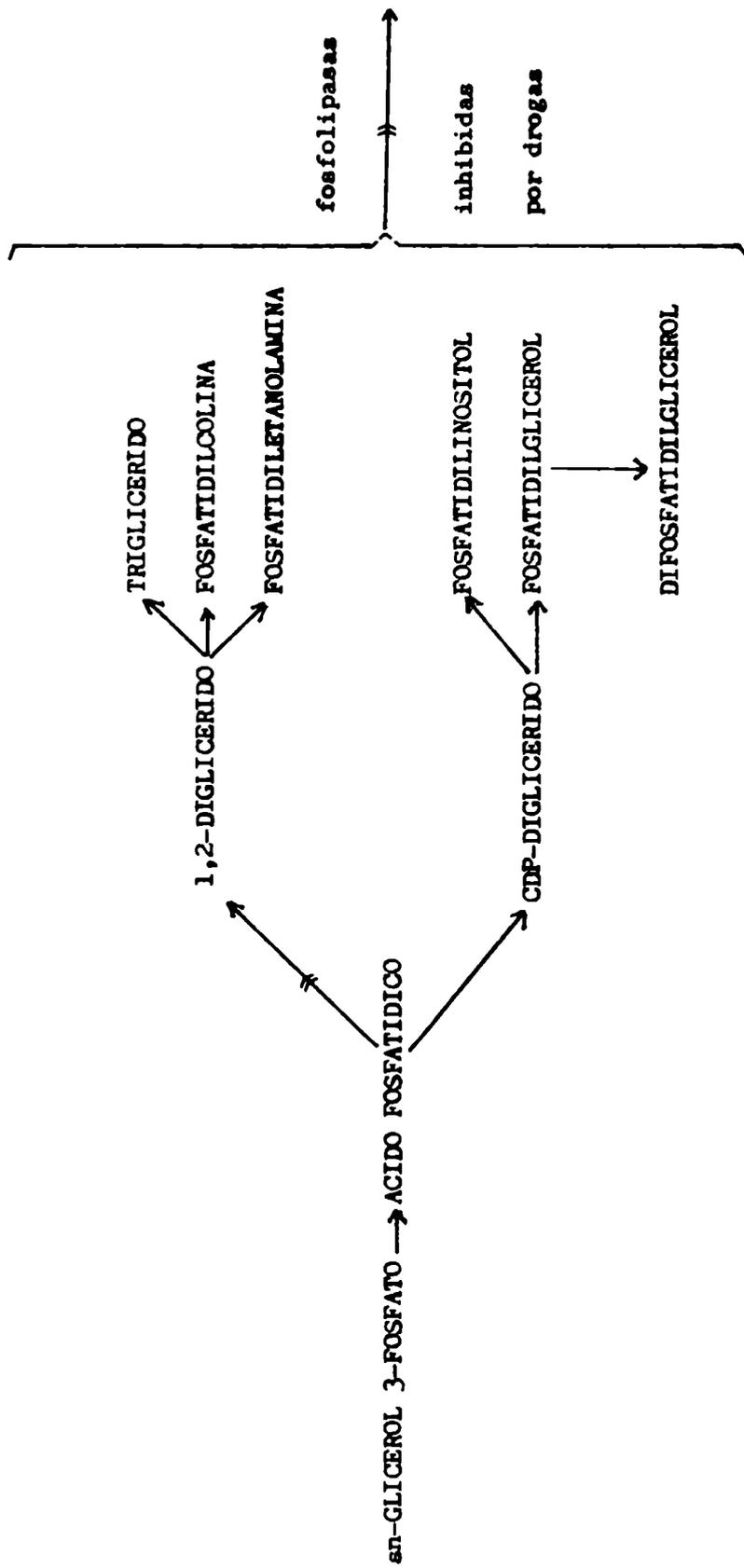


Fig. 3. Efecto propuesto para las drogas anfífilas sobre el metabolismo de los glicero lípidos. (Extraído de Michell et al, 1976).

((Pasos enzimáticos inhibidos por las drogas

Como resultado de dicha inhibición, el ácido fosfatídico se utiliza fundamentalmente a través del CDP-diglicérido para la síntesis de PI, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. Allan y Michell (1975) demostraron que por efecto de la clorpromazina, fenfloramina y otros derivados se estimula la síntesis de novo del PI en linfocitos, y que esta síntesis ocurre a expensas de una disminución aproximadamente equivalente en la velocidad de síntesis de otros glicero-lípidos de la célula. Estas conclusiones se basan en que dichos autores encuentran aumentada la incorporación de glicerol y fosfato a PI en aproximadamente el mismo orden. En cambio en linfocitos estimulados por PHA u otros mitógenos se encuentra estimulación en la incorporación de ^{32}P a PI sin disminución en la marca en otros fosfolípidos (Fisher y Mueller, 1968, 1971; Masuzawa et al, 1973; Maino et al, 1975) pero mucha menor estimulación en la incorporación cuando el precursor utilizado es glicerol radioactivo (Fischer y Mueller, 1971). De manera que el mecanismo de acción de estas drogas sería diferente al producido por estímulos fisiológicos que interactúan con receptores en la superficie de la célula. Por otra parte, Richberg y Hauser (1974) incubando glándulas pineales en presencia de propanolol encontraron aumento en la incorporación del precursor radioactivo en CDP-diglicérido, fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol. La diferencia en la marcación de estos glicero-lípidos respecto al resultado hallado por Allan y Michell puede deberse a que en linfocitos no se puede observar marcación apreciable en fosfatidilglicerol debido probablemente al escaso número de mitocondrias que presentan los mismos. Respecto a la naturaleza química de las drogas que producen los efectos mencionados, todas poseen un grupo amino ionizable y una región hidrofóbica, y se sabe además que interactúan con la membrana celular y con lípidos aislados mediante la interacción del grupo amino cargado con la "cabeza" aniónica de fosfolípidos ácidos como el ácido fosfatídico y el PI. Como consecuencia

de dicha interacción se produce neutralización de la carga del fosfato y la expulsión de cationes divalentes como el Ca^{2+} (Dawson y Hauser, 1970), cuyos cambios en concentración y distribución en la célula producen importantes alteraciones fisiológicas. Se conoce además que estas drogas producen alteraciones en fenómenos de membrana tales como el movimiento, fusión, permeabilidad, transporte y función de los receptores (Brindley et al, 1975), probablemente a través de un mecanismo que implica alteración de los microtúbulos y microfilamentos celulares. Recientemente Rao y Cann (1978) y Hinman y Cann (1976) demostraron que la clorpromazina se une in vitro a la tubulina de cerebro, impidiendo la polimerización de los microtúbulos y la unión de la colchicina por la proteína, causando además ruptura de los microtúbulos formados en ausencia de la droga.

f) Cambio en los ácidos grasos de los linfocitos.

Como ya fue mencionado, la interacción de un ligando con los receptores mitogénicos de la membrana plasmática sería suficiente para producir la activación de los linfocitos (Betel et al, 1972; Greaves et al, 1972; Andersson et al, 1972). Como consecuencia de la activación por el ligando se produciría una respuesta coordinada de reacciones bioquímicas no relacionadas entre sí, denominadas en su conjunto "respuesta pleiotrópica" (Hershko et al, 1971). Es así que otro evento que ocurre en forma inmediata a la unión del ligando es el incremento en el turnover de la cadena de ácidos grasos de la membrana del linfocito (Resch et al, 1972, a y b). Ferber y Resch (1973) encontraron que a los 30 minutos de agregada la PHA o Con-A a linfocitos de conejo se observa máxima activación en la enzima acyl-coA: lisolecitina aciltransferasa, que esta activación es idéntica a 0° C y 37° C, y además no es afectada por la puromicina. Esto sugiere que la activación de la enzima es una consecuencia di-

recta de la unión del ligando independientemente de la actividad metabólica de la célula. La enzima acyl-coA: lisolecitina aciltransferasa cataliza la incorporación de ácidos grasos de diferente longitud de cadena o grado de insaturación. Ferber y Resch (1973) encontraron que en la membrana plasmática de los linfocitos esta enzima posee alta afinidad por ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido araquidónico. El k_m para el ácido araquidónico es 20 veces menor que para el ácido oleico. Los ácidos grasos poliinsaturados se transfieren preferencialmente a la posición 2 de la molécula de fosfolípido, observándose que cuatro horas después de la estimulación el contenido en ácido araquidónico es más del doble. Este resultado se halló tanto in vivo como in vitro, utilizando membranas microsomales de linfocitos estimulados por Con-A. Como consecuencia del alto contenido en ácidos poliinsaturados se produce un incremento en la fluidez de la membrana, (Overath y Trüble, 1973).

g) Correlación entre la activación del metabolismo de los fosfolípidos de membrana y la inducción de la mitosis.

La existencia de varios hechos demostrados experimentalmente ha permitido que se postulara en forma fehaciente la relación entre cambios inducidos por el mitógeno en el metabolismo de los fosfolípidos y la inducción de la proliferación celular;

- 1) Como ya fue mencionado, para que ocurra activación por un mitógeno es necesaria la presencia de iones Ca^{2+} ; la activación del turnover de los ácidos grasos de los linfocitos también está regulada por el Ca^{2+} (Resch, 1976).
- 2) La mayoría de los mitógenos conocidos presentan alta selectividad hacia alguna de las dos poblaciones de linfocitos, T ó B. En timocitos de ratón solamente la PHA o Con-A (específicos para linfocitos T) producen incremento en la incorporación de (^{14}C)-oleato a los fosfolípidos mientras que mitógenos específicos de células B, como las anti-inmunoglobulinas, no desencadenan ningún cambio.

Inversamente, en preparaciones de células B se observa turnover de los ácidos grasos de los linfocitos solamente cuando dichas células son estimuladas por mitógenos B-específicos.

Más aún, debido a su organización estructural, que favorece interacciones de tipo cooperativo, los fosfolípidos podrían actuar como mecanismo de amplificación de la respuesta pleiotrópica de la membrana, ya que pequeñas perturbaciones en distintos sitios de la matriz de los fosfolípidos son capaces de cambiar inmediatamente toda la fase lipídica (Wilson y Fox, 1971).

II. Antecedentes inmediatos y objetivos de la investigación.

La observación de que las células animales pueden duplicar su DNA en un intervalo discreto, ha permitido dividir al ciclo celular en cuatro fases; G_1 , S (período de síntesis de DNA), G_2 y M (mitosis). G_1 ("Gap₁") es el período que media entre la mitosis y la iniciación de la síntesis de DNA, G_2 ("Gap₂") es el período entre S y M. Para la mayoría de las células en crecimiento en cultivo de tejidos, el intervalo entre divisiones oscila entre 10 y 30 horas (Baserga, 1976). Las células normales, cuando alcanzan la fase G_1 , pueden evolucionar hasta la proliferación o el reposo. Las células en reposo, entre las cuales se encuentran los linfocitos no estimulados, "escapan" del ciclo celular y entran en un estado cualitativamente distinto, denominado G_0 durante el cual no se observa síntesis de DNA. Esta observación deja de ser válida cuando se estudian los núcleos aislados de linfocitos en reposo (Fridlender et al, 1974), ya que éstos son capaces de incorporar los deoxiribonucleósidos trifosfatos (dNTP_s) al DNA a la misma velocidad que los núcleos de linfocitos estimulados, Sin embargo, la velocidad de síntesis de DNA en núcleo aislado es mucho menor que la velocidad de síntesis in vivo. Es posible que debido a la ausencia del citoplasma se pierdan factores citoplasmáticos requeridos para la replicación del DNA, así como que se destruyan interacciones estructurales o espaciales núcleo-citoplasma (Castellot et al, 1978). Para tratar de resolver las discrepancias arriba mencionadas, así como el rol de los factores citoplasmáticos en la síntesis de DNA, Mordoh y Fridlender (1977) desarrollaron un sistema para permeabilizar linfocitos humanos. En esas condiciones, las células pierden la capacidad de incorporar timidina (dT) al DNA, pero en cambio los dNTPs y rNTPs son capaces de entrar a la célula. Cuando se utilizó (³H)-dCTP como precursor de la síntesis de DNA, se observó que éste se incorpora a un material ácido precipitable en cantidad mucho mayor que los otros tres dNTPs (Tabla II)..

Tabla II: Incorporación de dNTPs a células permeabilizadas y núcleos aislados (Mordoh y Fridlender, 1977)

Material usado	Precursor radioactivo	pmols dNTPs incorporados por 1×10^6 células ó núcleos
Núcleos aislados	(^3H)-TTP	0.085
	(^3H)-dATP	0.100
	(^3H)-dCTP	0.380
	(^3H)-dGTP	0.230
Célula entera	(^3H)-TTP	0.080
	(^3H)-dATP	0.150
	(^3H)-dCTP	2.76
	(^3H)-dGTP	0.45

Al realizar estudios para caracterizar el producto obtenido, a partir de (^3H)-dCTP dichos autores encontraron que la mayor parte de la radioactividad precipitada por ácido (PCA) es soluble en etanol, cosa que no sucede cuando se efectúa el mismo tratamiento al producto obtenido in vivo con (^3H)-dT como precursor. Esta observación les permitió suponer que además de DNA se sintetizaba otro producto cuando las células permeabilizadas se incubaron con (^3H)-dCTP como precursor. Esta presunción de vió confirmada por los experimentos descritos en la Fig. 4, en la que se muestra que cuando se incuban las células como se mencionó en último término, se lisan y se estudia su comportamiento en un gradiente de ClCs se obtiene como producto, además del DNA que bandea en la zona del (^{14}C)-DNA usado como marcador, otra zona radioactiva con una densidad mucho menor.

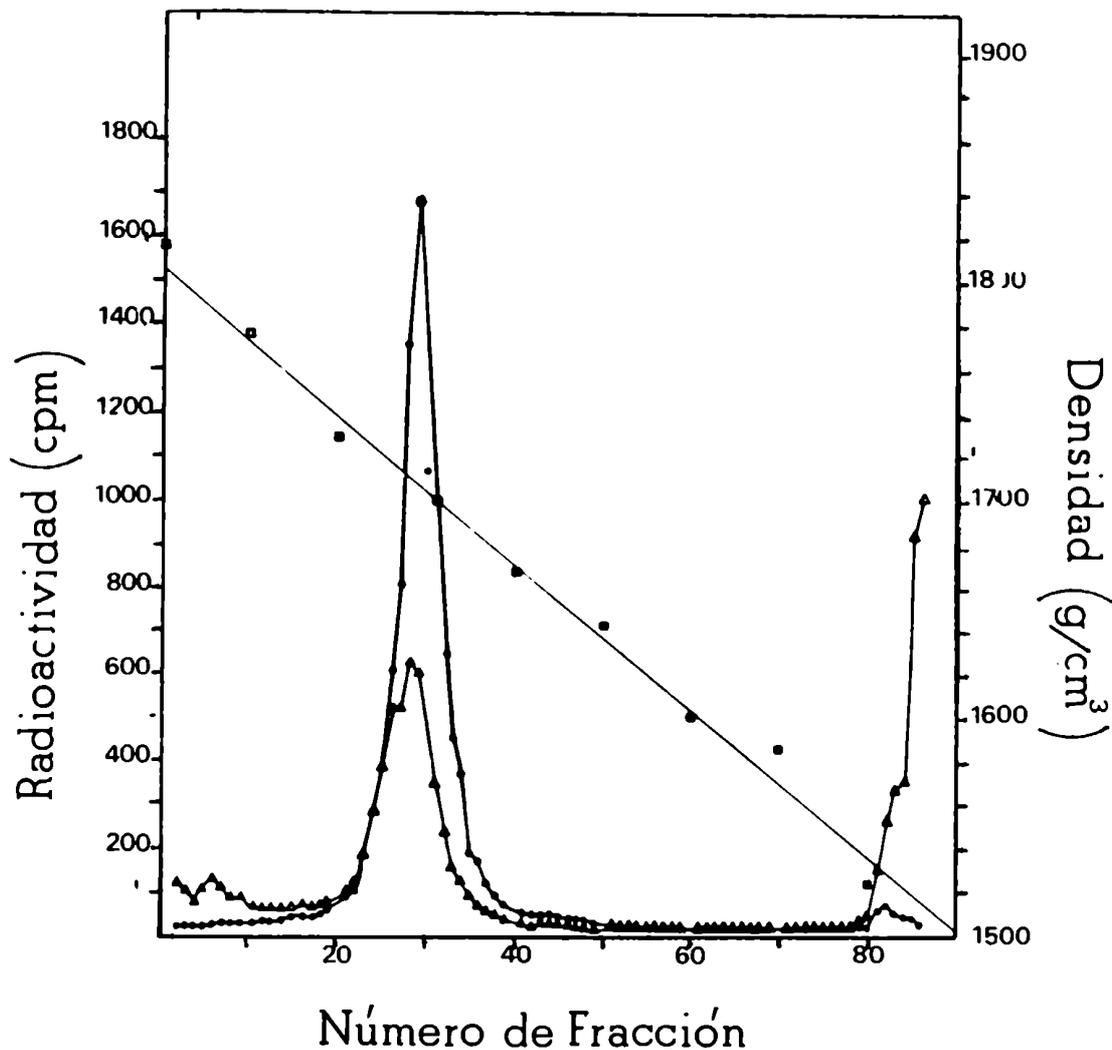


Fig. 4. Densidad flotante del producto obtenido en células permeabilizadas a partir de $(^3\text{H})\text{-dCTP}$
 ●● $(^{14}\text{C})\text{-DNA}$ standard
 ▲▲ producto marcado con $(^3\text{H})\text{-dCTP}$
 ○-○ densidad.

En la Tabla III (a) se muestran además las características de solubilidad del producto sintetizado, mientras que en la Tabla III (b) se muestra la naturaleza particulada de las enzimas que incorporan $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ y del producto formado.

Tabla III (a): Características de solubilidad del compuesto sintetizado en células enteras con (^3H)-dCTP.

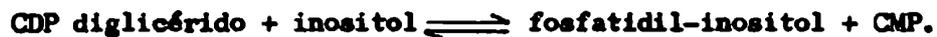
Condiciones	Solubilidad en diferentes fases		
	Acuosa	Interfase	Orgánica
Producto con (^3H)-dCTP	10 %	8 %	82 %
Producto con (^3H)-dCTP después de hidrólisis ácida (1 N ClH_3 ; 100° C 15 minutos)	83 %		17 %
(^3H)-dCTP (4 umoles; 500 cpm/pmol)	90 %		10 %
(^{14}C)-DNA	87.4 %		12.6 %

Tabla III (b): Naturaleza particulada de la incorporación de (^3H)-dCTP

Paso I	Paso II	Fracción	Radioact. incorporada al pp de FCA	
			+PHA	-PHA
A) Incubación a 37° C durante 30 minutos sin dNTPs. Centrifugación.	El pellet se resuspende en el "medio celular" con dNTPs.	pp.	6319	3486
	Al sobrenadante se le agregan dNTPs. Se continúa la incubación por otros 30 min. a 37°C.	sob.	156	110
B) Incubación a 37° C durante 30 minutos en "medio celular" conteniendo dNTPs. Centrifugación.	El pellet se resuspende en el "medio celular" sin dNTPs.	pp.	4037	1309
	El pellet y el sobrenadante se incuban por otros 30 min. a 37° C.	sob.	441	190

De esta manera los autores mencionados pudieron demostrar que en el sistema de ensayo utilizado se sintetizaban dos productos; DNA y un compuesto soluble en solventes orgánicos.

En 1958 Agranoff et al (a, b) propusieron a la citidina difosfato D- α, β -diglicérido como precursor metabólico del inositol a través de la reacción



La principal evidencia para la formación del liponucleótido fue la producción de una sustancia radioactiva en la capa lipídica después de incubar preparaciones particuladas de riñón de cobayo con (^3H)-CMP en ausencia de inositol. Por otra parte, Rastz y Kennedy (1973), encontraron que en *Escherichia coli* los liponucleótidos de citosina están formados por cantidades aproximadamente iguales de CDP-diglicérido y dCDP diglicérido y Ter Shegget et al (1971), demostraron que preparaciones de mitocondrias de hígado de rata son capaces de incorporar rápidamente dCTP a dCDP-diglicérido.

De acuerdo con estos resultados, se juzgó interesante;

- i) determinar la naturaleza química y bioquímica del compuesto soluble en solventes orgánicos obtenido por síntesis in vitro,
 - ii) estudiar su posible síntesis in vivo,
- y asimismo, por las razones expuestas más arriba,
- iii) analizar su posible rol como compuesto intermediario en la síntesis de fosfolípidos celulares.

<u>MATERIALES Y METODOS</u>	<u>Página</u>
I. a) Purificación de linfocitos.	33
b) Líneas celulares.	33
II. <u>Métodos analíticos</u>	
a) Cromatografía en papel.	34
b) Cromatografía en placa delgada.	34
c) Saponificación.	34
d) Tratamiento con Fosfolipasa C.	35
e) Tratamiento con Fosfolipasa D.	35
f) Tratamiento con nucleótidopirofosfatasa.	36
g) Hidrólisis alcalina.	36
h) Discriminación de la radioactividad detectada por el radiocromatógrafo.	36
III.	
a) Incorporación de dNTP _g en células enteras.	37
b) Obtención y purificación del compuesto marcado <u>in vivo</u> con (¹⁴ C)-glicerol e <u>in vitro</u> con (³ H)- dCTP.	37
c) Fraccionamiento subcelular de las células per- meabilizadas.	38
d) Purificación por gradiente de sacarosa.	39
e) Incubación <u>in vivo</u> con (³ H)-dC.	39
f) Obtención del compuesto marcado <u>in vivo</u> con (¹⁴ C)-glicerol y (³ H)-dC.	39
g) Preincubación con ácido araquidónico.	40
i) Obtención de las fotografías	40

MATERIALES Y METODOSIa) Purificación de linfocitos

Se extraen 500 ml de sangre venosa de dadores voluntarios en presencia de heparina (10 U/ml). Se agrega Dextrano al 10% (Sigma, P.M.. 500.000), disuelto en ClNa 0.15M, a una concentración final del 0.6% y se deja sedimentar la sangre durante 90 minutos. Se separa el plasma, y a la fracción de glóbulos rojos remanente se le agrega una solución salina de buffer de fosfato (PBS; Phosphate buffered saline) conteniendo 0.3% de Dextrano hasta alcanzar el volumen inicial de sangre.

Después de sedimentar y de separar nuevamente el sobrenadante, éste se combina con el anterior. Después de agregar 5'-ADP (concentración final; 10 ug/ml) se pasan rápidamente a través de una columna conteniendo 6 g de fibra de nylon (Hilanderías Chilavert, Argentina). El material eluyente de la columna se centrifuga a 100 x g durante 30 minutos y el precipitado (pellet) se resuspende en 24 ml de PBS. Esta suspensión se agrega a la parte superior de dos gradientes que contienen 5 ml de Ficoll al 12%, 3 ml de Hypaque al 50% y 2 ml de PBS. Después de centrifugar a 2.000 g durante 10 minutos en el rotor HB-4 de la Sorvall, se separan las interfases, se diluyen con PBS y se centrifugan. El precipitado se redisuelve en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) y después de contar, se diluyen los linfocitos (99% puros y virtualmente sin plaquetas) a una concentración de 1×10^6 células en MEM que contiene 10% de suero de feto de ternero, Hepes 20 mM (pH 7.2), glutamina 1 mM y 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomycin. Cuando se indica, se agrega 0.10 ml de fitohemaglutinina Difco (PHA-P) reconstituida con 5 ml de agua bidestilada, a 100 ml de cultivo. Los cultivos se incuban a 37°C durante 72 horas.

b) Líneas celulares

Las líneas celulares HRIK y Raji "S" así como las células de un paciente leucémico fueron generosamente donadas por la Dra. Marcela Fejes (Departamento de

Hematología, Academia Nacional de Medicina).

II. Métodos analíticos

a) Cromatografía en papel

Se utilizó papel Whatman N° 1. Los sistemas de solventes empleados fueron los siguientes:

I: etanol-metil-etil cetona-tetraborato de morfolinio 0.5M (pH 8.6) en 0.01 M EDTA-70;20;30. (Carminatti et al, 1965).

II: acetato de amonio 1 M-etanol 600; 1500 (Palladini et al, 1952).

Los nucleótidos se revelaron al U.V. usando una lámpara Mineralite. Los compuestos fosforilados se revelaron con el reactivo de Burrows (1952) y los radioactivos mediante un radiocromatógrafo Packard.

b) Cromatografía en placa delgada

i) La cromatografía de los extractos lipídicos se efectuó en placas de Sílica Gel G (Eastman Kodak). Como sistemas de solventes de emplearon:

III: cloroformo-metanol-acético-agua 50; 25; 7; 3.

IV: cloroformo-metanol-acético-agua 15; 2; 9; 1.

V: isopropanol-acético-agua 27;4; 9.

VI: cloroformo-metanol-hidróxido de amonio-agua 65; 35; 3; 2.

Los lípidos usados como "standard" se detectaron colocando la placa en atmósfera de I₂.

ii) Los nucleósidos y nucleótidos fueron también determinados usando placas de PEI celulosa, el solvente utilizado fue;

VII: Acido bórico 2%-Cl₂ 2M 2;1.

c) Saponificación

Se llevaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 30°C 5000 rpm del extracto

clorofórmico extraído de linfocitos-PHA (incubados in vitro según se explica más adelante, en presencia de (^3H)-dCTP como precursor) y 8000 cpm del compuesto extraído en idénticas condiciones de linfocitos + PHA.

Se agregó a cada tubo la siguiente mezcla: 150 ul de butanol saturado en agua 850 ul de metanol, 250 ul de cloroformo y 60 ul de ClLi 2N en un volumen final de 1310 ul. Se incubó durante 30 minutos a 30°C . Se extrajo con volúmenes decrecientes de agua (500, 150 y 100 ul respectivamente). El volumen total de agua así obtenido fue a su vez reextraído con volúmenes decrecientes de cloroformo (200 y 100 ul). Se contaron alícuotas de ambas fases (orgánica y acuosa) con líquido de centelleo Bray en un Packard Tricarb Scintillation Counter.

d) Tratamiento con Fosfolipasa C

Se llevaron a sequedad (en presencia de N_2) 6000 cpm del compuesto tritiado disuelto en solución clorofórmica. Se usó la siguiente mezcla de incubación; buffer Tris- ClH 0.04 M pH 7,4; Cl_2Ca 5 mM, lecitina 10 mM. Se sonicó 3 veces durante 10 segundos y se agregó 20 ul de solución de enzima (Fosfolipasa C de *Clostridium welchii*) en un volumen final de 300 ul, usándose como control un tubo en que se efectuó el mismo tratamiento pero sin agregar enzima. Se extrajo con 2 ml de cloroformo y se contaron en un Packard alícuotas de ambas fases disueltas en líquido de Bray.

e) Tratamiento con Fosfolipasa D

Se llevaron a sequedad 10.000 cpm del compuesto tritiado. La reacción se llevó a cabo en la siguiente mezcla; buffer Mes 0.1 M, Cl_2Mg 0.5 mM, lecitina 10 mM y 40 ul de solución de enzima (Fosfolipasa D de repollo, Sigma). La incubación así como la extracción de la fase lipídica y determinación de la radioactividad en las fases acuosa y orgánica se realizó como se explicó para la enzima Fosfolipasa C.

f) Tratamiento con nucleótido pirofosfatasa

El producto extraído con cloroformo metanol (6000 cpm) se secó bajo N_2 y se resuspendió por agitación suave en 150 ul de Tris ClH-10 mM (pH 7.4), Cl_2Mg 10 mM. Se agregó al medio de ensayo 15 ul de solución concentrada de Nucleótido pirofosfatasa de veneno de *Crotalus adamanteus* (tipo II, Sigma) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con igual volumen de etanol. Después de centrifugar se sembró el sobrenadante límpido en papel Whatman 1 y se cromatografió en solvente I (descrito más arriba) usando dCMP y CMP como "standards".

Previamente fue determinada la actividad de la enzima sobre los siguientes compuestos; CDP, CDP-glicerol y CDP-diglicérido.

g) Hidrólisis alcalina

Las células permeabilizadas se marcaron con (3H)-dCTP de acuerdo con el procedimiento que se explica más adelante. Después de precipitar con TCA 10% y lavar los precipitados como se describe en III, se efectuó una hidrólisis alcalina en HOK 0.3N a 37°C durante 18 horas. Después de neutralizar con ácido perclórico concentrado y centrifugar, se analizó el sobrenadante usándose para ello dos sistemas cromatográficos; a) Papel Whatman I y solvente I y b) placas de PEI celulosa y solvente VII. La radioactividad fue detectado usando un radiocromatógrafo Packard.

h) Discriminación de la radioactividad detectado por el radiocromatógrafo.

Quando fue necesario discriminar la radioactividad obtenida en (^{14}C) y (3H), se cortó el cromatograma en tiras de 0.5cm y se colocaron en viales con Tolueno-Omnifluor como líquido de centelleo. Se determinó la radioactividad en un contador Packard estableciendo condiciones diferenciales para (3H) y (^{14}C).

III. a. Incorporación de dNTP_s en células enteras

Cuando se usan células enteras para incorporar los dNTP_s, se centrifugan alícuotas del cultivo a 3000 rpm durante 10 minutos y se resuspenden en 0.3 ml del medio de permeabilización que contiene Hepes 50 mM pH 7.2, Cl₂ Mg 5 mM, Ditioneitol (DTT) 1 mM; ATP-Mg 0.5 mM, Cl₂Ca 0.2 mM y 3.3 uM del dNTP radioactivo (1000 cpm/pmol). La reacción se detiene usando uno de los dos métodos que se indican a continuación; a) se agrega 0.1 ml de pirofosfato de sodio, 0.1 M, 0.2 ml de DNA desnaturalizado por calor (2.5 mg/ml); 0.9 ml de H₂O y 0.25 ml de ácido perclórico al 12% (PCA). La mezcla se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos. Se extraen los lípidos como se indica más adelante. El precipitado remanente se disuelve en 0.5 ml de NaOH 0.2N. Después de agregar 1 ml de agua, se reprecipita con 0.25 ml de PCA 12%. Todo este tratamiento se realiza a 3-5°C. El precipitado se disuelve finalmente en 0.2 ml de NCS (solubilizante de tejidos de Amerskam, Scarle) agregándose 10 ml de mezcla de centelleo de Bray. Se cuenta en un contador Packard Tricarb Scintillation; b) después de incubar, la reacción se termina por agregado de un volumen igual de ácido tricloroacético al 10% (TCA) que contiene pirofosfato de sodio 20 mM. Después de centrifugar, se lava el precipitado 5 veces con 3 ml de TCA al 5% que contiene pirofosfato de sodio 10 mM. Para realizar la extracción de lípidos, el precipitado se calienta a 55°C durante 3 minutos con cloroformo-metanol(1;1) que contiene 0.01 NHCl (Thompson, 1974). Cuando no se aclara, después de incubar se mide la radioactividad incorporada al precipitado total de PCA 12% sin extraer con solventes orgánicos.

b. Obtención y purificación del compuesto marcado in vivo con (¹⁴C) - glicerol e in vitro con (³H)-dCTP.

Se centrifugaron 50×10^6 linfocitos estimulados con PHA y se resuspendieron en 1 ml de MEM conteniendo 2 uCi de (¹⁴C)-glicerol. Después de incubar durante 1 hora a 37°C las células fueron centrifugadas y

resuspendidas en 3 ml de la mezcla de permeabilización ya descrita. La incubación, lavado de los precipitados, extracción y cromatografía de los compuestos marcados fue desarrollada como ya fue detallado.

El compuesto doblemente marcado que co-cromatografió con el compuesto marcado solamente con tritio y que se usó como compuesto de referencia, se raspó de la placa de sílica gel, se disolvió en Cl_3CH -metanol- H_2O (1:1:0.3) y se contó una alícuota con mezcla de centelleo de Bray en un Packard, midiendo en forma independiente la radioactividad de (^3H) y (^{14}C).

El compuesto se secó bajo N_2 y se le efectuó una hidrólisis alcalina como ya fue descrito. Después de neutralizar, los compuestos fueron sembrados en papel Whatman 1 y corridos con el solvente II usando dCMP y -glicerol fosfato como standards.

c. Fraccionamiento subcelular de las células permeabilizadas

Se partió de 70×10^6 linfocitos + PHA. Se centrifugaron y resuspendieron en 6 ml de mezcla de permeabilización ya descrita. Después de incubar se llevó la mezcla a 0.25 M de sacarosa y se rompió las células con 20 golpes de homogeneizador Dounce. La observación al microscopio de contraste de fases (Carl Zeiss, Alemania) permitió comprobar que más del 95% de las células habían sido rotas por el tratamiento efectuado. Se procedió a centrifugar a 600g durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall obteniéndose un precipitado que se denominó "Fracción 600 g". El sobrenadante fue centrifugado a 3000 g en idénticas condiciones. Se obtuvo un precipitado denominado "Fracción 3000 g", y un sobrenadante que por centrifugación a 25000 g permitió obtener la "Fracción 25000 g". El sobrenadante de esta última fracción se centrifugó 100000 g durante 30 minutos (Spinco Ultracentrifuge, Beckman Instr.). Se obtuvo así la "Fracción 100.000 g" y "Sobrenadante de 100.000 g".

Las diversas fracciones particuladas, fueron precipitados con ácido según se indica en el método a) explicado en el ítem III de este capítulo. El sobrenadante de 100.000 g fue precipitado con igual volumen de TCA 10% y tratado según el

método b) (item III). La extracción del material soluble en solventes orgánicos de todas las fracciones se realizó como ya fue explicado anteriormente.

d. Purificación por gradiente de sacarosa

Se centrifuga un número apropiado de células (usualmente 100×10^6) y se resuspenden en 1 ml de Buffer hipotónico; buffer de fosfato 10 mM pH 6.5 conteniendo Cl_2Mg 10 mM. Después de permanecer 20 minutos en frío para permitir que las células se hinchen, se homogeneizó con 40 golpes de un homogeneizador Dounce y se centrifugó a 600 g durante 10 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en la mezcla de incubación ya descrita. Después de incubar dicha mezcla, se sembró sobre 4 ml de sacarosa 60% y se centrifugó en el rotor HB-y de Sorvall a 2000 g durante 15 minutos. Se obtuvo un precipitado constituido por núcleos intactos, sin partículas y una interfase de aspecto particulado libre de núcleos.

e. Incubación "in vivo" con $(^3\text{H})\text{-dC}$

Generalmente se centrifugaron 10×10^7 células y se resuspendieron en 0.5 ml de MEM que contiene 10% de suero fetal y los agregados que ya fueron mencionados (I. Purificación de linfocitos). Se incubaron las células con 2 uCi de $(^3\text{H})\text{-dC}$ durante el tiempo indicado en cada experimento y se extrajeron las cpm incorporadas a la fracción lipídica o al precipitado remanente después de extraer la misma.

f. Obtención del compuesto marcado "in vivo" con $(^{14}\text{C})\text{glicerol}$ y $(^3\text{H})\text{-dC}$.

Se siguió un procedimiento similar al descrito en IIIb). Se centrifugaron 50×10^6 células + PHA y se resuspendieron en 1 ml de MEM conteniendo 2 uCi de $(^{14}\text{C})\text{ glicerol}$ y 8 uCi de $(^3\text{H})\text{ dC}$, en presencia de clorpromazina a la concentración de 60 μM . La purificación del compuesto doblemente marcado así como

la hidrólisis alcalina efectuada al mismo se realizó en las condiciones ya mencionadas para el compuesto sintetizado parcialmente in vitro utilizando (^{14}C) glicerol y luego (^3H)-dCTP). La clorpromazina empleada en este trabajo fue un generoso regalo del Dr. Daniel P. Cardinali (Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales, CONICET).

g. Preincubación con ácido araquidónico (Acido 5,8,11,14 Eicosatetraenoico).

Se centrifugaron para cada ensayo 10×10^6 linfocitos + PHA y se resuspendieron en 0.5 ml de MEM completo. El ácido araquidónico de hígado porcino (gentilmente enviado por el Dr. N. Bazan (Universidad Nacional del Sur), preparado como solución etanólica concentrada a la que se le burbujeó N_2 , fue agregado a la concentración adecuada para cada ensayo. Se preincubó durante 60 minutos a 37°C . Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio MEM fresco e incubadas durante 60 minutos en presencia de 2 uCi de (^3H)-dC. La fracción lipídica se extrajo como ya fue mencionado.

IV. Obtención de las fotografías

Las fotos de la pág. 67 se obtuvieron con una máquina Polaroid adosada a un microscopio Wild (Suiza).

RESULTADOSPágina

I.	<u>Caracterización del sistema de linfocitos permeabilizados</u>	
	a) Comportamiento frente a diversas adiciones.	44
	b) Efecto de la sacarosa.	46
	c) Efecto de la actinomicina D.	47
	d) Dependencia de la presencia de nucleótidos.	49
	e) Dependencia de la incorporación de (³ H)-dCTP con el tiempo.	49
II.	<u>Identificación del material radioactivo obtenido in vitro incubando el sistema de células permeabilizadas con (³H)-dCTP.</u>	
	a) Cromatografía del producto en diversos solventes.	51
	b) Saponificación.	52
	c) Tratamiento con Fosfolipasas C y D.	54
	d) Hidrólisis alcalina.	55
	i) Extracción con cloroformo-metanol del compuesto lipídico sin partición.	55
	ii) Extracción del producto marcado después de la hidrólisis alcalina.	56
	iii) Análisis del producto de la hidrólisis alcalina.	57
	e) Tratamiento con nucleótido-pirofosfatasa.	58
	f) Caracterización parcial de la parte lipídica.	60

III.	<u>Naturaleza particulada de la síntesis del compuesto soluble en solventes orgánicos</u>	66
	a) Distribución subcelular de la marca de (^3H)-dCTP	66
	b) Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática.	68
	c) Efecto del agregado de lípidos exógenos sobre la fracción 500xg de células +PHA.	69
	d) Purificación de la fracción 600xg en gradiente de sacarosa.	70
	e) Comparación entre la incorporación de (^3H)-dCTP y (^3H)-CTP a "membranas y núcleos de linfocitos en reposo y estimulados por PHA.	72
	f) Competencia del CTP sobre la incorporación de (^3H)-dCTP en la fracción lipídica.	74
IV.	<u>Síntesis in vivo de fosfatidil-dCMP</u>	77
	a) Incorporación de (^3H)-dC a linfocitos obtenidos a distintos tiempos de su estimulación por PHA.	77
	b) Cromatografía en placa delgada del compuesto obtenido <u>in vivo</u> en fase orgánica incubando con (^3H)-dC.	77
	c) Efecto de la Clorpromazina (CPZ) sobre la incorporación de (^3H)-dC.	79
	d) Curva de tiempo para la incorporación de (^3H)-dC en presencia de clorpromazina.	81

e)	Efecto de la clorpromazina sobre la incorporación de (³ H)-dC en diferentes sistemas de células humanas.	82
f)	Identificación del compuesto obtenido <u>in vivo</u> en presencia de CPZ.	83
	i) Cromatografía en placa delgada.	84
	ii) Hidrólisis alcalina del producto obtenido marcando con (¹⁴ C)-glicerol, (³ H)-dC y CPZ.	87
V.	<u>Posible rol del fosfatidil-dCMP como intermediario en la síntesis de fosfatidil-inositol</u>	88
	a) Efecto del tratamiento con Fosfolipasa C	90
	b) Utilización del fosfatidil-dCMP sintetizado <u>in vitro</u>	91
	c) Estudio de la relación F-dCMP/PI obtenida <u>in vitro</u> e <u>in vivo</u> .	93
	d) Efecto de la preincubación con ácido araquidónico sobre la síntesis de fosfatidil-dCMP.	99
	e) Efecto del Ara-C (1- β -D arabinofuranosilcitosina)	101

I. Caracterización del sistema de linfocitos permeabilizados

a) Comportamiento frente a diversas adiciones.

Los resultados obtenidos por Mordoh y Fridlender (1977) y descritos en la tabla II de la Introducción demuestran que en células permeabilizadas es mucho mayor la incorporación en la fracción precipitable por ácido perclórico (PCA) cuando se usa (^3H) -dCTP como precursor radioactivo que cuando se utiliza (^3H) -TTP. Dichos autores, presentan evidencias en el trabajo mencionado de que la incorporación de (^3H) -dCTP es mayor que la de los otros tres dNTPs debido a que, además de DNA, se sintetiza un compuesto soluble en solventes orgánicos.

En los experimentos descritos en la tabla IV se confirman los resultados obtenidos para la incorporación de (^3H) -dCTP y (^3H) -TTP y se describen además distintas condiciones de incubación, con el objeto de comparar los requerimientos entre (^3H) -TTP, que se usó como precursor "de referencia" respecto a la de (^3H) -dCTP que se incorpora en forma diferencial como ya fue mencionado.

Tabla IV: Incorporación de (^3H) -TTP y (^3H) -dCTP a linfocitos permeabilizados en reposo (- PHA) y estimulados por PHA

	(^3H) -TTP				(^3H) -dCTP			
	Linf. + PHA		Linf. - PHA		Linf. + PHA		Linf. - PHA	
Agregados	cpm	%	cpm	%	cpm	%	cpm	%
Completo	2033	100.0	639	100	16.894	100	10.227	100
Preinc. 30'a 37°C	2133	104.9	1402	219.4	12.105	71.6	9.216	90.1
+Hepes 50 mM								
pH 8.0 (- glicina)	2100	103.5	738	115.5	12.758	75.5	4.887	47.8
+Sacarosa 0.1%	3730	183.5	1362	213.1	6.778	40.1	1.059	10.2
+ClNa 60 mM	2221	109.2	858	134.2	4.822	28.5	1.379	13.5

El medio de incubación completo está descrito en Materiales y Métodos. Se usaron 3×10^6 células por ensayo, resuspendidas en 0.3 ml de medio de permeabili-

zación que contenía 1000 pmoles de (^3H)-TTP ó 1000 pmoles de (^3H)-dCTP (1000 cpm/pmol). Se incubó 30 minutos a 37° C. Se determinó la radioactividad incorporada al precipitado de PCA (descrito en Métodos).

Los resultados obtenidos demuestran que se está frente a dos reacciones diferentes. En efecto, la incubación a pH 6.0 estimula ligeramente la incorporación de (^3H)-TTP mientras inhibe la de (^3H)-dCTP; la presencia de las concentraciones indicadas de sacarosa y ClNa estimulan la incorporación de (^3H)-TTP, inhibiendo fuertemente en cambio la incorporación de (^3H)-dCTP.

En la tabla V se observa la relación de incorporación entre linfocitos estimulados y en reposo, para un mismo precursor radioactivo.

Tabla V: Relación de incorporación entre linfocitos estimulados por PHA y en reposo (- PHA)

Precursor	$\frac{\text{cpm dNTP (L + PHA)}}{\text{cpm dNTP (L - PHA)}}$
(^3H)-TTP	3.2
(^3H)-dCTP	1.05

Estas relaciones fueron obtenidas con los resultados de la tabla IV.

De la tabla V se podría inferir que la relación aumentada de (^3H)-TTP respecto a (^3H)-dCTP se debe a que en el primer caso, sólo se sintetiza DNA en linfocitos estimulados, con muy baja incorporación en linfocitos en reposo (confirmando resultados ya conocidos obtenidos in vivo) mientras que para el dCTP éste no se cumple ya que hay apreciable incorporación en linfocitos en reposo, que es aumentada cuando las células se estimulan por el mitógeno.

En la tabla VI se estudian las características de solubilidad de los productos obtenidos con (^3H)-TTP y (^3H)-dCTP, observándose que existe mayor incorporación en fase orgánica para el producto obtenido a partir de (^3H)-dCTP, mientras que

el producto obtenido a partir de (^3H)-TTP se recupera esencialmente en fase acuosa. Esto es una demostración adicional de que a partir de (^3H)-TTP la síntesis predominante es de DNA, ya que Mordoh y Fridlender (1977) demostraron que si se particiona DNA en las mismas condiciones del experimento más del 80 % del mismo se distribuye en la fase acuosa. En cambio, al utilizar (^3H)-dCTP como precursor además de DNA se sintetiza un compuesto de características lipídicas.

Tabla VI: Características de solubilidad del producto formado por linfocitos + PHA y - PHA incubados con (^3H)-dCTP y (^3H)-TTP

Producto	Solubilidad en las diferentes fases		
	Acuosa	Interfase	Orgánica
Células + PHA + (^3H)-dCTP	12	12	76
Células - PHA + (^3H)-dCTP	23	17	60
Células + PHA + (^3H)-TTP	63	21	16
Células - PHA + (^3H)-TTP	58	25	17

En cada caso se utilizaron 5×10^6 células que se incubaron en la mezcla de permeabilización como está descrito en Métodos. Después de incubar, las células se centrifugaron, se lavaron con 2.5 ml de PBS y se resuspendieron en 1.5 ml de PBS. A esta suspensión se le agregó 0.75 ml de una mezcla que contenía 3 % Sarkosyl en 75 mM Tris pH 9.0 - 2 mM EDTA y se dejólisar las células toda la noche a temperatura ambiente. La partición con solventes orgánicos fue realizada como sigue; 0.2 ml del lisado celular, 0.6 ml de cloroformo, 0.3 ml de metanol y 8 μl de Cl_2Mg 0.1 M. Después de mezclar y centrifugar, se separaron, secaron y contaron la fase acuosa, la interfase y la fase orgánica.

b) Efecto del agregado de sacarosa.

En la tabla IV se observa que la sacarosa inhibe la incorporación de (^3H)-dCTP pero estimula la de (^3H)-TTP. Para estudiar el efecto de distintas concentraciones de la misma sobre el sistema de células permeabilizadas se realizó el experimento que se muestra en la Fig. 5. Se puede observar que todas las concentraciones probadas fueron inhibitorias para la incorporación de (^3H)-dCTP, no

así para el (^3H)-TTP donde se observa un efecto estimulador con 50 μM que se mantiene hasta 300 μM .

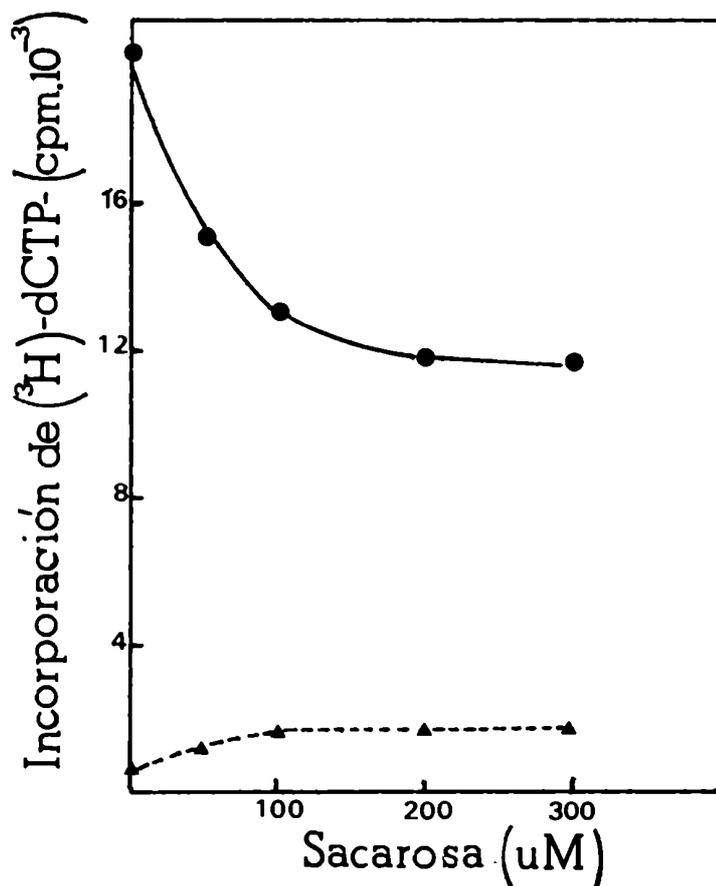


Fig. 5. Efecto del agregado de sacarosa.

Alícuotas de 3 ml de un cultivo de 72 hs. de linfocitos + PHA fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, y resuspendidos en 0.3 ml de medio de permeabilización (descrito en Métodos) conteniendo 1000 pmoles de (^3H)-dCTP (1000 cpm/pmole) ó 1000 pmoles de (^3H)-TTP (1000 cpm/pmole). Las incubaciones se efectuaron a 37° C durante 30 minutos. Se determinó la radioactividad incorporada al precipitado de PCA.

▲ Incorporación de (^3H)-TTP; ● incorporación de (^3H)-dCTP

c) Efecto de la actinomicina D.

El siguiente experimento fue realizado con el objeto de ver si un inhibidor de la síntesis de RNA y DNA como es la actinomicina D es capaz de inhibir la incorporación de (^3H)-TTP y (^3H)-dCTP.

Como puede verse en la tabla VII, la actinomicina inhibe fuertemente la incorporación de (^3H)-TTP, en cambio su efecto es menor sobre la incorporación de (^3H)-dCTP.

Tabla VII: Efecto de la actinomicina D sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{-TTP}$ y $(^3\text{H})\text{-dCTP}$

Agregados	$(^3\text{H})\text{-TTP}$		$(^3\text{H})\text{-dCTP}$	
	cpm	%	cpm	%
Mezcla completa	1.727	100	6.051	100
+ Act-D 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.036	60	5.448	90

La mezcla completa está descrita en Materiales y Métodos, con el agregado que para la incorporación de $(^3\text{H})\text{-TTP}$ se utilizó Sacarosa 0.15 M que como se puede ver en la tabla IV estimula dicha incorporación. Se usó 3×10^6 cél./ensayo, 30 minutos a 37°C . Se determinó la radioactividad incorporada al precipitado de PCA.

Para estudiar a qué nivel actúa la actinomicina se hizo un experimento en condiciones similares, con la diferencia que después de incubar, se efectuó la partición como está descrito en la tabla VI. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VIII, y de ellos se desprende que cuando se usa como precursor $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ la actinomicina afecta solamente la distribución de marca de la interfase; en cambio para el $(^3\text{H})\text{-TTP}$ afecta la interfase y además la fase acuosa.

Tabla VIII: Efecto de la actinomicina D sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{-TTP}$ y $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ en los productos recuperados en las distintas fases.

Precursor	% Incorporación					
	Fase orgánica		Fase acuosa		Interfase	
	- Act D	+ Act D	- Act D	+ Act D	- Act D	+ Act D
Células + PMA + $(^3\text{H})\text{TTP}$	100	105	100	65.14	100	36.37
Células + PMA + $(^3\text{H})\text{-dCTP}$	100	103	100	107.0	100	44.61

Se usaron 3×10^6 células/ensayo. Se incubó 30 minutos a 37°C . La actinomicina D se usó a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La mezcla de incubación está descrita en Métodos. La partición con solventes orgánicos se efectuó como está descrito en la tabla VI.

En el experimento mostrado en la tabla VIII, la actinomicina tuvo un efecto inhibitorio del 50 % sobre la incorporación total para el $(^3\text{H})\text{-TTP}$ y del 20.6 % para el $(^3\text{H})\text{-dCTP}$.

d) Dependencia de la presencia de nucleótidos.

Los resultados de la tabla IX muestran que tanto la incorporación de $(^3\text{H})\text{-TTP}$ como la de $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ no requieren en forma absoluta la presencia de los otros tres dNTPs.

Tabla IX: Efecto de la omisión de nucleótidos sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{-TTP}$ y $(^3\text{H})\text{-dCTP}$

Agregados y omisiones	Incorporación	
	cpm	%
3.3 μM $(^3\text{H})\text{-TTP}$ + 50 μM dNTPs	549	100
Idem - dATP - dGTP - dCTP	506	92.1
3.3 μM $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ + 50 μM dNTPs	14.000	100
Idem - dATP - dTTP - dGTP	10.306	73.6

Para cada ensayo se usaron 3×10^6 linfocitos + PHA como está descrito en Métodos. Se determinaron los cpm en el precipitado de PCA.

e) Dependencia de la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ con el tiempo.

Como se puede ver en la Fig. 6 la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ en la fase orgánica es lineal hasta los 15 minutos y continúa con velocidad decreciente hasta los 60 minutos. La incorporación de $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ al precipitado es lineal hasta los 30 minutos.

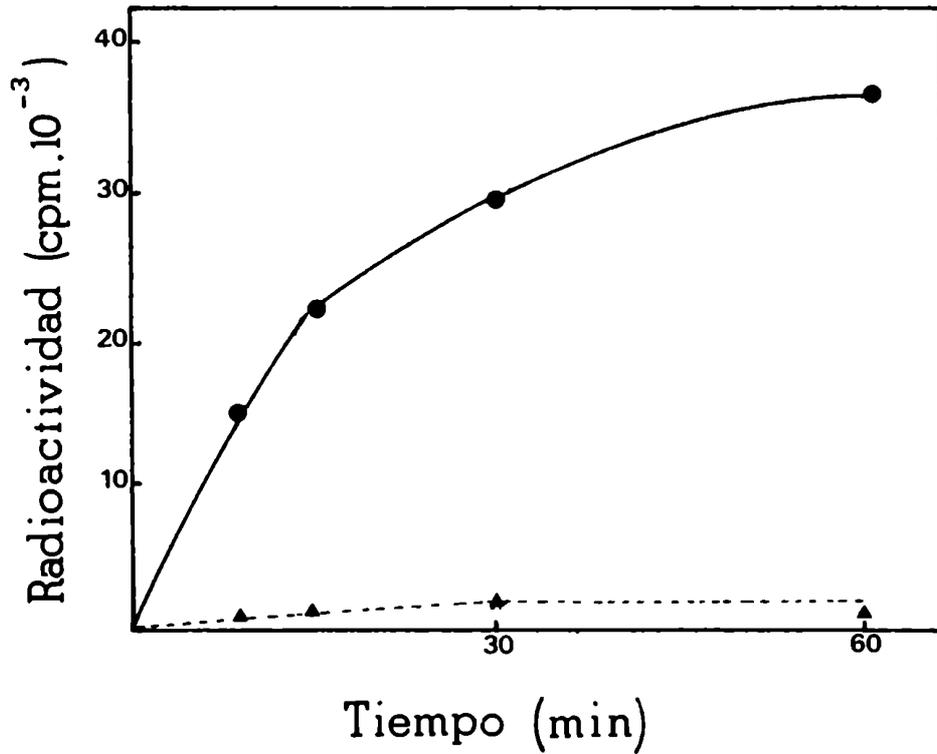


Fig. 0. Curva de tiempo de incorporación de (³H)-dCTP a cloroformo-metanol (2:1) ●, y al precipitado ▲. Se incubaron 5.8×10^5 linfocitos + PHA en las condiciones habituales, Después de incubar, las células se centrifugaron y se lavaron con 2 ml de PBS. Se extrajo con cloroformo-metanol (2:1) y el pellet se disolvió con NCS (cpm incorporadas a DNA).

II. Identificación del material radioactivo obtenido in vitro incubando células permeabilizadas con (^3H) -dCTP

a) Cromatografía del producto en diversos solventes.

Para confirmar la naturaleza lipídica del material presente en la fase orgánica, los extractos clorofórmicos se cromatografiaron en diversos sistemas de solventes.

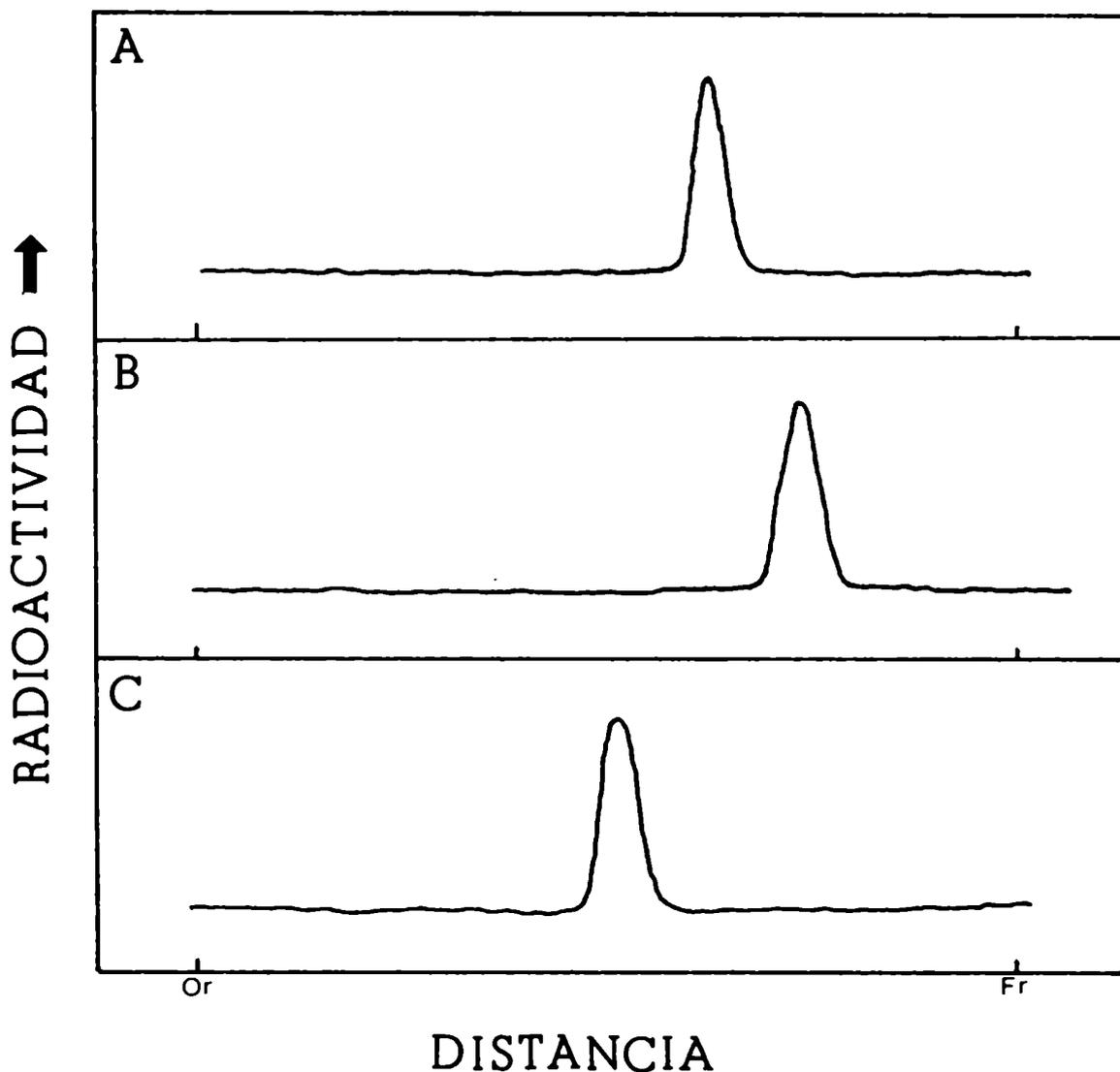


Fig. 7. Radiocromatogramas en Silica Gel G, de extractos clorofórmicos obtenidos luego de la incubación con (^3H) -dCTP.

A) Cloroformo-metanol- H_2O (50:25:7:3); B) Isopropanol-acético- H_2O (27:4:9); C) $\text{Cl}_3\text{CH-MeOH-Hidróxido de NH}_4^+-\text{H}_2\text{O}$ (65:35:3:2)

En la Fig. 7 se observan los resultados obtenidos. En todos los casos la radioactividad migraba en un solo pico.

Con el objeto de identificar este material, se lo sometió a diversos tratamientos: saponificación, tratamiento con fosfolipasas C y D, hidrólisis alcalina y tratamiento con nucleótido-pirofosfatasa.

b) Saponificación.

El extracto obtenido en fase orgánica después de incubar linfocitos en presencia de (³H)-dCTP y efectuar la partición como fue descripta en la tabla VI, se llevó a sequedad con N₂. La saponificación se efectuó en una mezcla de cloroformo-metanol-butanol saturado con agua en presencia de H₂O₂ 0.04 N. Los resultados de la tabla X muestran que la decilación en medio alcalino suave dio como resultado que, aproximadamente, el 92 % de la radioactividad obtenida incubando linfocitos + PHA y - PHA pasara a la fase acuosa.

Tabla X: Efecto del tratamiento con H₂O₂ sobre la solubilidad del material radioactivo

Tratamiento	Radioactividad (cpm)	
	Fase acuosa	Fase clorofórmica
<u>Extracto de células - PHA</u>		
Sin tratamiento	0	5.000
H ₂ O ₂ 30 min. a 30° C	4.590	137
<u>Extracto de células + PHA</u>		
Sin tratamiento	0	8.000
H ₂ O ₂ 30 min. a 30° C	7.420	335

El tratamiento con H₂O₂ se describió en Métodos. Después de incubar, se extrajo con agua. Se contó la radioactividad total que pasó a la fase acuosa y la radioactividad total remanente en la fase orgánica.

En la Fig. 8 se observa el radiocromatograma correspondiente al producto que pa-

só a la fase acuosa después del tratamiento con H₂O₂. Se obtuvo un solo pico de radioactividad que migró por delante del CDP glicerol, CDP y CMP usados como marcadores de referencia.

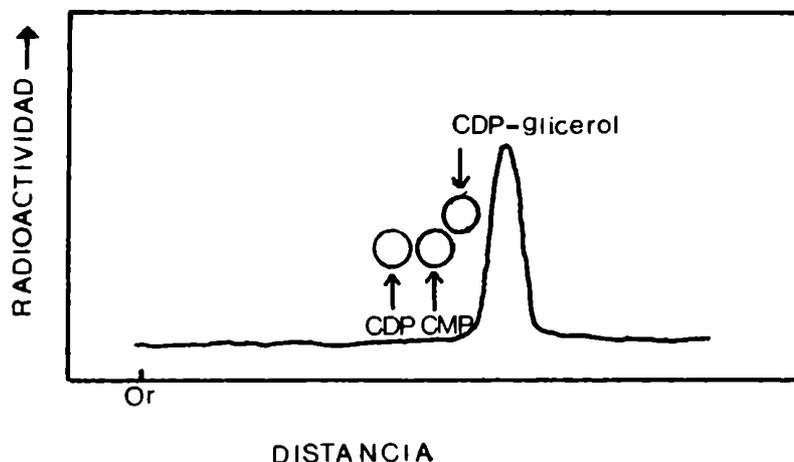


Fig. 8. Radiocromatograma correspondiente a la fase acuosa después del tratamiento con H₂O₂.

El producto que pasó a la fase acuosa, en la tabla IX se cromatografió en papel Whatman 1 con 1 M acetato de amonio;etanol como solvente.

Se usaron los marcadores de referencia, antes mencionados, ya que R. J. Thompson describió en 1975 la incorporación de CTP a núcleos de neuronas aislados, demostrando que dicho nucléotido se incorporaba a una fracción lipídica cuyo análisis demostró que se trataba del liponucleótido CDP-diglicérido. W. Thompson y G. Mc Donald demostraron también en 1975 que por tratamiento alcalino suave, usando 0.002 N NaOH, a partir del CDP diglicérido sintetizado por hígado de vaca se obtenían como productos CMP, CDP glicerol y glicerol fosfato.

En el sistema cromatográfico utilizado, los deoxiribonucleótidos corren ligeramente por delante de los ribonucleótidos, como se puede ver en la Fig. 9, de manera que el pico obtenido en la Fig. 8 es probable que corresponda al dCDP.glicerol.

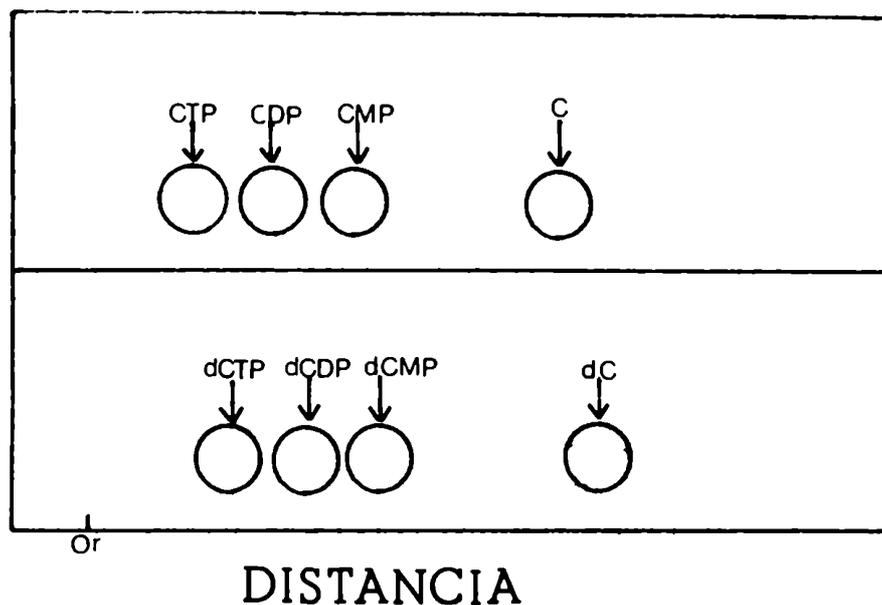


Fig. 9. Cromatografía en papel de Standards de deoxiribonucleótidos; dCTP, dCDP, dCMP y dC y Standards de ribonucleótidos; CTP, CDP, CMP y citidina. Solvente; 1 M acetato de amonio; etanol.

El resultado obtenido en la Fig. 8 es confirmado mediante la hidrólisis alcalina descrita en las próximas páginas.

c) Tratamiento con Fosfolipasas C y D.

Los resultados de la tabla XI demuestran que el compuesto soluble en solventes orgánicos no es degradado por dichas enzimas.

Tabla XI: Tratamiento con Fosfolipasas C y D

Enzima	Radioactividad en fase orgánica (cpm)
a) Tratamiento con Fosfolipasa C	
Compuesto no tratado	5.733
Compuesto tratado con Fosfolipasa C	5.515
b) Tratamiento con Fosfolipasa D	
Compuesto no tratado	9.800
Compuesto tratado con Fosfolipasa D	8.452

Para el ensayo a) se llevaron a sequedad 6000 cpm/tubo del extracto cloroformico. Se agregó luego la mezcla de incubación sin enzima descrita en Materiales y Métodos y se sonicó. Se incubó el tubo que contiene la enzima así como el no tratado durante 30 minutos a 37° C. El ensayo b) fue realizado en condiciones similares con la excepción de que se usaron 10000cpm/tubo del extracto cloroformico.

d) Hidrólisis alcalina.

i) Extracción con cloroformo-metanol del compuesto lipídico, sin partición.

La extracción del material soluble en solventes orgánicos, fue realizada en los experimentos anteriores mediante la partición con cloroformo-metanol-agua. Se realizó el siguiente experimento, con el objeto de ver si por agregado de cloroformo-metanol al precipitado de TCA 10 % obtenido después de centrifugar las células, es posible extraer en forma selectiva el compuesto lipídico formado a partir de (³H)-dCTP pero no el DNA marcado con el mismo precursor.

En la tabla XII se puede ver, que solamente el 0.01 % del DNA marcado in vivo con (³H)-dT es extraído con cloroformo-metanol frente al 75 % del producto extraído en forma similar y que fue marcado in vitro con (³H)-dCTP.

Tabla XII: Extracción con cloroformo-metanol del (³H)-DNA y del producto marcado con (³H)-dCTP

Marcación <u>in vivo</u> con (³ H)-dT	Marcación <u>in vitro</u> con (³ H)-dCTP	Extracción con cloroformo-metanol	
		No extraíble	Extraíble
+		12.066 cpm	119 cpm
	+	603 cpm	1.773 cpm

Se hizo un pulso con 5 µCi de (³H)-dT (act. esp. 40-60 Ci/mmole) a 5 x 10⁶ linfocitos + PHA en medio de cultivo. Después de 60 minutos a 37° C se centrifugaron las células, se lavaron con PBS y se resuspendieron en la mezcla de incubación (ver Métodos) sin (³H)-dCTP. Después de 30 minutos a 37° C se precipitó con PCA y se extrajo con cloroformo-metanol como está descrito en Materiales y Métodos. Se usaron otros 5 x 10⁶ linfocitos + PHA y se marcaron solamente in

vitro con (^3H)-dCTP extrayéndose con cloroformo-metanol como fue descrito arriba. El cloroformo-metanol fue agregado a 10 ml de mezcla de centelleo Bray y se contó en un Packard Tricarb Scintillation Counter. Los precipitados se disolvieron en 0.3 ml de N.C.S. (Amersham), se agregaron a 10 ml de mezcla de Bray y se contaron.

ii) Extracción del producto marcado después de la hidrólisis alcalina.

Al material lipídico marcado con (^3H)-dCTP se le efectuó un tratamiento de hidrólisis alcalina. Como este tratamiento fue efectuado sobre el pellet celular después de marcar con (^3H)-dCTP, fue necesario demostrar que la hidrólisis alcalina sólo liberaba la misma cantidad de radioactividad que era extraíble con cloroformo-metanol. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII; Comparación entre hidrólisis alcalina y extracción con cloroformo-metanol del producto marcado in vitro con (^3H)dCTP

Extracción con cloroformo-metanol	Radioactividad
No extraíble	603 cpm
Extraíble	1.773 cpm
Hidrólisis alcalina	
Precipitado	485 cpm
Sobrenadante	1.710 cpm

10×10^6 linfocitos + PMA se centrifugaron y resuspendieron en la mezcla de incubación conteniendo (^3H)-dCTP. Después de 30 minutos a 37°C la suspensión celular se dividió en dos tubos y se precipitó con 10 % TCA. Los precipitados fueron o bien extraídos con cloroformo-metanol, o bien sometidos a hidrólisis alcalina. Las radioactividades en precipitados y sobrenadantes se determinaron como está descrito en la tabla XII.

De esta tabla se deduce que la radioactividad liberada del pellet por hidrólisis alcalina es la misma que la extraíble por cloroformo-metanol.

iii) Análisis del producto de la hidrólisis alcalina.

La radioactividad liberada por hidrólisis alcalina fue analizada en dos sistemas cromatográficos diferentes (Fig. 10 A y B).

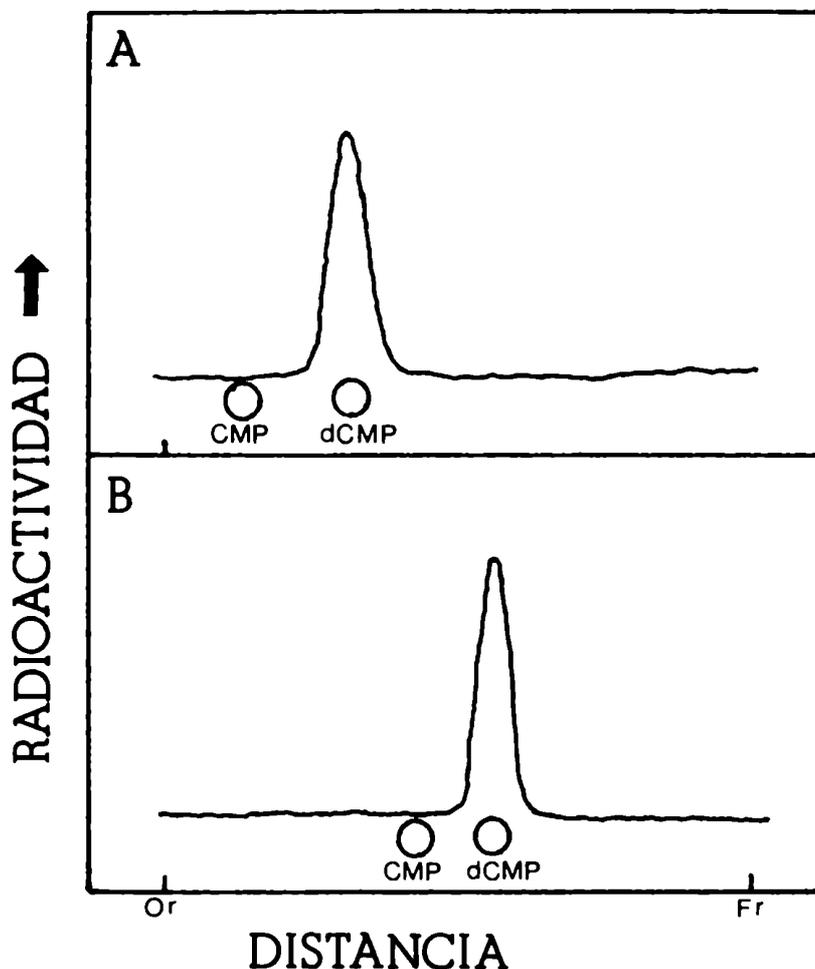


Fig. 10. Radiocromatogramas correspondientes al producto del tratamiento alcalino.

50×10^6 linfocitos + PHA (72 horas) se centrifugaron y resuspendieron en 3 ml de mezcla de incubación. Después de 30 minutos a 37°C las células se centrifugaron, se lavaron con PBS y se precipitaron con 5 % TCA. Se agregaron al precipitado 300 μl de KOH 0.3 N y se incubó a 37°C durante 18 horas. Después de seguir el procedimiento descrito en Métodos, se efectuaron cromatografías con CMP y dCMP como standards internos.

A) Cromatografía en Whatman 1 con etanol-metil-etil-cetona-0.5 M tetraborato de morfolinio (pH 8.6) en 0.01 M EDTA (70:20:30) como solvente de desarrollo. B) Placa de PEI celulosa con 2 % ácido bórico-2 M Cl₂Hi (2:1) como solvente de desarrollo.

En las cromatografías efectuadas se demuestra que se obtiene (^3H)-dCMP, demostrándose así que la porción marcada de la molécula es un derivado de deoxicitidina.

e) Tratamiento con nucleótido pirofosfatasa.

Para estudiar si el dCMP y la parte lipídica de la molécula están unidas a través de una unión pirofosfato, se trató el compuesto marcado con (^3H)-dCTP con la enzima nucleótido pirofosfatasa. Previamente se estudió la actividad de la misma sobre los siguientes sustratos: CDP glicerol y CDP diglicérido ya que en este caso era necesario que la enzima pudiera romper una unión pirofosfato vecina a un resto glicerilo.

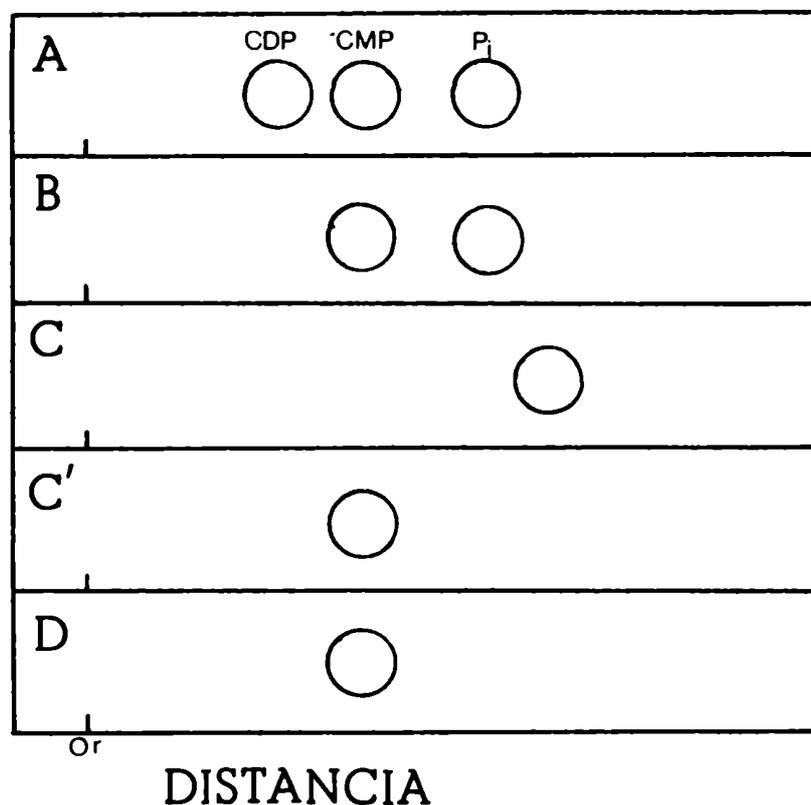


Fig. 11. Cromatografía de standards y productos obtenidos por tratamiento con la enzima nucleótido pirofosfatasa. En todos los casos, las muestras fueron resuspendidas en la si-

guiente mezcla: Hepes 0.1 M, pH 7.4, Cl_2Mg 0.01 M, nucleótido o liponucleótido en concentración 6.6 mM; volumen final 150 μ l. Después de incubar 30 minutos a 37° C, se paró la reacción con igual volumen de etanol.

- A) Standards de CDP, CMP y Pi.
- B) CDP + 15 μ l de enzima.
- C) CDP-glicerol.
- C') CDP-glicerol + 15 μ l de enzima.
- D) CDP-diglicérido + 15 μ l de enzima.

Se cromatografió durante 16 hs. en Whatman 1 con acetato de NH_4 -etanol como solvente.

No se muestra en la figura el CDP-diglicérido sin tratar con la enzima, ya que el mismo corre con el frente del solvente.

Los resultados de la figura 11 demuestran que la enzima es capaz de romper la unión pirofosfato de los compuestos ensayados.

En la Fig. 12 se muestra el resultado del tratamiento de dicha enzima sobre el compuesto lipídico marcado con (3H)-dCTP.

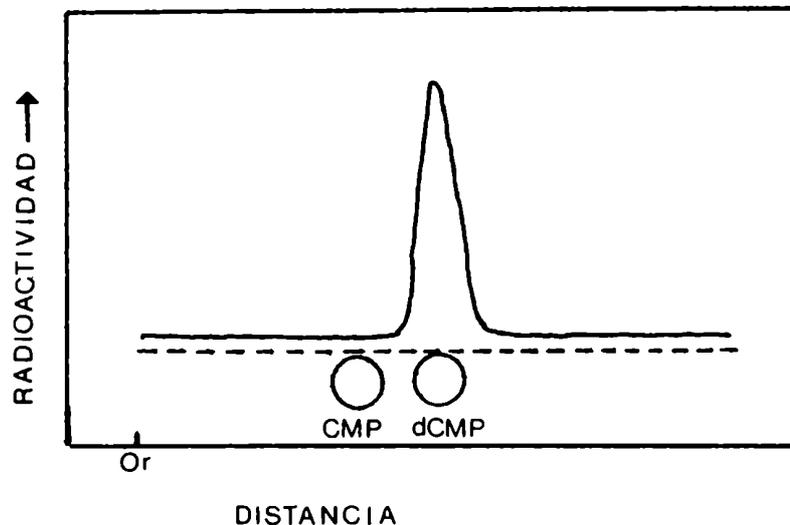


Fig. 12. Efecto de la enzima nucleótido pirofosfatasa sobre el compuesto marcado con (3H)-dCTP.

El tratamiento enzimático se efectuó como está descrito en la fig. anterior. Se cromatografió en Whatman 1 con el solvente I descrito en Materiales y Métodos.

Se usaron CMP y dCMP como standards.

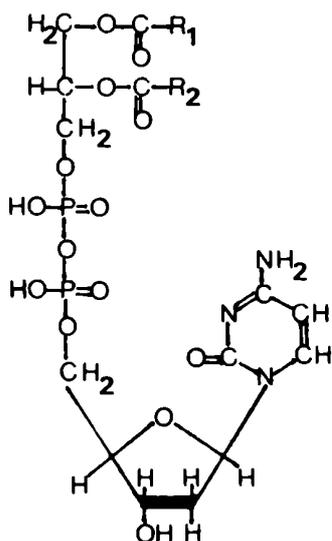
Línea de puntos; cromatografía del producto sin tratamiento enzimático.

Línea llena; producto tratado con la enzima.

Para el desarrollo cromatográfico del producto tratado con la enzima se prefirió usar el solvente I ya que dicho solvente separa muy bien ribonucleótidos de deoxiribonucleótidos. Los resultados observados demuestran que por tratamiento enzimático se rompe el compuesto, dando como uno de sus productos (^3H)-dCMP. Es posible concluir que la parte lipídica de la molécula está unida a la deoxicitidina a través de una unión pirofosfato.

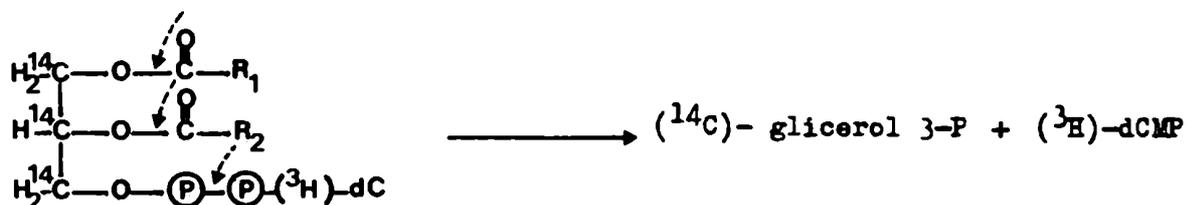
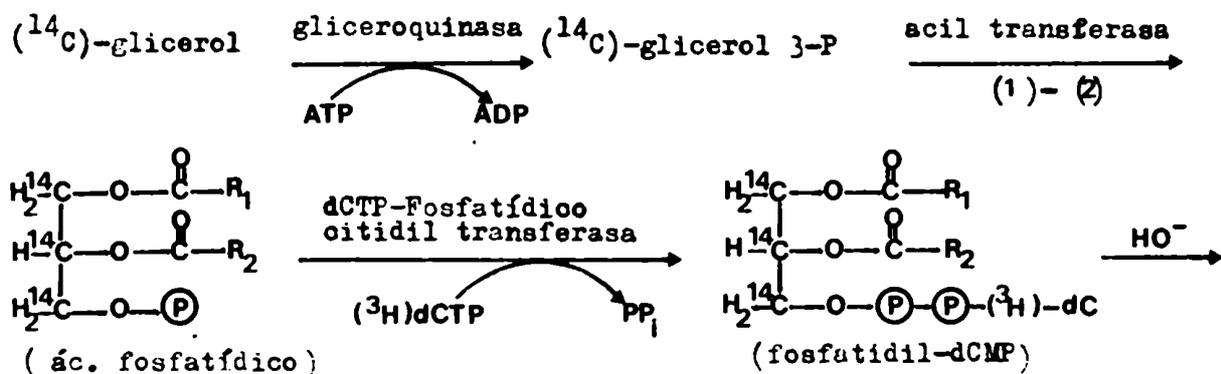
f) Caracterización parcial de la parte lipídica.

La síntesis enzimática del CDP diglicérido descrito en varios sistemas (van den Bosch, 1974) está catalizada por la enzima CTP-fosfatídico-citidil-transferasa, siendo los sustratos de la reacción CTP y ácido fosfatídico (Vorbeck E. L. and Martin A. P., 1970). Sobre la base de los resultados anteriores se pensó que el compuesto hallado podría ser el dCDP diglicérido o Fosfatidil-dCMP según la nomenclatura más moderna propuesta por Hauser y Eichberg (1970), y cuya fórmula se esquematiza a continuación:



Fosfatidil-dCMP

Para identificar parcialmente la parte lipídica de la molécula se efectuó un tratamiento in vivo con (^{14}C)glicerol a linfocitos estimulados, antes de ser permeabilizados y marcados con (^3H)-dCTP. Si el producto formado por las células permeabilizadas es el fosfatidil-dCMP es posible esperar, en las condiciones del experimento, que se forme un compuesto doblemente marcado conteniendo (^{14}C) y (^3H).



(1) camino metabólico del glicerol-fosfato

(2) camino metabólico de la dihidroxiacetona-fosfato

La marcación de los linfocitos estimulados con (^{14}C)glicerol y (^3H)-dCTP está descrita en Materiales y Métodos. Los productos de la reacción se extrajeron con cloroformo-metanol (1:1) en 0.01 N HCl y se cromatografió en placas de Sílica Gel G (Fig. 13).

En la Fig. 13 se observa que cuando se marca con (^{14}C)glicerol y (^3H)-dCTP se obtienen dos picos, uno de los cuales (pico I) corre en la misma posición que el producto obtenido después de marcar las células sólo con (^3H)-dCTP, sin previo tratamiento con (^{14}C)glicerol.

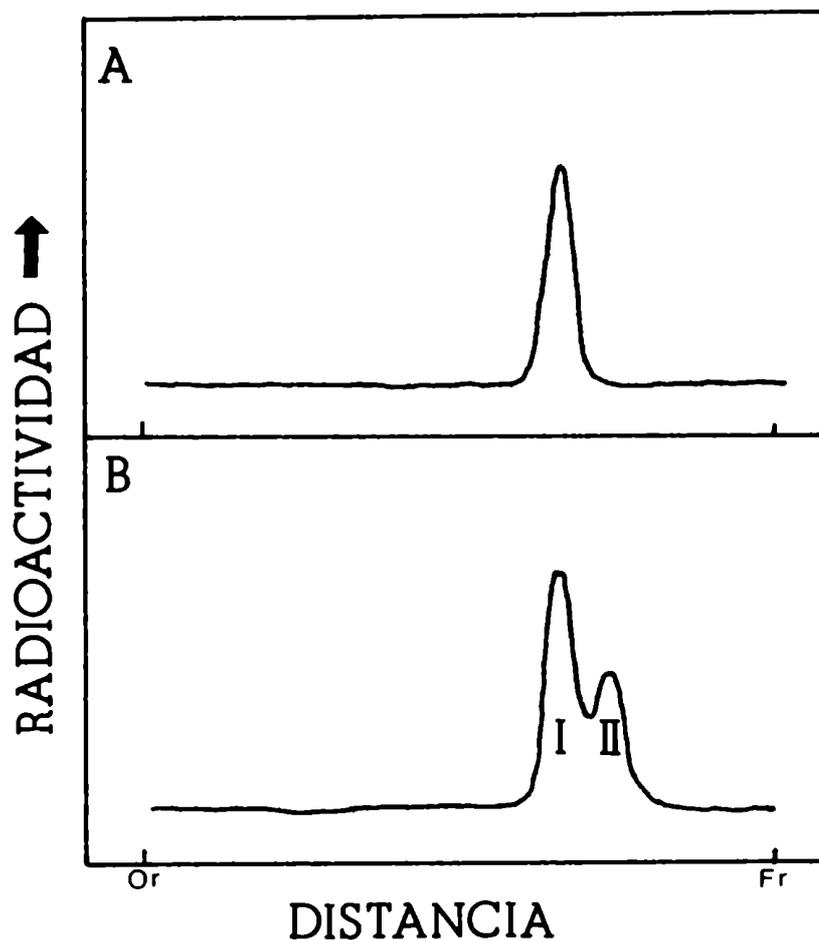


Fig. 13. Radiocromatograma de los compuestos marcados in vivo con (^{14}C) gliceroI e in vitro con (^3H) -dCTP.

A) Cromatografía del compuesto tritiado obtenido in vitro.

B) Cromatografía del compuesto doblemente marcado.

Solvente: cloroformo-metanol-acético- H_2O (50:25:7:3)

En esta radiocromatografía no se discrimina (^3H) de (^{14}C) .

Los dos picos descriptos en la Fig. 13 B fueron raspados y eluidos de la sílica con $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0.3) y contados en el Packard usando settings diferenciales para (^{14}C) y (^3H) . Sólo el pico I contenía ambos isótopos, mientras que el pico II contenía únicamente (^{14}C) .

Con el objeto de verificar si las marcas de (^3H) y (^{14}C) detectadas en el pico I

(Fig. 13) estaban contenidas en un sólo compuesto, se corrió la muestra en otros solventes, para ver si la relación $(^{14}\text{C})/(^3\text{H})$ se mantenía constante. El resultado se muestra en la tabla XIV.

Tabla XIV: Relación $(^{14}\text{C})/(^3\text{H})$ para el compuesto marcado con (^{14}C) glicero-
rol (in vivo) y (^3H) -dCTP (in vitro) en distintos solventes.

Solventes	Relación $(^{14}\text{C})/(^3\text{H})$
A) Cloroformo-metanol-acético- H_2O (50:25:7:3)	3.57
B) Cloroformo-metanol-acético- H_2O (15:2:9:1)	3.78
C) Cloroformo-metanol-amoníaco- H_2O (65:35:3:2)	3.73

Dado que dicha relación se mantiene constante en los distintos solventes analizados, se efectuó la hidrólisis alcalina al eluido del pico I mencionado más arriba.

Los resultados de la Fig. 14 demuestran la formación de (^3H) -dCMP y (^{14}C) -glicero-fosfato. La presencia de un pequeño hombro en la vecindad del α -glicero-fosfato corresponde probablemente al dCDP glicerol remanente. Esto se demuestra en la Fig. 15.

Se concluye por los resultados anteriores que el compuesto lipídico extraído por solventes orgánicos es el dCDP-diglicérido o Fosfatidil-dCMP.

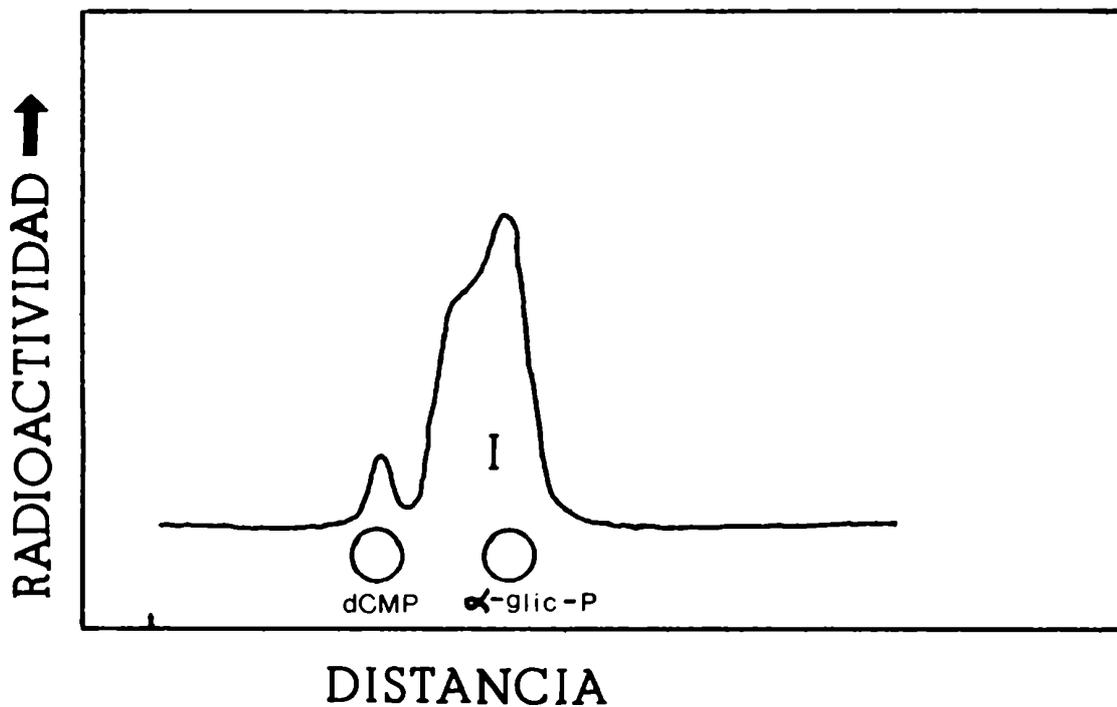


Fig. 1/. Efecto de la hidrólisis alcalina sobre el compuesto doblemente marcado.

El procedimiento está descrito en Materiales y Métodos. Cromatografía realizada en Whatman I, con acetato de NH_4 -etanol (600+1500) como solvente. Se usaron dCMP y α -glic-P como standards. Este último se reveló con el reactivo de Burrows.

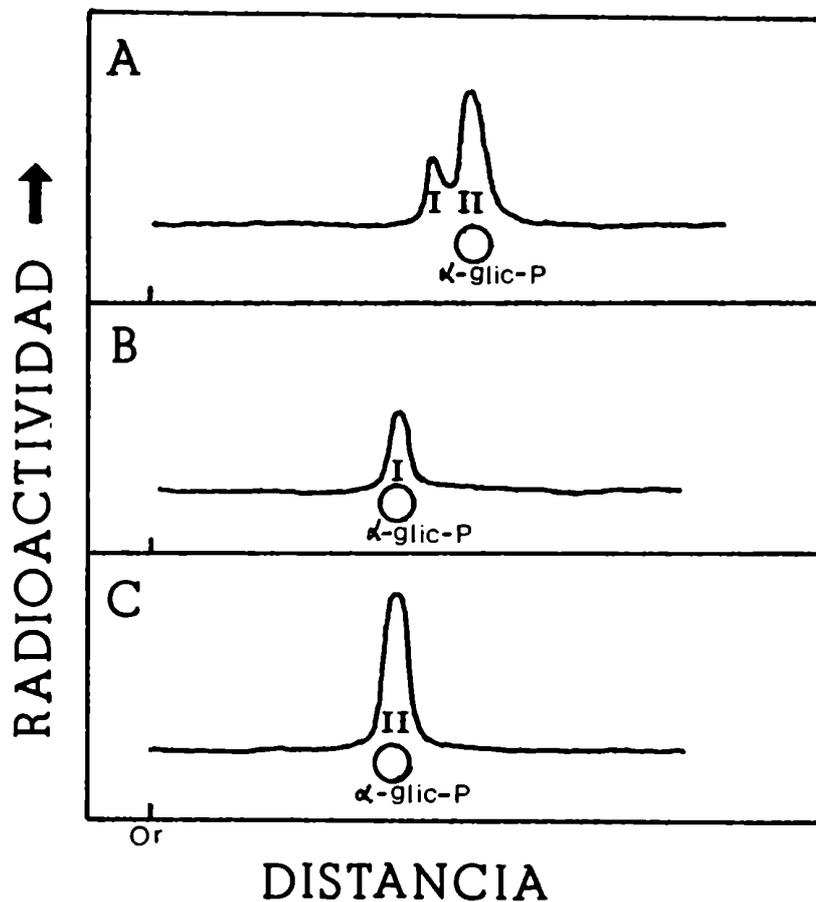


Fig. 15. Formación del dCIP glicerol como producto intermediario de la hidrólisis alcalina del compuesto marcado con (^{14}C) -glicerol y (^3H) -dCTP. El pico I de la fig. 14 se eluyó y corrió en Whatman I con isopropanol-acético- H_2O (27:4:9) como solvente, resolviéndose en dos picos diferentes.

(B) El pico I (A) se eluyó y se sometió a la acción de la enzima nucleótido pirofosfatasa como fue descrito anteriormente. El producto de la reacción se corrió en Whatman I con 1 M de acetato de amonio-etanol (500:1500) usando α -glicerofosfato como standard interno.

(C) El mismo tratamiento se le hizo al pico II (A).

III. Naturaleza particulada de la síntesis del compuesto soluble en solventes orgánicos

Es interesante notar que en la Tabla II de la Introducción se observa que cuando se incuban células enteras permeabilizadas en presencia de (^3H)-dCTP dicha incorporación es casi siete veces mayor que cuando se la estudia en el sistema de núcleos aislados. En cambio, para los otros tres dNTPs tanto en célula entera como en núcleo aislado es aproximadamente del mismo orden. Es posible que la incorporación de (^3H)-dCTP en núcleos aislados esté francamente disminuída por el sistema de preparación de los mismos ya que en uno de los pasos de su obtención se resuspende el pellet nuclear en un buffer que además de contener sacarosa 0.32 M (que como se demostró inhibe la incorporación de (^3H)-dCTP en célula permeabilizada), contiene 0.3 % de Tritón N 101. El Tritón X-100 a esa concentración inhibe la síntesis del compuesto soluble en solventes orgánicos como puede verse más adelante. Por lo tanto se decidió profundizar el estudio de la incorporación de (^3H)-dCTP haciendo un fraccionamiento subcelular que no implique el uso de detergentes.

a) Distribución subcelular de la marca de (^3H)-dCTP.

Luego de incubar linfocitos + PHA permeabilizados con (^3H)-dCTP se realizó un fraccionamiento subcelular como se indica en métodos. Los resultados están expuestos en la Tabla XV.

Los resultados obtenidos indican que se obtiene la mayor incorporación en la fracción más pesada (100 g.). En la literatura existen enormes discrepancias respecto de la distribución subcelular de la enzima responsable de la síntesis del CEP-diglicérido. Debido al sistema de permeabilización que implica el uso de un medio hipotónico, las células aumentan su tamaño en forma notable como puede verse en las fotografías que se muestran en la página siguiente. Es po-

Tabla XV: Distribución subcelular de la radioactividad de (^3H)-dCTP incorporada en el sistema de células permeabilizadas

Distribución	Radioactividad incorporada			
	Fase orgánica		Precipitado soluble en NCS	
	cpm	%	cpm	%
Fracción 600 g	87.458	73.5	35.548	67.6
Fracción 3.000 g	13.103	11.0	5.360	10.2
Fracción 25.000 g	7.269	6.1	2.866	5.5
Precipitado 100.000 g	2.508	2.1	1.068	2.0
Sobrenadante 100.000 g	8.711	7.3	7.720	14.7

Se partió de 70×10^6 linfocitos + PHA. Se incubó con la mezcla de permeabilización 30 minutos a 37°C . Después de incubarse, se lleva a una concentración de sacarosa 0.25 M, se rompe con 40 golpes de Dounce y se procede a la centrifugación diferencial como se describe en Métodos. Luego de este procedimiento, se extrajeron las cpm solubles en $\text{Cl}_3\text{-CH-metanol}$ (1:1) en 0.01 NClH. Las cpm del precipitado se solubilizaron en NCS y se contaron.

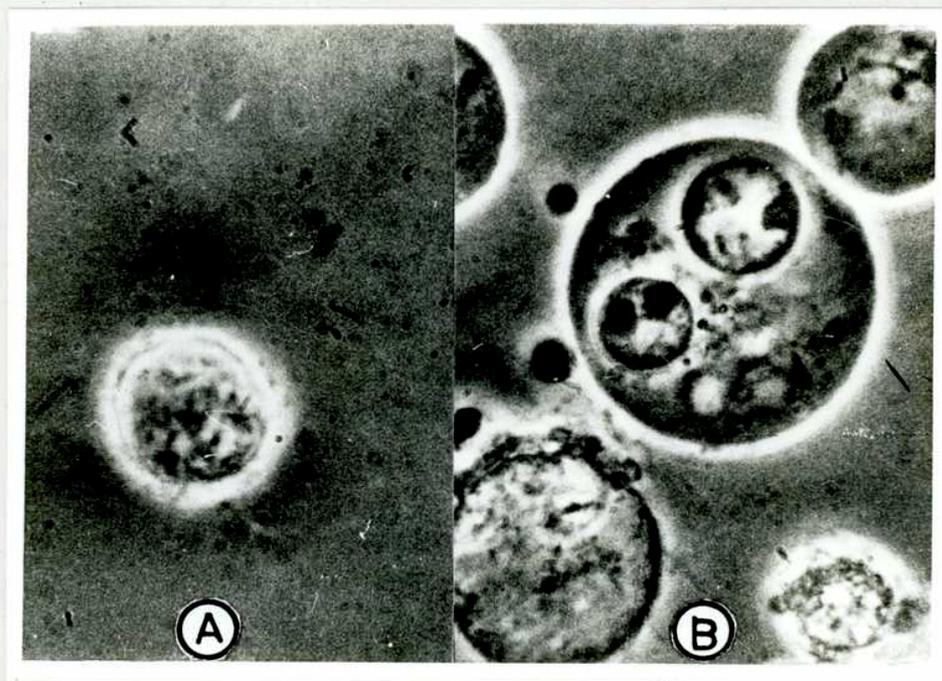


Foto A: Fotografía de un linfocito que se encuentra en medio de cultivo MEM.
Foto B: Fotografía de un linfocito que se encuentra resuspendido en el medio de permeabilización. (Descripción en Métodos).

sible que debido a este tratamiento, al romper las células, junto con la fracción nuclear se obtengan grandes trozos de membrana plasmática que no se obtienen cuando se preparan membranas de linfocitos en forma habitual (W. H. Evam, 1977). Se decidió por lo tanto proseguir el estudio con la fracción más pesada, probando el efecto del detergente Tritón X-100 y del agregado de lípidos exógenos sobre la incorporación de (^3H)-dCTP a la misma.

b) Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad enzimática.

Fue descrito por Mc Caman y Finnerty (1968) que la presencia de detergentes no iónicos estimulaba en ciertos casos la actividad de la enzima CTP-fosfatídico-citidiltransferasa; de manera que se estudió el efecto del Tritón X-100 sobre la incorporación de (^3H)-dCTP a la fracción de 600 g. Los resultados están expuestos en la Fig. 16, observándose que en la fracción estudiada el detergente ejerce un fuerte efecto inhibitorio.

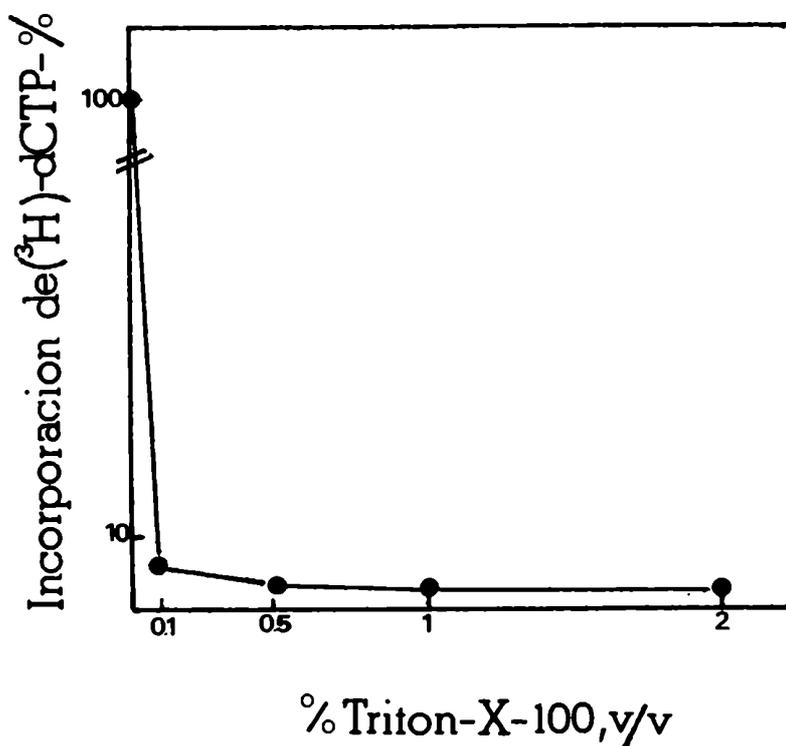


Fig. 16. Efecto del Tritón X-100 sobre la incorporación de (^3H)-dCTP por

la fracción 600 x g.

Se centrifugaron 50×10^5 linfocitos + PHA, obteniéndose la fracción 600 x g como se indica en la Tabla XV. (1) Después de incubar se precipitó con PCA 12 % y se extrajo con cloroformo-metanol-ClH como ya fue descrito.

(1) y figura 17.

c) Efecto del agregado de lípidos exógenos sobre la fracción 600 x g de células + PHA.

Se estudió el efecto del agregado de ácido fosfatídico exógeno con el objeto de ver si este precursor de la biosíntesis del CDP-diglicérido (van den Bosch, 1974) era capaz de estimular la incorporación de (^3H)-dCTP.

Los resultados de la Fig. 17 muestran que se obtiene un efecto altamente estimulador para concentraciones entre 60 - 100 μM de ácido fosfatídico. Con concentraciones más altas, se anula este efecto, probablemente porque con el Mg^{++} presente en la mezcla de incubación se forma un compuesto insoluble, según fue descrito por Thompson R. J. (1975).

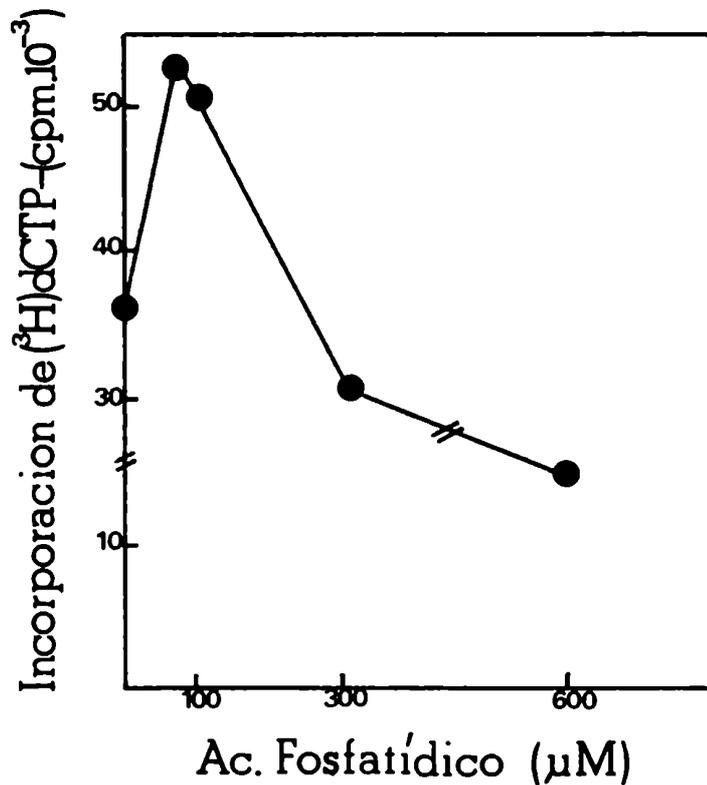


Fig. 17. Efecto del agregado de ácido fosfatídico sobre la incorporación de (^3H)-dCTP.

Se centrifugaron 100×10^6 células, y se resuspendieron en 1.2 ml de buffer hipotónico como se describió en la Tabla XV. Después de dejar 20 minutos en frío se homogeneizó con 40 golpes de Dounce. Se usaron 100 μ l de este homogenato para cada ensayo que fue efectuado por duplicado. Se centrifugó a $600 \times g$ durante 10 minutos y el precipitado fue resuspendido en la mezcla de incubación durante 30 minutos. Se determinaron las cuentas precipitadas por PCA 12 %. El ácido fosfatídico fue preparado a una concentración de 6 μ M por sonicación con un Sonifier Cell Disruptor, modelo W 140 Ultrasonic, Inc. U. S. A.

d) Purificación de la fracción $600 \times g$ en gradiente de sacarosa.

Con el objeto de estudiar la incorporación de (3H)-dCTP a la fracción arriba mencionada, se hizo una purificación en gradiente de sacarosa, para tratar de obtener una fracción nuclear purificada y otra fracción de naturaleza "membrana" y ver si en esas condiciones se obtenía marca de tritio que fuera soluble en solventes orgánicos. La observación al microscopio de contraste de fases permitió observar después de centrifugar el gradiente a $3.000 \times g$ como se menciona en Métodos, un pellet que consistía en núcleos intactos, sin partículas, y una interfase que carecía de núcleos pero presentaba un aspecto particulado. El resultado del aislamiento del extracto lipídico de cada fracción se muestra en la Fig. 10; donde se observa que el compuesto extraído de núcleos aislados así como de la fracción particulada cromatografían en el sistema usado con el compuesto obtenido de linfocitos permeabilizados, lo que en primera aproximación permite suponer que se trata del mismo compuesto.

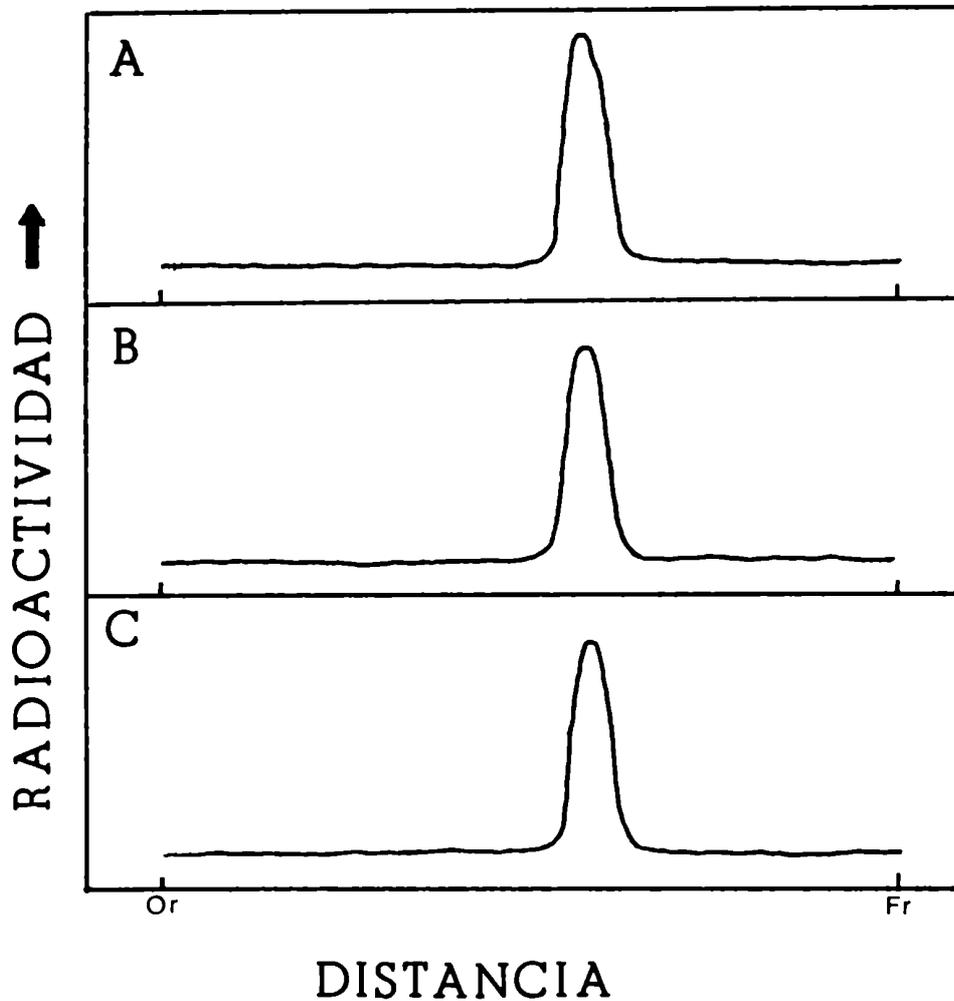


Fig. 13. Radiochromatograma de las fracciones lipídicas extraídas de "membranas" y núcleos.

La obtención de estas fracciones, así como la incubación están descritos en Métodos. En ambos casos, después de incubación se extrajo con $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{MeOH}-0.1 \text{ N ClH}$ y se cromatografió en Sílica Gel G usando $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{MeOH}-\text{acético}-\text{H}_2\text{O}$ (50:25:7:3) como solvente.

- A) Compuesto obtenido con $(^3\text{H})-\text{dCTP}$ en células permeabilizadas y usado como referencia.
- B) Compuesto obtenido de membranas.
- C) Compuesto obtenido de núcleos.

e) Comparación entre la incorporación de (³H)-CTP y (³H)-dCTP a "membranas" y núcleos de linfocitos + PHA y - PHA.

Diversos trabajos de distintos autores (Brindley et al (1977), Sundler et al (1977), Thompson et al (1976), Freinkel et al (1975), Bazán et al (1977), etc. postulan que el Fosfatidil-CMP (CDP-diglicérido) es el intermediario dador de fosfátidico en distintos sistemas de células de mamíferos. Mitchel (1975) postula también que dicho compuesto se obtiene en linfocitos de nódulos linfáticos de cerdo. Los siguientes experimentos se realizaron con el objeto de ver si en el sistema de linfocitos humanos permeabilizados, también el CTP se incorpora a una fracción liposoluble y si existe incorporación diferencial respecto al dCTP en la fracción "núcleos y membranas" en linfocitos estimulados o en reposo.

Tabla XVI: Incorporación de (¹⁴C)-CTP a linfocitos permeabilizados

linfocitos	Fase orgánica		Interfase		Fase acuosa		Total
	cpm	%	cpm		cpm	%	
- PHA	852	56.2	444	29.3	220	14.5	1.516
+ PHA (3 hs.)	576	48.9	236	20.0	366	31.1	1.208
+ PHA (56 hs.)	921	39.0	483	20.4	954	40.4	2.358

Se centrifugan para cada ensayo 10×10^6 células que se resuspendieron en 0.6 ml de medio de permeabilización conteniendo 2000 picomoles de (¹⁴C)-CTP (550 cpm/pmol). Después de incubar se procesó como descrito en la Tabla V.

Loeb (1974) en su review sobre transformación blástica postula que la incorporación de precursores al RNA es un suceso temprano (se observa ya a las dos

horas de la estimulación por mitógenos). De manera que los resultados obtenidos en fase acuosa donde se recuperaría la mayor parte del RNA sintetizado concuerdan con el hecho anteriormente mencionado. En cambio llama la atención que en fase orgánica, no se observe incremento de la incorporación por efecto de la transformación mitogénica; ya que este "suceso" implica síntesis de nuevos constituyentes celulares, incluyendo a las membranas celulares (Resch, 1976). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos en la Tabla XVII, se observa que para la fracción "membranas y núcleos", la incorporación de $(^3\text{H})\text{-CTP}$ a fase orgánica de linfocitos + PHA es aproximadamente el doble que para linfocitos - PHA. Este resultado podría indicar que la enzima tiene más accesibilidad por su (sus) sustrato(s) que cuando se usan células permeabilizadas. También puede ser que en este último caso haya que tener en cuenta la compartimentalización de los distintos "pools" de nucleótidos como postulan Prem Veer Reedy et al (1977) para *E. coli*. Es interesante hacer notar además que si bien la incorporación total de $(^3\text{H})\text{-CTP}$ a la fracción total ("membranas + núcleos") se incrementa al doble en linfocitos + PHA, (respecto a los - PHA), para el $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ el incremento es de cuatro veces. Esto podría indicar que si el compuesto se sintetiza en fase orgánica a partir del $(^3\text{H})\text{-CTP}$ es el fosfatidil-CMP, la afinidad de la enzima por el deoxiderivado, aumenta por efecto de la estimulación por PHA.

Tabla XVII: Incorporación de $(^3\text{H})\text{-CTP}$ y $(^3\text{H})\text{-dCTP}$ a "membranas y núcleos" de linfocitos - PHA y + PHA

Fracción	cpm en fase orgánica	
	(³ H)-CTP	(³ H)-dCTP
<u>Linfocitos - PHA</u>		
"Membranas"	16.784	5.976
Núcleos	16.016	5.424
Total	32.800	11.400
<u>Linfocitos + PHA</u>		
"Membranas"	32.616	26.000
Núcleos	29.832	15.912
Total	62.448	41.912

Se centrifugaron 100×10^6 linfocitos - PHA y 100×10^6 linfocitos + PHA y se resuspenden en cada caso en 1 ml de Buffer fosfato. Se obtienen las fracciones purificadas por gradiente de sacarosa como ya fue descrito. Cada fracción se resuspende en 1.4 ml de mezcla de incubación (ver Métodos), con 3.3 μ M (³H)-CTP (1000 cpm/pmol) para la incubación con el riboderivado y 3.3 μ M (³H)-dCTP (1000 cpm/pmol) para el deoxiderivado. Después de incubar 30 minutos a 37° C, se para la reacción con PCA, se extrae con cloroformo-metanol como ya fue descrito y se cuenta.

f) Competencia del CTP sobre la incorporación de (³H)-dCTP en la fracción lipídica

Los resultados de la Tabla XVIII demuestran que tanto en "núcleos" como en "membranas" el agregado de concentraciones crecientes de CTP inhiben la incorporación de (³H)-dCTP a fase orgánica.

En la fracción nuclear el CTP compite igual que el dCTP. En membranas, dicha competencia es menor. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la enzima que sintetiza el ribo así como el deoxiliponucleótido sea la misma, si bien

en la fracción denominada "membranas" dicha enzima tendría mayor afinidad por el dCTP, ya que el hecho de poseer una deoxirribosa hace que dicha molécula tenga características más lipofílicas que el ribonucleótido homónimo.

Tabla XVIII: Efecto del agregado de CTP sobre la incorporación de (³H)-dCTP

a) Efecto sobre núcleos:

Agregados	Radioactividad en fase orgánica	
	cpm	%
Nada	2.883	100.0
dCTP 0.03 umoles	268	9.9
dCTP 0.3 umoles	115	4.0
CTP 0.03 umoles	369	12.7
CTP 0.3 umoles	130	4.5

b) Efecto sobre membranas:

Agregados	Radioactividad en fase orgánica	
	cpm	%
Nada	3.568	100.0
dCTP 0.03 umoles	487	13.5
dCTP 0.3 umoles	170	4.7
CTP 0.03 umoles	825	22.9
CTP 0.3 umoles	357	9.9

Se partió de 200×10^5 células + PHA. Se centrifugaron y resuspendieron en 2 ml

de buffer hipotónico. Después de 20 minutos a 0° C se centrifugó a 600 x g, se resuspendió en 2 ml de buffer hipotónico, se rompieron las células con 40 golpes de Dounce. Se sembró sobre 4 ml de sacarosa 60 %, y se centrifugó como se describe en métodos. Las fracciones así purificadas se resuspendieron en 2.7 ml de mezcla de incubación conteniendo 1000 pmoles de (³H)-dCTP (1000 cpm/pmole), y se usaron 270 ul/ensayo, con los agregados arriba mencionados. Se incubó 30 minutos a 37° C, se precipitó con PCA y se extrajo como ya fue descrito.

IV. Síntesis in vivo de Fosfatidil-dCMP

Los resultados obtenidos hasta aquí demuestran la síntesis in vitro de fosfatidil-dCMP. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que la síntesis de dicho compuesto se deba a una alteración in vitro de la enzima responsable de la síntesis del riboliponucleótido, era necesario también demostrar la síntesis in vivo del deoxiliponucleótido.

a) Incorporación de (³H)-dC a linfocitos obtenidos a distintos tiempos de su estimulación con PHA.

El experimento que se muestra en la Fig. 19 se realizó con el objeto de estudiar si la deoxicitidina (³H) (nucleósido precursor del deoxirribonucleósido trifosfato) se incorporaba in vivo a una fracción extraíble por solventes orgánicos, y si dicha incorporación era modificada por el tiempo de estimulación por PHA. Los resultados obtenidos demuestran incorporación en fase orgánica, pero no se observan variaciones en la incorporación por efecto del mitógeno. Esto último, si bien parece contradecir los resultados obtenidos in vitro (Mordoh y Fridlender, 1977), podría deberse a que in vivo el liponucleótido tenga un altísimo turnover, como ya fue descrito por Raetz y Kennedy (1973) para los liponucleótidos de citosina.

b) Cromatografía en placa delgada del compuesto obtenido in vivo en fase orgánica incubando con (³H)-dC.

En la Fig. 20 se muestra que el radiocromatograma del compuesto obtenido in vivo e in vitro (usado como referencia), presentan en ambos casos un sólo pico que tienen la misma movilidad cromatográfica. Esto permite suponer "a priori" que se trata del mismo compuesto.

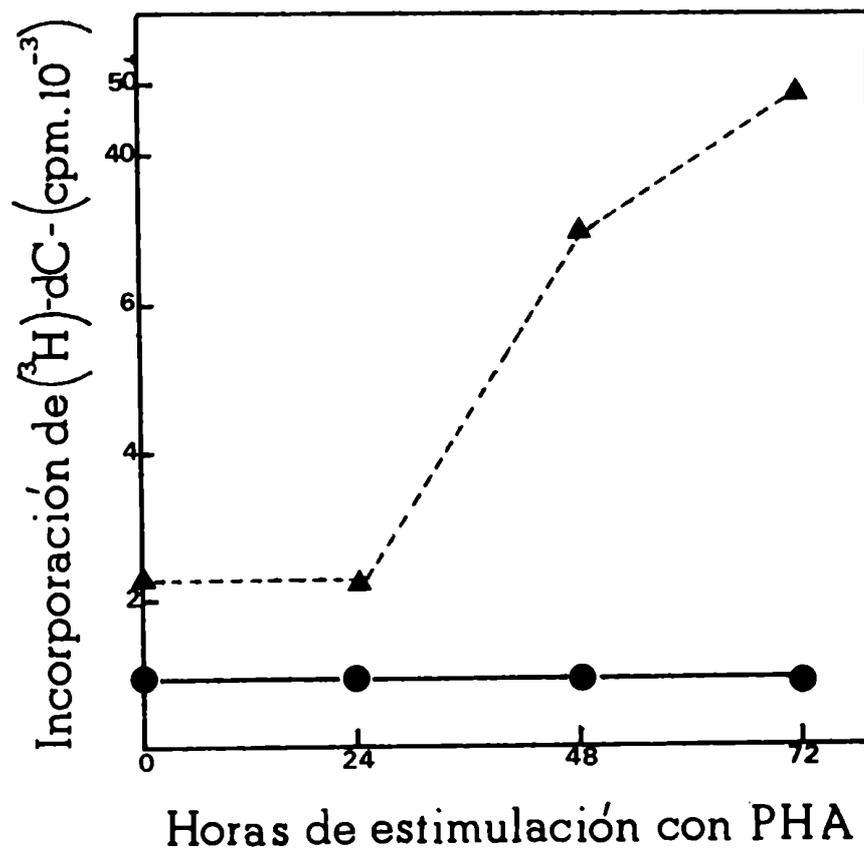


Fig. 19. Incorporación de (3H)-dC a linfocitos.

Se centrifugan en cada caso 2.5×10^7 células y se resuspenden en 0.5 ml. de MEM. que contiene 10 % de suero fetal. Se incuban con 2 uCi de (3H)-dC durante 30 minutos a 37° C. Después de incubar se precipita con TCA 10 % y se extraen la radioactividad incorporada a la fracción lipídica o al precipitado como ya fue descrito. (●) cpm incorporados en la fracción lipídica; (▲) cpm incorporadas en el precipitado.

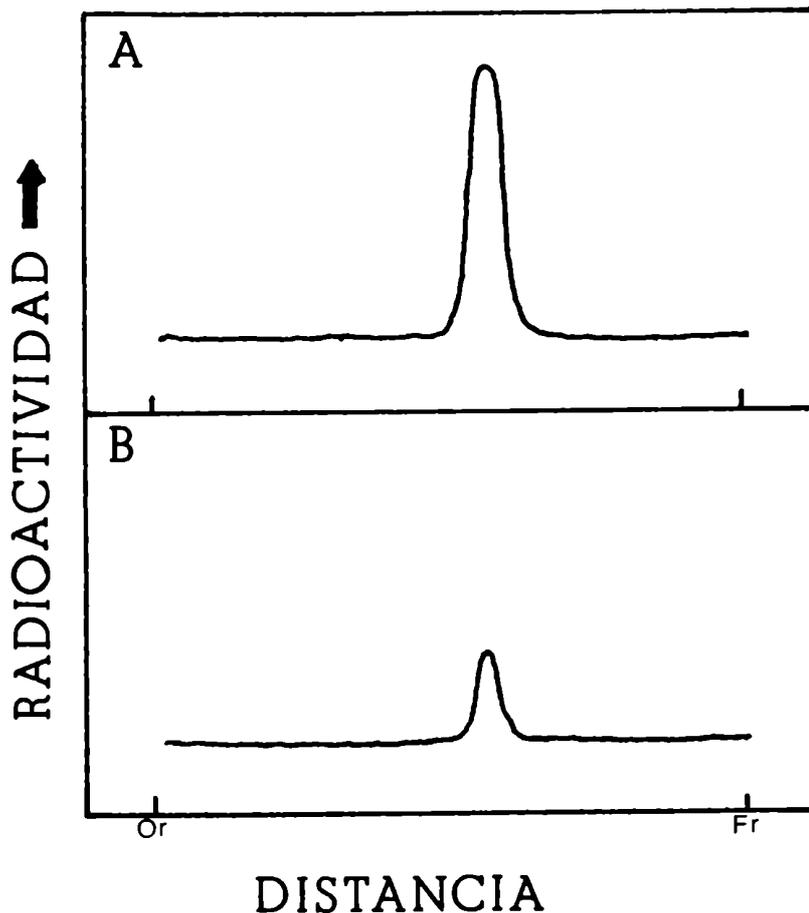


Fig. 20. Cromatografía en placa delgada (Sílica G) del compuesto obtenido in vitro (A) y del compuesto obtenido in vivo (B). Solvente: Cl_3CH -metanol-acético- H_2O (50:25:7:3).

c) Efecto de la clorpromazina sobre la incorporación de (^3H) -dC.

Como la incorporación de (^3H) -dC en la fase orgánica era muy pequeña para poder caracterizar el compuesto sintetizado in vivo, se intentó utilizar compuestos que modificaran el metabolismo de los glicerolípidos en diferentes tejidos. Como ya fue mencionado en la Introducción, Michell et al (1976) encontraron que, entre otras drogas de características anifílicas, la clorpromazina estimula la síntesis de fosfolípidos de tipo ácido, probablemente inhibiendo la enzima fosfatídico-fosfolidrolasa.

En la Fig. 21 se puede ver el efecto de dicha droga sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ in vivo en linfocitos estimulados por PHA. Se representa allí un experimento tipo seleccionado entre varios realizados en condiciones semejantes, y para los cuales siempre se obtuvo un efecto máximo sobre la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ para una concentración de aproximadamente 60 μM clorpromazina. Los resultados obtenidos con esta droga son sumamente interesantes, ya que no sólo se modifica la biosíntesis de glicero lípidos, sino que también la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ al DNA. Krishnaray y Taluar (1973) describieron que la clorpromazina inhibe la transformación blástica de los linfocitos estimulados por PHA, a través de un mecanismo por el cual se modifican los niveles intracelulares de AMP cíclico.

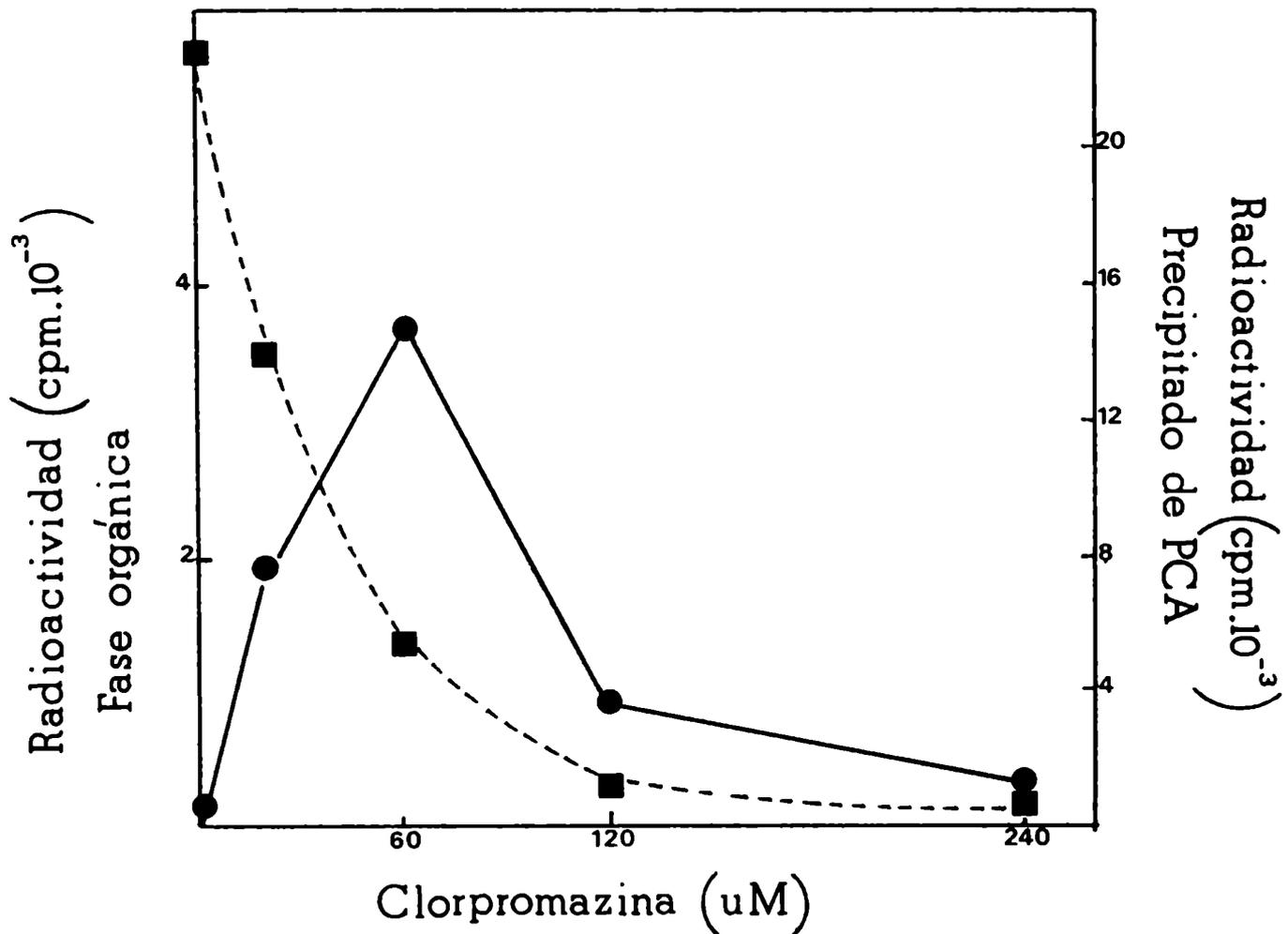


Fig. 21. Curva dosis-respuesta de la clorpromazina sobre la incorporación

de $(^3\text{H})\text{-dC}$.

■-■ Incorporación al precipitado de PCA (DNA)

●-● Incorporación en fase orgánica.

Para cada concentración de droga ensayada, se centrifugaron 5×10^6 células y se resuspendieron en 0.5 ml de MEM conteniendo 10 % de suero fetal. Se incubó con 2 μCi de $(^3\text{H})\text{-dC}$ 30 minutos a 37°C . Se extrajo y se contó como ya fue descrito.

d) Curva de tiempo para la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ en presencia de clorpromazina.

En la Fig. 22 se observa que la incorporación en fase orgánica, así como en el precipitado, ocurren con velocidad lineal hasta los 60 minutos, continuando con velocidad decreciente hasta los 120 minutos. En ausencia de clorpromazina el aumento de incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ en fase orgánica ocurre a muy baja velocidad, probablemente debido a su altísimo turnover, como ya fue comentado.

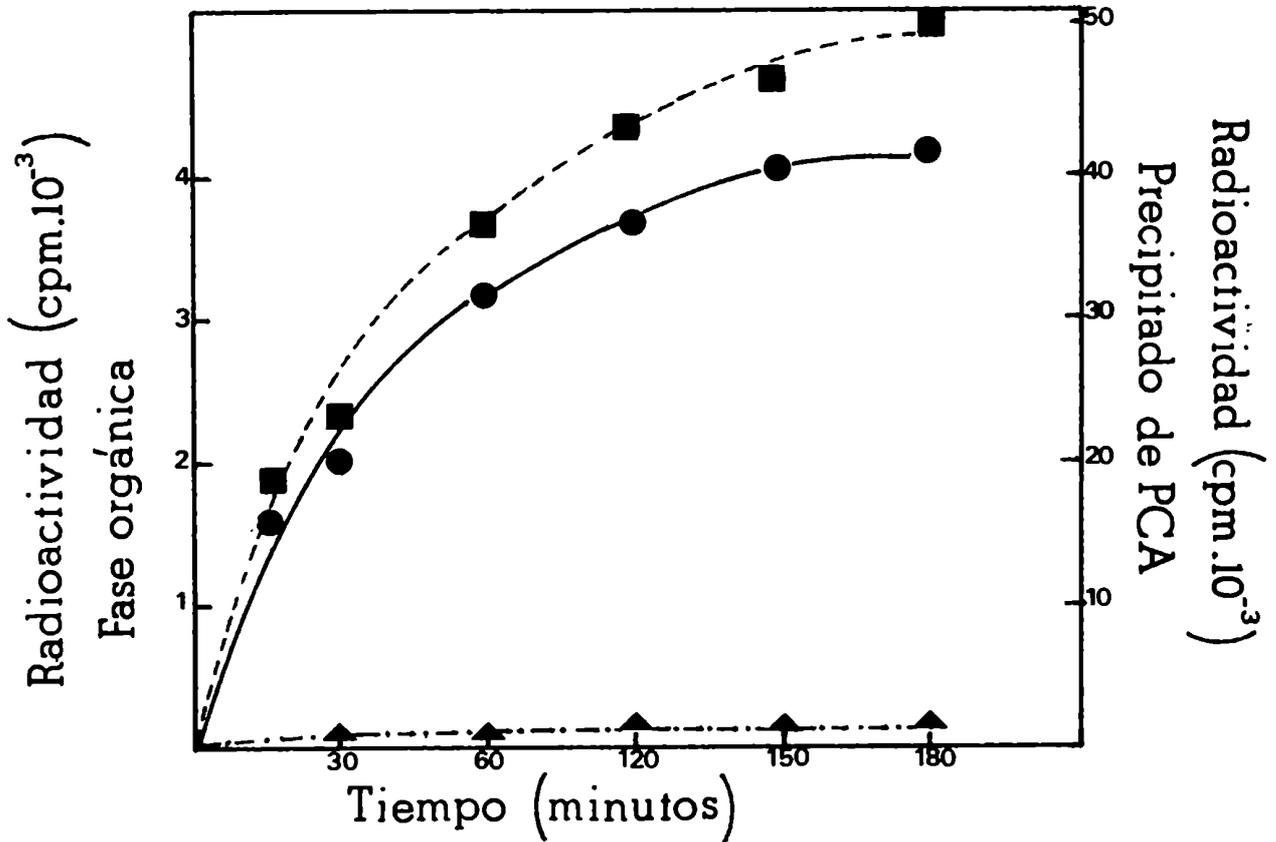


Fig. 22. Curva de tiempo para la incorporación de $(^3\text{H})\text{-dC}$ en presencia de

clorpromazina.

Para cada ensayo se usaron 10×10^6 células + PHA. Se centrifugaron y resuspendieron en 0.5 ml de MEM conteniendo 10 % de suero fetal. Se incubó con 2 uCi de (^3H) -dC y 60 u. clorpromazina durante los tiempos indicados a 37°C . Se extrajo y contó como ya fue descrito.

- +■ Incorporación de (^3H) -dC al precipitado en presencia de clorpromazina.
- Incorporación de (^3H) -dC en fase orgánica en presencia de clorpromazina.
- ▲—▲ Incorporación de (^3H) -dC en fase orgánica en ausencia de clorpromazina.

e) Efecto de la clorpromazina sobre la incorporación de (^3H) -dC en diferentes sistemas de células humanas.

Para estudiar si la incorporación de (^3H) -dC en fase orgánica ocurre en otras células además de en linfocitos + PHA y si dicha incorporación es también estimulada por la clorpromazina, se realizó el experimento que se muestra en la Tabla XIX donde fueron estudiadas diversas células de origen linfoideo; linfocitos en reposo, células de una leucemia prolinfocítica (linfocitos de la serie B), y líneas celulares HRIK y Raji "S" transformadas por virus de Epstein-Barr.

Los resultados se observan en la tabla XIX.

Aunque las células HRIK y las leucémicas son mucho más estimulables por clorpromazina que los linfocitos no estimulados y las células Raji, la incorporación en todas ellas de (^3H) -dC en la fase orgánica podría estar reflejando un mecanismo de biosíntesis de fosfolípidos que utilice a la deoxicitidina y/o citidina como precursor de liponucleótidos intermediarios.

Tabla XIX: Efecto de la clorpromazina sobre la incorporación de (^3H) -dC en diferentes células humanas linfoideas.

Células	CPZ	cpm incorporadas en fase orgánica	% Estimulación por acción de la droga
Linfocitos + PIA	-	207	100
	30 uM	1978	955
	60 uM	3271	1580
Linfocitos - PIA	-	120	100
	30 uM	505	420
	60 uM	353	294
HRTK	-	143	100
	30 uM	500	349
	60 uM	1593	1113
Raii "S"	-	135	100
	30 uM	190	140
	60 uM	361	267
Células leucémicas (leucemia prolinfocítica)	-	150	100
	60 uM	8870	1971

Para cada experimento se usaron 10^7 células en 0.5 ml de MEM conteniendo 10 % S. F y 2 uCi (^3H)-dC. Después de incubar 30 minutos a 37°C se extrajo la fase orgánica y se contó. La clorpromazina estuvo presente durante todo el tiempo de incubación.

2) Identificación del compuesto obtenido in vivo en presencia de clorpromazina.

i) Cromatografía en placa delgada.

El compuesto sintetizado in vivo en presencia de clorpromazina fue comparado cromatográficamente con el compuesto obtenido in vitro.

Se observa en la Fig. 23 que en el sistema cromatográfico utilizado ambos compuestos co-cromatografían.

Cuando el compuesto sintetizado in vivo en presencia de la droga se corre en Sílica Gel G pero utilizando un solvente más ácido como ser cloroformo-metanol-acético-H₂O (15:2:9:1) corre ligeramente desplazado respecto al compuesto sintetizado in vitro en ausencia de droga. Es un hecho conocido que las drogas anfifílicas modifican el R_F de los fosfolípidos (Allan D. y Mitchell R., 1975; Blaustein M. P., 1967; Feinstein M. B., 1964) pero para confirmar el resultado obtenido, se realizó el siguiente control.

Se usaron 2000 cpm/tubo en dos tubos del compuesto sintetizado in vitro, se llevaron a sequedad y se sonicaron en presencia de buffer Hepes 50 mM pH 7.8, siendo el volumen de incubación de 0.3 ml. A uno de ellos se le agregó clorpromazina 60 µl y se incubó 30 minutos a 37° C. Se extrajo con 3.7 ml de metanol-cloroformo (2:1) y se corrió en el solvente anteriormente mencionado. El radiocromatograma de la Fig. 24 muestra que efectivamente, en presencia de clorpromazina se modifica la posición del pico de fosfatidil-dCMP obtenido in vitro. Esta posición coincide con la del compuesto sintetizado in vivo en presencia de la droga (Fig. 24 B y C).

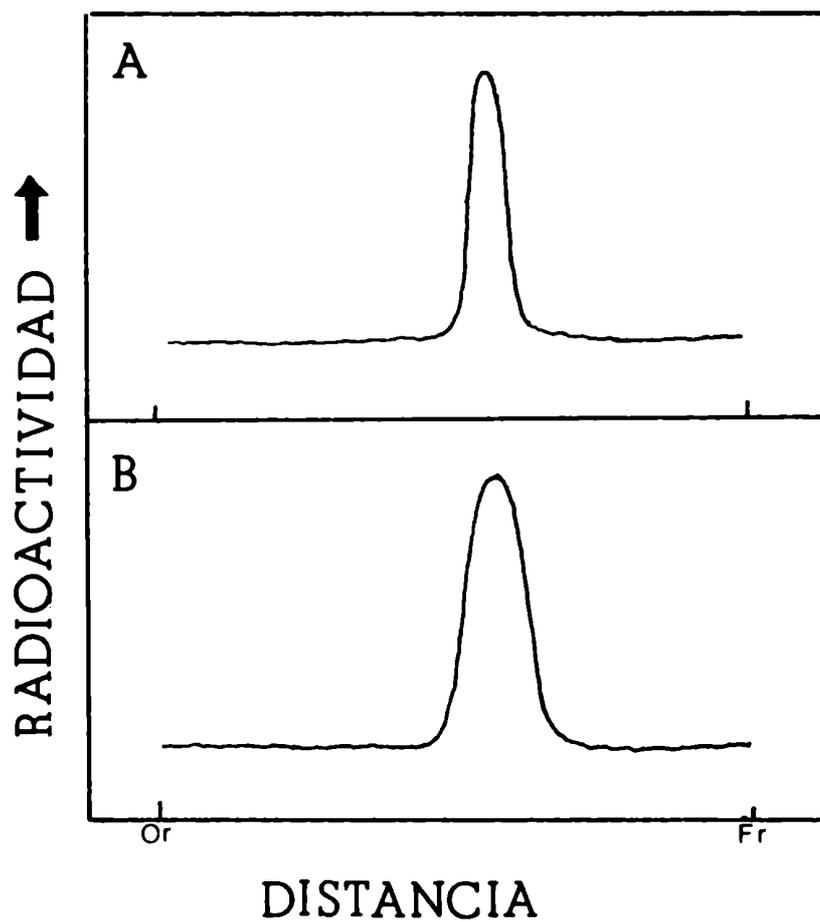


Fig. 23. Cromatografía en placa delgada en Sílica Gel G del compuesto obtenido in vitro (A) y del compuesto obtenido in vivo (B) en presencia de clorpromazina. Solvente: Cl_3CH -metanol-acético- H_2O (50:25:7:3).

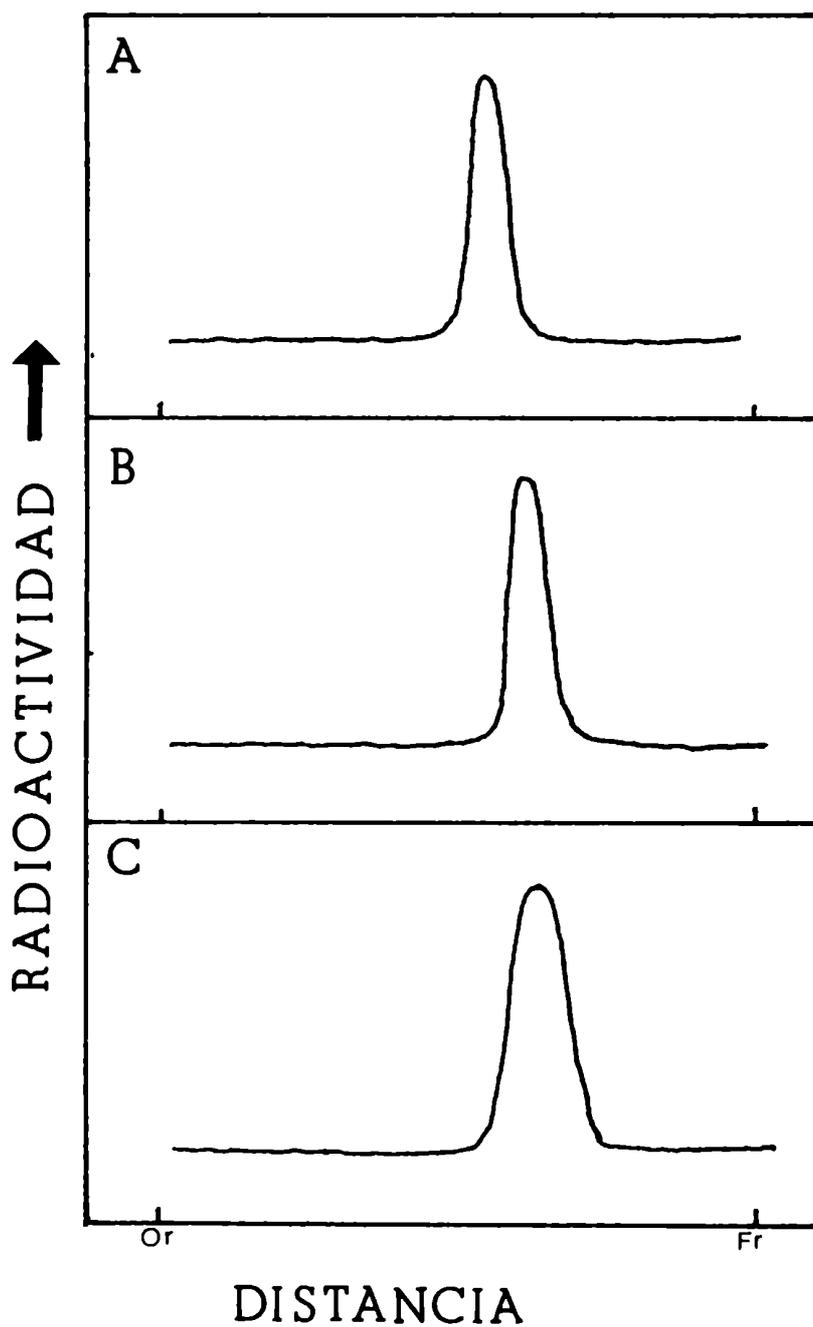


Fig. 24. Cromatografía en placa delgada en Sílica Gel G del compuesto sintetizado in vitro.

- A) Llevado a sequedad, sonificado en buffer HEPES 50 mM pH 7.8 y reextraído con Cloroformo-Metanol 1-2.
- B) Idem pero en presencia de CPZ 60 μ M.
- C) Cromatografía realizada en idénticas condiciones del compuesto sintetizado in vivo en presencia de 60 μ MCPZ.

ii) Hidrólisis alcalina del producto obtenido marcando con (^{14}C)glicero-
rol, (^3H)-dC y clorpromazina.

Con el objeto de caracterizar la molécula obtenida en las condiciones ya mencionadas, se incubó in vivo en presencia de (^{14}C)glicerol, (^3H)-dC y clorpromazina como está descrito en Métodos. Después de incubar y extraer el compuesto lipídico se corrió la muestra en $\text{Cl}_3\text{CH}-\text{AcOH}-\text{acético}-\text{H}_2\text{O}$ (50:25:7:3) y el pico que co-cromatografió con el compuesto sintetizado in vitro, fue cluído y sometido a una hidrólisis alcalina con KOH 0.3 N durante 26 horas. Se llevó a neutralidad con perclórico, se sembró en papel Whatman 1 y se corrió en acetato de amonio-etanol (600:1500) como solvente. Se usaron dCMP y α -glicerol-P como standards. Los resultados de la Fig. 25 demuestran la formación de dos picos de radioactividad que coinciden con los standards no radioactivos usados.

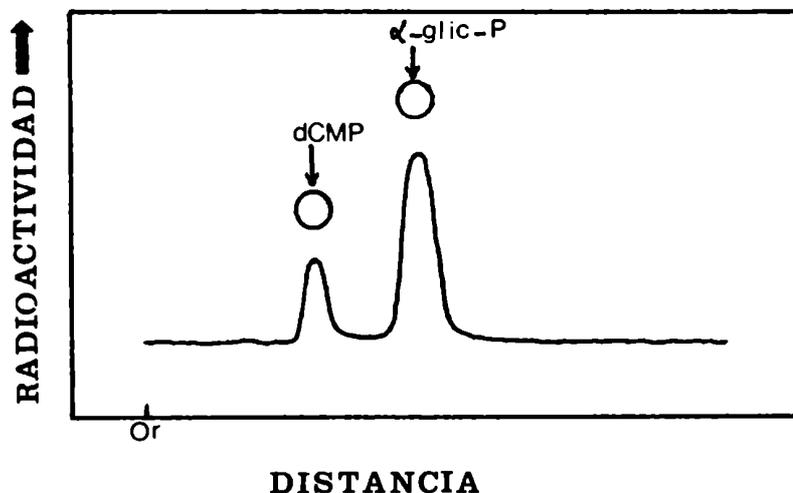


Fig. 25. Radiocromatograma de los productos de la hidrólisis alcalina del compuesto obtenido in vivo con (^{14}C)glicerol y (^3H)-dC.

La corrida fue realizada en papel Whatman 1 con acetato de amonio-etanol (600:1500) como solvente. Standards internos: dCMP (revelado con lámpara UV Mineralite) y α -glicerofosfato (revelado con reactivo de Burrows).

V. Posible rol del fosfatidil-dCMP como intermediario en la síntesis de fosfatidil-inositol

En mamíferos, el CDP-diglicérido es el intermediario activado conocido del ácido fosfatídico, a partir del cual se sintetizan fosfatidil-inositol (PI), fosfatidilglicerol y difosfatidilglicerol.

Si los linfocitos son capaces de sintetizar fosfatidil-dCMP a partir de deoxicitidina (in vivo) o de dCTP (in vitro), es muy probable que dicho compuesto sirva también como intermediario en la síntesis de PI. En la Tabla XX se puede observar el efecto del agregado de inositol en distintas condiciones de incubación de linfocitos humanos. De esta tabla se puede concluir: i) el inositol inhibe mucho más cuando se ensaya in vitro que cuando se ensaya in vivo, ii) el agregado de ácido fosfatídico exógeno también estimula la incorporación de (³H)-dC, iii) estos resultados conducen a formular la pregunta de cuál es el rol del inositol en este experimento ya que los mismos pueden indicar un efecto inhibitorio sobre la enzima que sintetiza el fosfatidil-dCMP o una utilización incrementada de dicho producto para dar PI.

Tabla XX: Síntesis de fosfatidil-dCMP y efecto del inositol en diferentes condiciones experimentales.

Condiciones	cpm fase org.	% inhibición
<u>Exp. 1:</u> Núcleos y "membranas plasmáticas" de linfocitos estimulados (+ PHA)		
Control	5.779	
+ Ac. fosfatídico (60 μ m)	9.846 (100 %)	
+ Ac. fosfatídico + inositol (10 μ m)	606	93.9
<u>Exp. 2:</u> Linfocitos permeabilizados (+ PHA)		
Control	2.866	
+ CPZ (60 μ m)	5.908 (100 %)	
+ CPZ (60 μ m) + inositol (10 μ m)	1.167	80.2
<u>Exp. 3:</u> Linfocitos permeabilizados (- PHA)		
Control	1.368	
+ CPZ (60 μ m)	3.377 (100 %)	
+ CPZ (60 μ m) + inositol (10 μ m)	1.075	68.1
<u>Exp. 4:</u> Linfocitos + PHA " <u>in vivo</u> "		
Control	752	
+ Ac. fosfatídico (60 μ m)	2.220 (100 %)	
+ Ac. fosfatídico + inositol (10 μ m)	1.544	30.4
+ CPZ (60 μ m)	7.370 (100 %)	
+ CPZ (60 μ m) + inositol (10 μ m)	5.822	21.0

Experimento 1: Se centrifugaron 100×10^6 células + PHA que se resuspendieron en 1 ml de buffer hipotónico. Después de dejar 20 minutos en frío se homogenei-

zó con 90 golpes de Bounce. Se usaron 100ul de este homogenato para cada ensayo, efectuado por duplicado. Se centrifugó a $500 \times g$ durante 10 minutos. Se resuspendió en la mezcla de incubación a $37^{\circ} C$ durante 30 minutos en presencia de 3.3 uCi (3H)-dCTP (A.E: 3000 cpm/pmol).

Experimento 2: Se usaron 10×10^6 células + PHA por ensayo. Se centrifugaron y resuspendieron en 300 ul de mezcla de incubación durante 30 minutos a $37^{\circ} C$ en presencia de 3.3 uCi (3H)-dCTP (A.E: 3000 cpm/pmol).

Experimento 3: SE usaron 10×10^6 células - PHA por ensayo. Se centrifugaron y resuspendieron en 300 ul de la mezcla de incubación durante 30 minutos a $37^{\circ} C$ en presencia de 3.3 uCi de (3H)-dCTP (A.E: 3000 cpm/pmol).

Experimento 4: Se centrifugaron 10×10^6 células + PHA y se resuspendieron en 0.5 ml de MEM conteniendo 10 % de suero fetal y 2 uCi de (3H)-dC. Se incubó 30 minutos a $37^{\circ} C$. El ácido fosfatídico se obtuvo en solución acuosa por sonicación como ya fue descrito.

En todos los casos se precipitó con PCA y se extrajo con cloroformo-metanol-CHH- 0.01 N.

a) Efecto del tratamiento con fosfolipasa C.

El siguiente experimento fue efectuado con el objeto de confirmar el resultado estimuladorio del ácido fosfatídico sobre la incorporación de (3H)-dC. Para ello se efectuó un tratamiento in vivo con fosfolipasa C que, como fue observado por Mitchell (1975), incrementa la concentración del ácido fosfatídico celular. Dichos autores utilizaron concentraciones no líticas de dicha enzima en eritrocitos humanos o linfocitos de cerdo y demostraron que se produce acumulación de 1-2 diacilglicerol que en presencia de ATP es fosforilado por una quinasa de membrana para sintetizar ácido fosfatídico. Mitchell (1975) postuló además que el PI es degradado en la célula por una fosfolipasa de tipo C para dar precisamente 1-2 diacilglicerol.

Tabla XXI: Efecto del tratamiento de linfocitos + PHA con fosfolipasa C

Tratamiento	Precursor radioactivo	Fosfolipasa C	cpm fase orgánica	%	cpm precipitado	%
<u>"in vivo"</u>	$(^3\text{H})\text{-dC}$		4.728	100	42.379	100
		2 ug	9.336	197	59.212	139.7
<u>"in vitro"</u>	$(^3\text{H})\text{-dCTP}$		10.045	100	2.197	100
		2 ug	21.456	213	3.068	139.6

En cada experimento fueron utilizados 25×10^6 células. Tratamiento "in vivo"; se resuspendieron en 1.5 ml de MEM. Tratamiento "in vitro"; se resuspendieron en 1.5 ml de medio de permeabilización. Se incubó durante 20 minutos a 37°C . Se controló la viabilidad de las células tratadas con fosfolipasa C mediante azul Tripan, siendo el resultado obtenido similar a los controles. La radioactividad en fase orgánica y precipitado se contó como ya ha sido descrito.

Los resultados obtenidos verifican la hipótesis mencionada anteriormente. Tanto in vivo como in vitro la estimulación producida por la fosfolipasa C es del mismo orden. Es interesante destacar que dicho tratamiento también incrementa la incorporación al DNA (precipitado), siendo una probable explicación el hecho de que por la acción de dicha enzima se escinden fosfolípidos celulares, produciéndose así una disminución de cargas negativas debidas al fósforo de los fosfolípidos que se encuentran sobre la superficie celular. De esta manera se facilitaría la entrada de precursores como el dCTP a través de la membrana plasmática.

b) Utilización del fosfatidil-dCTP sintetizado in vitro.

Para resolver la hipótesis planteada anteriormente respecto a la acción del

inositol agregado durante la reacción (Tabla XX) se realizó el experimento que se muestra en la Fig. 26. En ella se puede observar que una vez alcanzado el plateau de la formación de fosfatidil-dCMP a partir de (^3H)-dCTP, el agregado de inositol disminuye drásticamente la cantidad de fosfatidil-dCMP, probablemente por síntesis de fosfatidil-inositol.

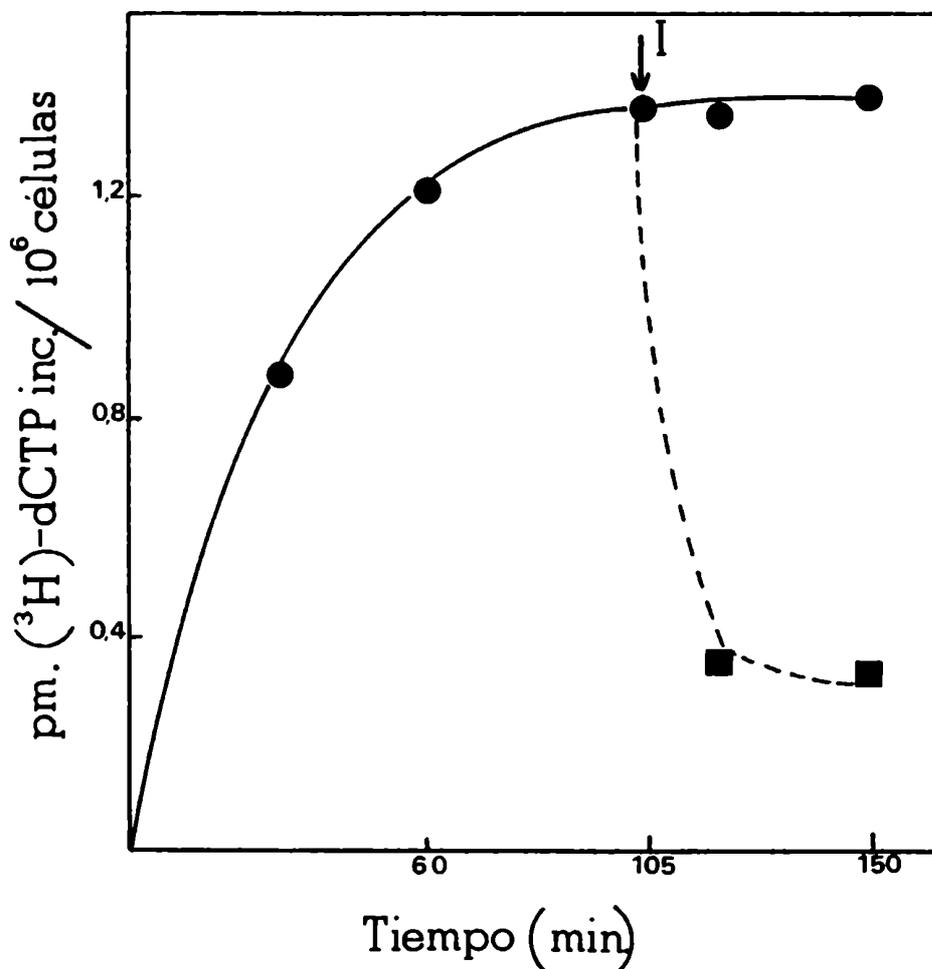


Fig. 26. Utilización del P-dCMP sintetizado *in vitro*.

Para cada ensayo se utilizaron 3×10^6 linfocitos + PHA. Se centrifugaron y se resuspendieron en la mezcla de incubación como está descrito en Métodos, salvo que en este caso la actividad específica usada del (^3H)-dCTP fue 150 cpm/pmol. En el tiempo indicado en la figura se agregó inositol 10 μM . Después de incubación, se extrajo la fase orgánica como ya fue descrito y se contó.

c) Estudio de la relación fosfatidil-dCMP/PI obtenida in vitro e in vivo.

Para estudiar cómo se distribuía la radioactividad de (^{14}C)glicerol en fosfatidil-dCMP y PI obtenida en dos condiciones diferentes (incubación in vivo con (^{14}C)glicerol seguida de incubación en medio de permeabilización con (^3H)dCMP o incubación totalmente in vivo con (^{14}C)glicerol y (^3H)-dC más clorpromazina (60 μM), se procedió a cromatografiar los extractos lipídicos obtenidos en las condiciones arriba indicadas en Sílica Gel G usando Cl_2CH -metanol-acético- H_2O (15:2:0:1) como solvente. Se eligió este solvente porque ensayos previos demostraron que separaba muy bien fosfatidil-dCMP de PI (Fig. 27 (A) y (B)).

Las relaciones obtenidas de las Fig. 27 (A) y (B) se muestran en la Tabla XXII.

Tabla XXII: Relación (^{14}C)fosfatidil-dCMP/(^{14}C)fosfatidil inositol, obtenidas por incubación in vitro e in vivo.

Condición	(^{14}C)dCMP/(^{14}C)PI
<u>In vitro</u>	6.5
<u>In vivo</u> (+ CPZ)	0.6

Estos resultados fueron obtenidos a partir de los datos presentados en la Fig. 27 (A) y (B).

Estos resultados muestran la acumulación de (^{14}C)dCMP respecto a (^{14}C)PI en el experimento realizado in vitro respecto al sintetizado in vivo, probablemente porque en el primer caso el inositol presente en la célula permeabilizada resultó limitante para la síntesis de PI.

Existen en la literatura datos contradictorios sobre el efecto de la clorproma-

zina en la síntesis de PI, ya que Freinkel et al (1975), encontraron que la clorpromazina inhibe la síntesis de PI a partir del CDP-diglicérido y disminuye además su velocidad de catabolismo, mientras que Allan y Michell (1975) demostraron que dicha droga estimula la síntesis de PI en linfocitos de cerdo.

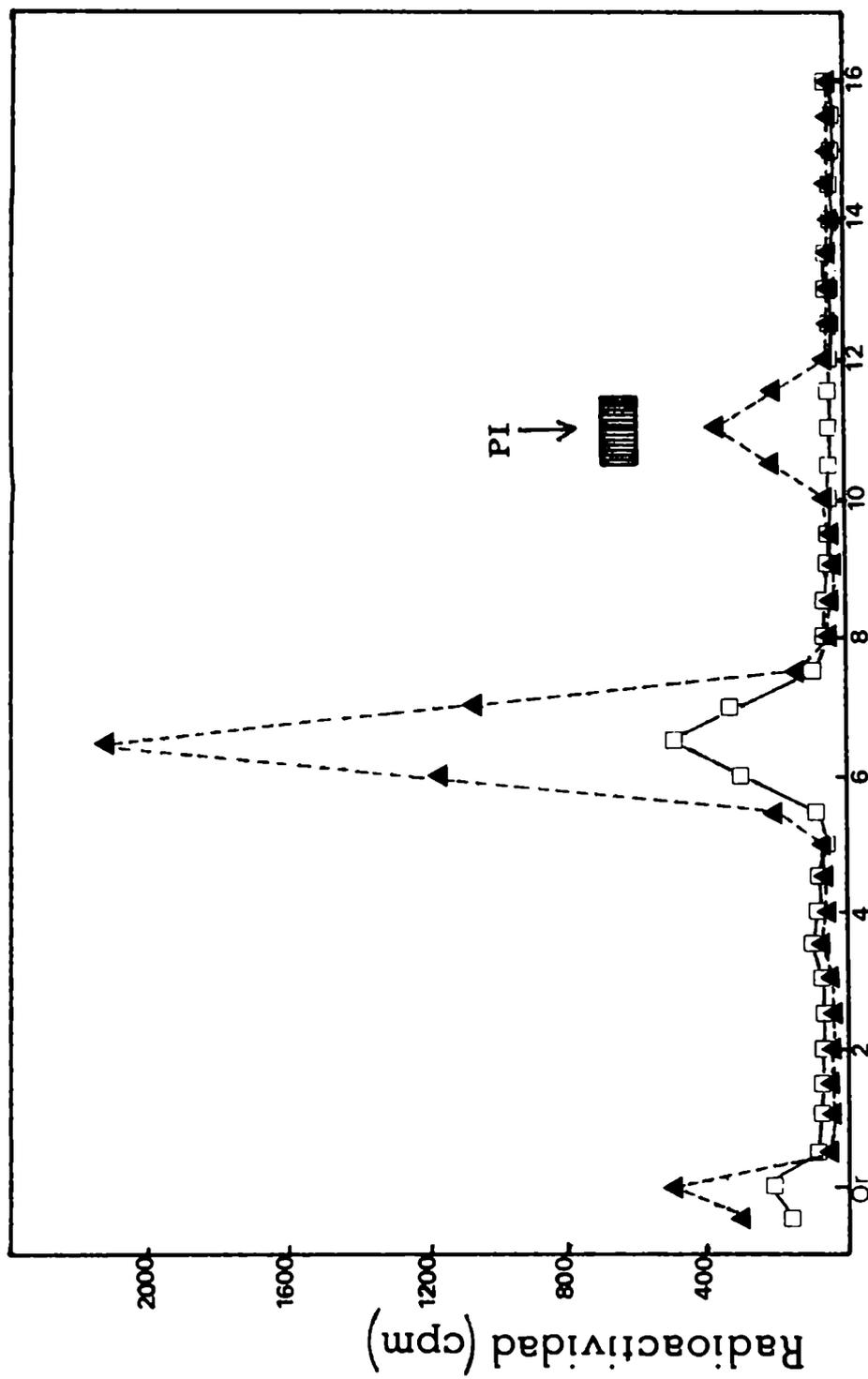
Como la relación de la Tabla XXII para el compuesto in vivo fue obtenida en presencia de clorpromazina, y dados los resultados contradictorios anteriormente mencionados, se incubaron linfocitos + PHA en presencia de (^{14}C) glicerol y (^3H) -dC con y sin agregado de clorpromazina. Si bien en condiciones fisiológicas (ausencia de clorpromazina) el steady-state del fosfatidil-dCMP presenta niveles sumamente bajos, es posible observar en el cromatograma de la Fig. 28 (A) un pequeño pico que corre en la misma posición que el fosfatidil-dCMP in vitro. Las relaciones entre fosfatidil-dCMP y PI en ambas condiciones se muestran en la tabla XXIII.

Tabla XXIII: Relación fosfatidil-dCMP/fosfatidil inositol, obtenidas por incubación in vivo en ausencia y presencia de clorpromazina.

Condición	$(^{14}\text{C})\text{P-dCMP}/(^{14}\text{C})\text{PI}$
<u>In vivo</u> (- CPZ)	0.22
<u>In vivo</u> (+ CPZ)	0.57

Estos resultados fueron obtenidos a partir de los datos de la Fig. 28 (A) y (B).

Estos resultados sugieren que la clorpromazina inhibe la transformación de fosfatidil-dCMP en PI.



Distancia al origen (cm)

Fig. 27 A. Cromatografía en $\text{Cl}_3\text{CH-Metanol-Acético-H}_2\text{O}$ (15: 2: 9: 1) del producto sintetizado parcialmente in vitro (in vivo con ^{14}C)-glicerol y luego in vitro con ^3H -dCTP). La sílica gel se cortó en tiras de 0.5 cm y se contó con Tolueno-Omnifluor con canales para doble isótopo. El PI no radioactivo se reveló con vapores de I_2 .

▲-cpm de ^{14}C
 □-cpm de ^3H

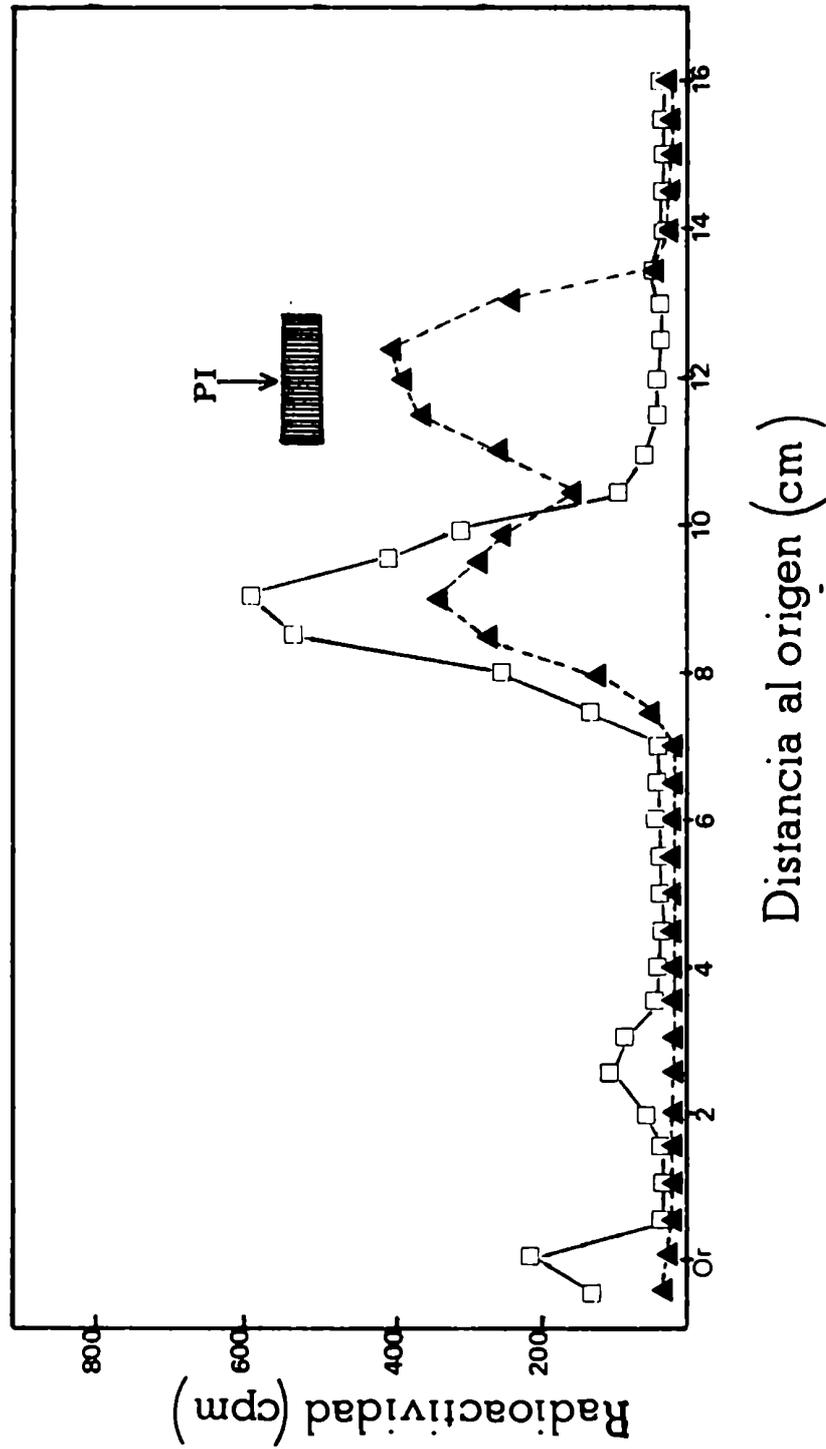
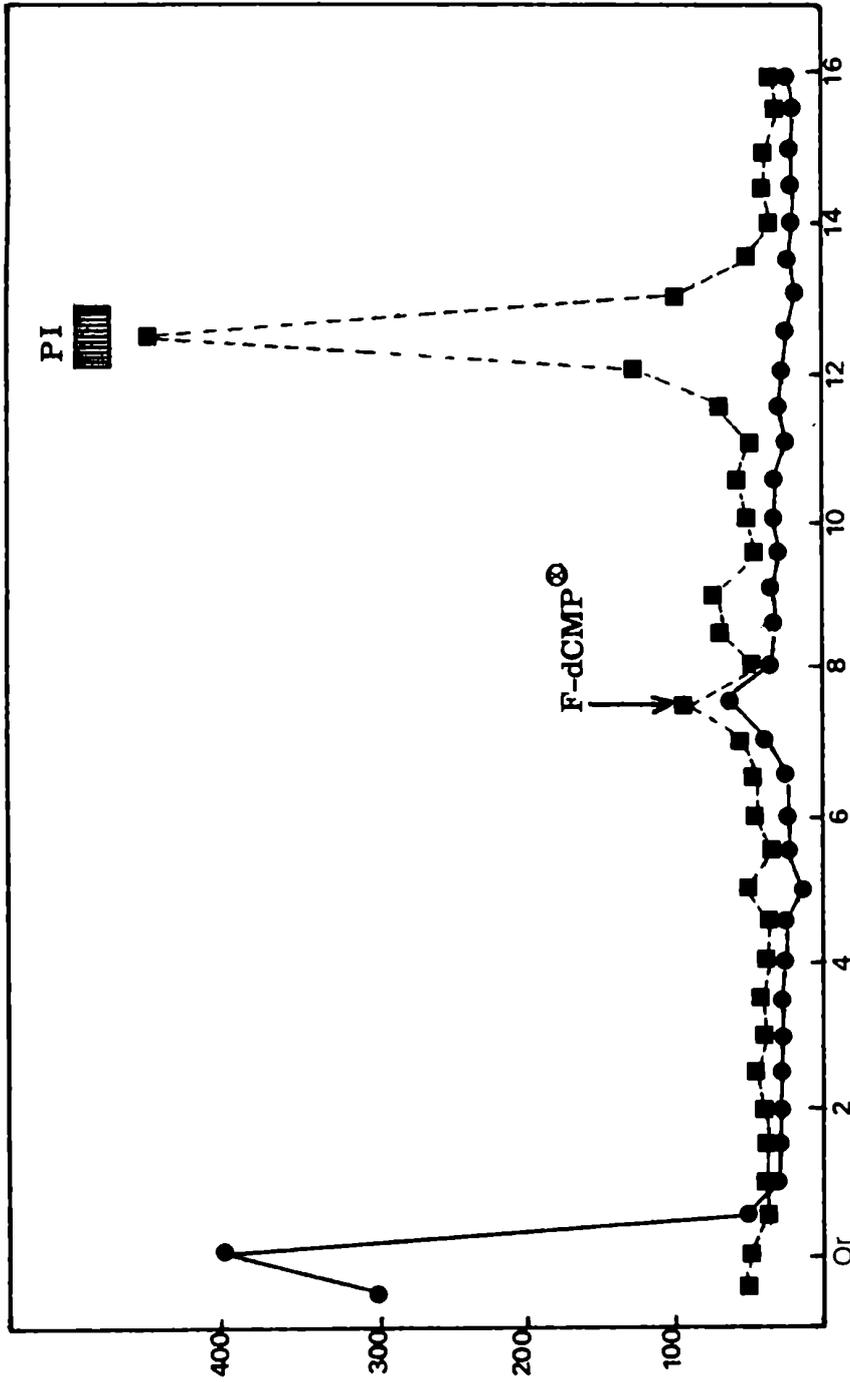


Fig. 27 B. Cromatografía en $\text{Cl}_3\text{CH-Metanol-Acético-H}_2\text{O}$ (15; 2; 9; 1) del producto sintetizado in vivo con (^{14}C) glicerol y (^3H)dC en presencia de CPZ y corrido en sílica GelG. La sílica se cortó en tiras de 0.5 cm y se contó con Tolueno-omnifluor con canales para doble isótopo. El PI no radioactivo se reveló con I_2 .

·▲ cpm de (^{14}C)

□ cpm de (^3H)



Distancia al origen (cm)

Fig. 28 A. Síntesis de F-dCMP in vivo obtenido por incubación con (^{14}C)-glicerol y (^3H)dC como ya se describió. Se siembra en Síllica Gel y se corre en $\text{Cl}_3\text{CH-MeOH-Acético-Agua}$ (15; 2; 9; 1) como solvente. Se corta la placa y se cuenta como ya fue mencionado anteriormente.

... cpm de (^{14}C)
 ●—● cpm de (^3H)

Zona donde corrió el F-dCMP sintetizado in vitro y que se usó como standard externo.

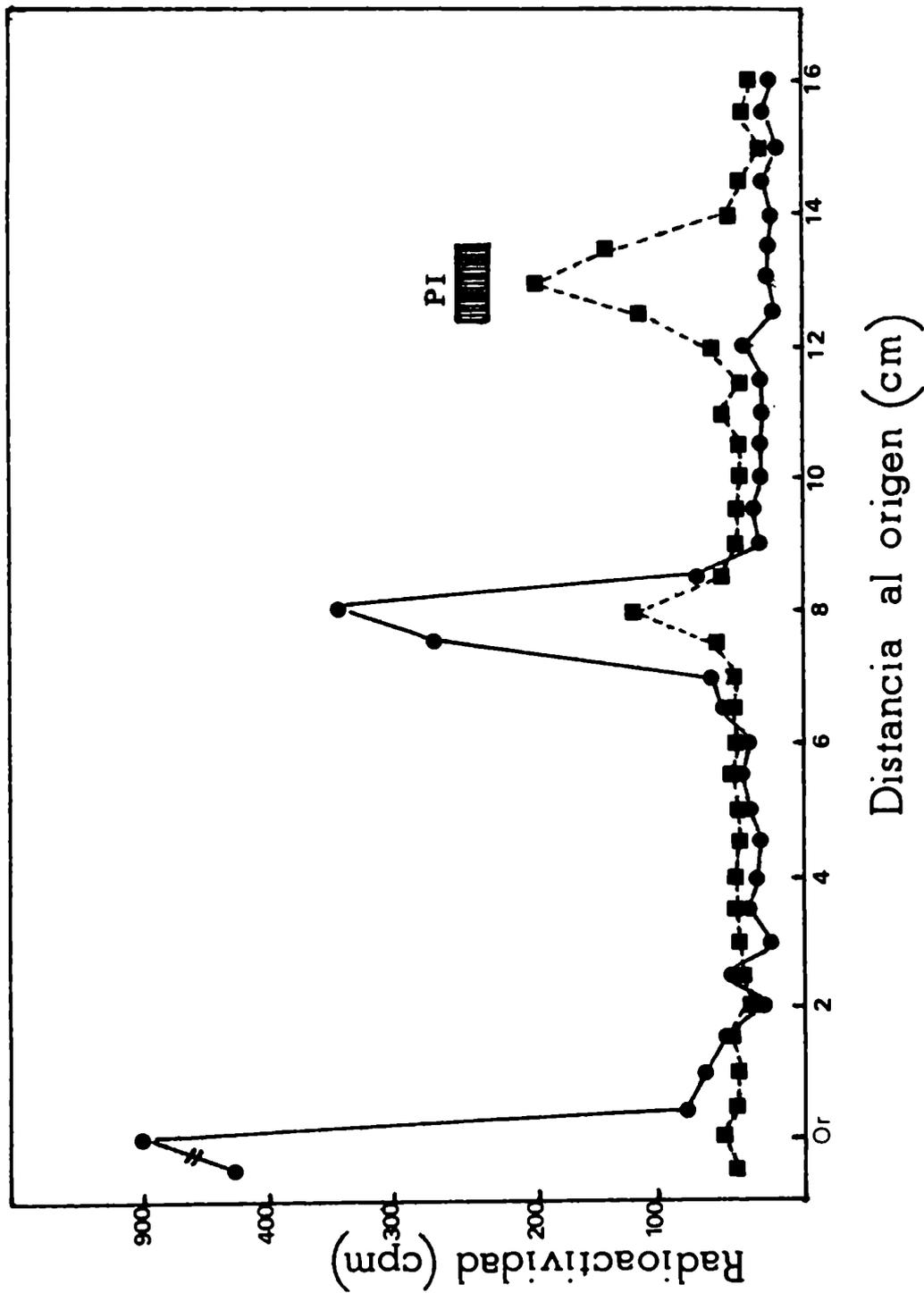


Fig. 28B. Síntesis de F-dCMP in vivo en presencia de CPZ obtenido por incubación con (¹⁴C)-glicerol y (³H) dC (descrito en Métodos). El procedimiento seguido se describe en la figura anterior.

- cpm de (¹⁴C)
- cpm de (³H)

d) Efecto de la preincubación con ácido araquidónico sobre la síntesis de fosfatidil-dC.P.

En estudios recientemente publicados (Bazán et al, 1977), se enfatiza el hecho de que en cerebro e hígado bovino, así como en hígado de rata, cuando se estudia la composición en ácidos grasos de los CDP-diglicéridos, se encuentra que el estearato y el araquidonato son los ácidos grasos saturados y no saturados más importantes. Más aún, parece ser importante para la célula que el araquidónico ocupe la posición 2 en la molécula del fosfoglicérido. Se ha encontrado además que el liponucleótido tiene mayor contenido en ácido araquidónico que su precursor, el ácido fosfatídico, y que además este contenido se asemeja al perfil de ácidos grasos del fosfatidil inositol. Thompson y Mc Donald (1975) proponen varias hipótesis para este hecho, siendo una de ellas que la enzima CTP-ácido fosfatídico citidil-transferasa es selectiva para las especies de fosfatídico que contienen araquidónico. Resch (1976) presenta evidencias de que cuando se incrementa el turnover de los fosfolípidos de los linfocitos debido a la activación por mitógenos se produce un alto grado de insaturación en las membranas de los mismos debido a la alta afinidad de la enzima acyl-CoA acyltransferasa por ácidos grasos poliinsaturados. Se postula, además que debido a este hecho se produce un aumento en la fluidez de la membrana de los linfocitos activados. Esto último podría estar relacionado con noción existente de que la fluidez de la membrana plasmática está involucrada en el control del crecimiento de las células de mamíferos (Barnett et al , 1974). Estos resultados condujeron a la realización del experimento que se muestra en la Fig. 29. Allí es posible ver el efecto estimulador que sobre la incorporación de (³H)-dC tiene la preincubación de los linfocitos con ácido araquidónico. Esto se debería al hecho de que las nuevas especies moleculares sintetizadas son más ricas en araquidónico y de esta manera, son mejores sustratos de la enzima mencionada más arriba. Para confirmar que realmente el ácido ara-

quidónico es incorporado a la molécula de fosfatidil-dCMP y no que actúa como simple activador de la enzima, se realizó un experimento en condiciones similares, pero preincubando con (^{14}C)araquidónico. El resultado se observa en el cromatograma de la Fig. 30. Es evidente de allí que el araquidónico fue incorporado a la molécula del glicerolípido, confirmando la hipótesis arriba mencionada. También es posible observar un pico que en el sistema usado corrió con el standard interno de PI; el ácido araquidónico sería así incorporado al fosfatidil-dCMP y al fosfatidil-inositol.

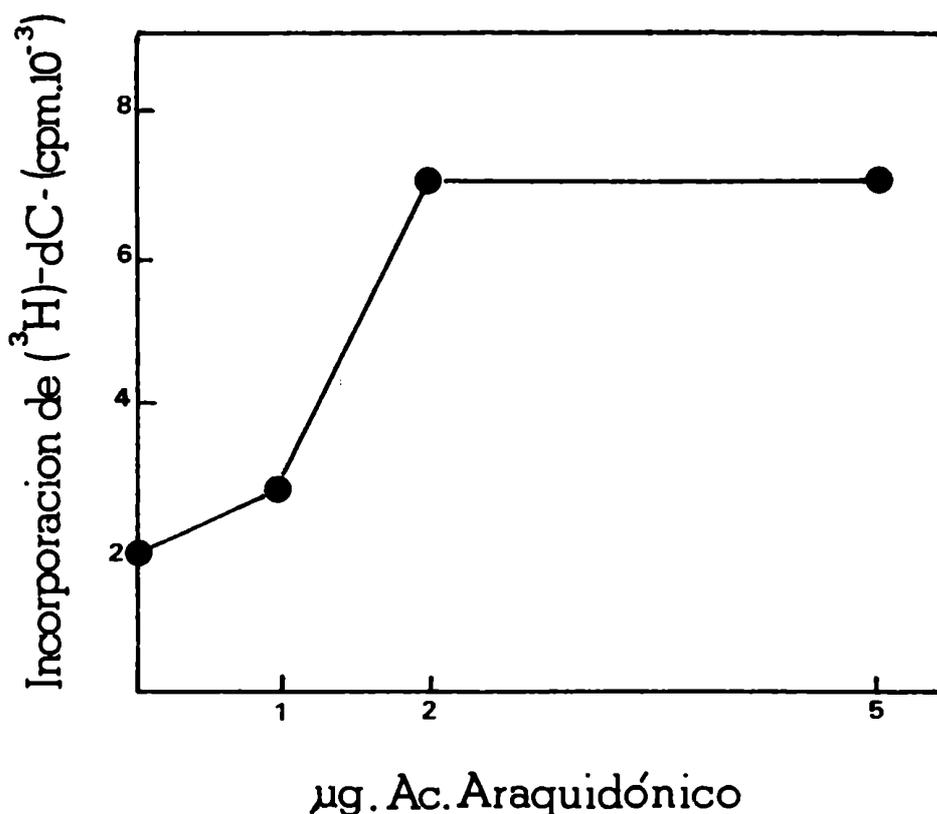


Fig. 29. Efecto de la preincubación con ácido araquidónico sobre la incorporación de (^3H)-dC.

Se preincubaban en cada caso 10×10^6 linfocitos + PMA en 0.5 ml de MEM, 10 % suero fetal, durante 60 minutos a 37°C con ácido araquidónico en las cantidades que se muestran en la figura. Después de incubar, se centrifugan las células, se resuspenden en el mismo volumen de la preincubación, y se les agrega 2 uCi de (^3H)-dC. Se incubó 60 minutos a 37°C , y se extrae la fase orgánica como ya fue descrito.

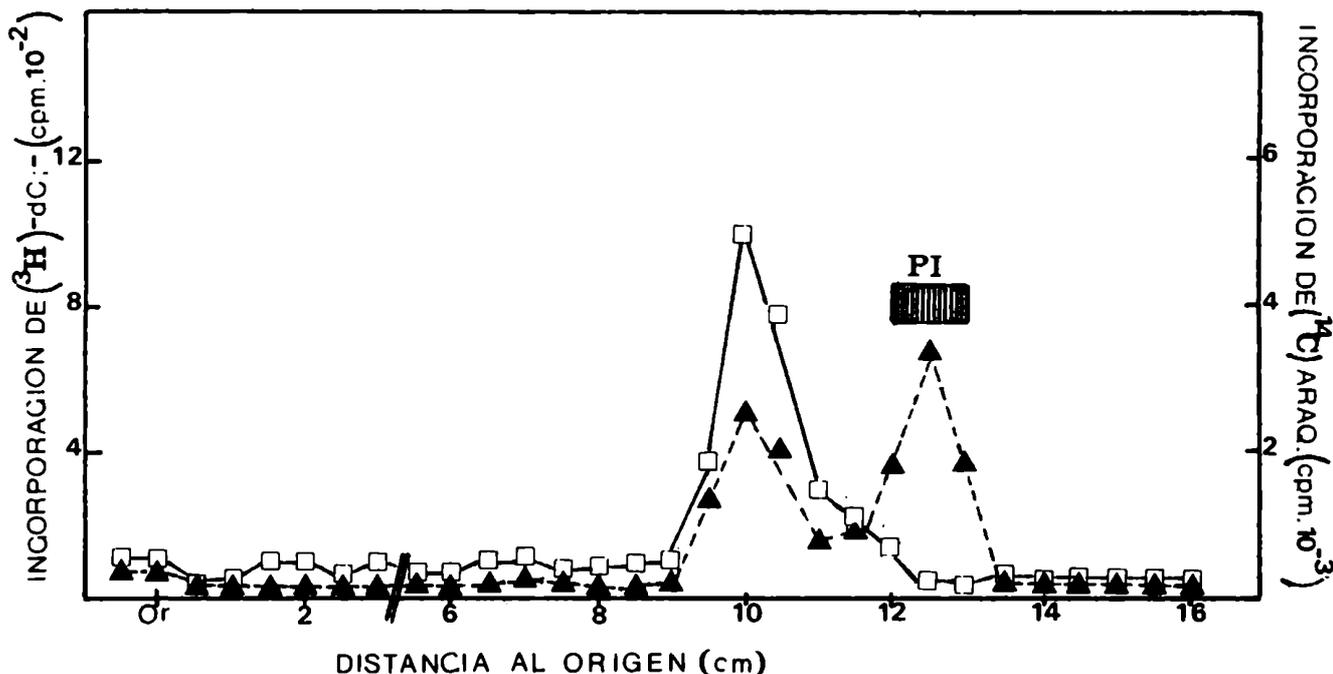


Fig. 30. Efecto de la preincubación con (^{14}C) araquidónico.

Se preincubaron 10×10^6 células en 0.5 ml de MEM conteniendo 10 % de suero fetal, en presencia de 4.26 μg de (^{14}C) araquidónico (0.16 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), durante 60 minutos a 37°C . Después de preincubar, las células fueron lavadas, re-suspendidas en igual volumen de MEM e incubadas con 2 μCi de $(^3\text{H})\text{-dC}$ durante 60 minutos a 37°C . Se extrajeron los lípidos precipitables con TCA como se indica en métodos. Se cromatografió el extracto lipídico en Sílica Gel G en cloroformo-metanol-ácido acético- H_2O (15:2:9:1). Se cortó en tiras de 0.5 cm, se colocaron en viales en presencia de tolueno-omnifluor y se contó en un Packard con setting para doble isótopo.

□-□ cpm de (^3H) ; ▲-▲ cpm de (^{14}C) .

e) Efecto de la 1- β -D-arabinofuranosil-citosina (Ara-C).

El Ara-C es el 2 β -HIO análogo de la deoxicitidina, habiéndose demostrado que afecta la síntesis de DNA pero no la de RNA en distintos tejidos. El hecho de ser un potente inhibidor en la biosíntesis de macromoléculas ha conducido a que se la emplee en el tratamiento de diversas neoplasias humanas. Si bien es cierto que el estudio sobre dicha droga comenzó hace ya una década su mecanismo de ac-

ción todavía no se comprende claramente.

Las quinasas intracelulares convierten al Ara-C en 5' nucleótidos, y se considera que de estos derivados la arabinosilcitosina trifosfato (Ara-CTP) es la forma activa de la droga (Chu et al, 1966; Kessel et al, 1969). Existen dos hipótesis alternativas para el efecto inhibitorio de la síntesis de DNA: en el primer modelo el Ara-CTP actúa como inhibidor competitivo del dCTP durante la elongación de las cadenas de DNA (Graham and Whitmore, 1970; Rama-Reddy et al, 1971). En el segundo modelo el Ara-CTP se incorpora a la cadena en crecimiento de DNA, donde impide la elongación posterior de la cadena, catalizada por la polimerasa (Kornberg, 1974). Recientemente Fridland (1977, a y b) propone que la droga inhibe en forma preferencial la iniciación de unidades de replicación del DNA. No obstante estos resultados, existen discrepancias entre la concentración de Ara-CTP necesaria para inhibir la actividad de DNA polimerasa y la concentración mucho menor que se requiere para detener la síntesis de DNA. Esto último podría indicar que la droga interfiere no sólo en los sitios indicados sino en otro u otros procesos todavía no bien determinados. Esta última observación así como el hecho de que el dCTP es sustrato de la reacción de síntesis del fosfatidil-dCMP condujeron a estudiar su posible efecto sobre la síntesis del liponucleótido mencionado. En la Fig. 31 se demuestra el efecto inhibitorio del Ara-C sobre la incorporación de (³H)-dC a linfocitos estimulados. La máxima inhibición de la droga se observa a los 15 minutos de agregada, tiempo durante el cual se consumió el producto sintetizado durante los primeros 15 minutos. A los 30 minutos de incubación en presencia de Ara-C pareciera que el sistema se va recuperando parcialmente de la inhibición producida por la droga, probablemente por transformación parcial del Ara-CMP en Ara-UMP por acción de la enzima deoxicitidina deaminasa presente en alta actividad en las células de origen linfoideo.

La gran inhibición observada se debería a que el Ara-CTP compite con el dCTP por el ácido fosfatídico, con posterior formación de fosfatidil-Ara-CMP. Este

efecto observado es sumamente interesante ya que Raetz et al (1976) demuestran que sólo un 30 % del Ara-CDP-DL-dipalmitina de origen sintético puede ser sustrato para la enzima fosfatidil-inositol sintetasa en microsomas de hígado de rata y que no puede ser convertido a fosfatidil-glicerofosfato por mitocondrias de hígado de rata o a fosfatidil-serina por extractos de *Escherichia coli*. Estos resultados previos permiten sugerir un nuevo mecanismo de acción de esta droga antineoplásica. Dicho mecanismo implicaría la inhibición parcial de la biosíntesis de fosfolípidos celulares.

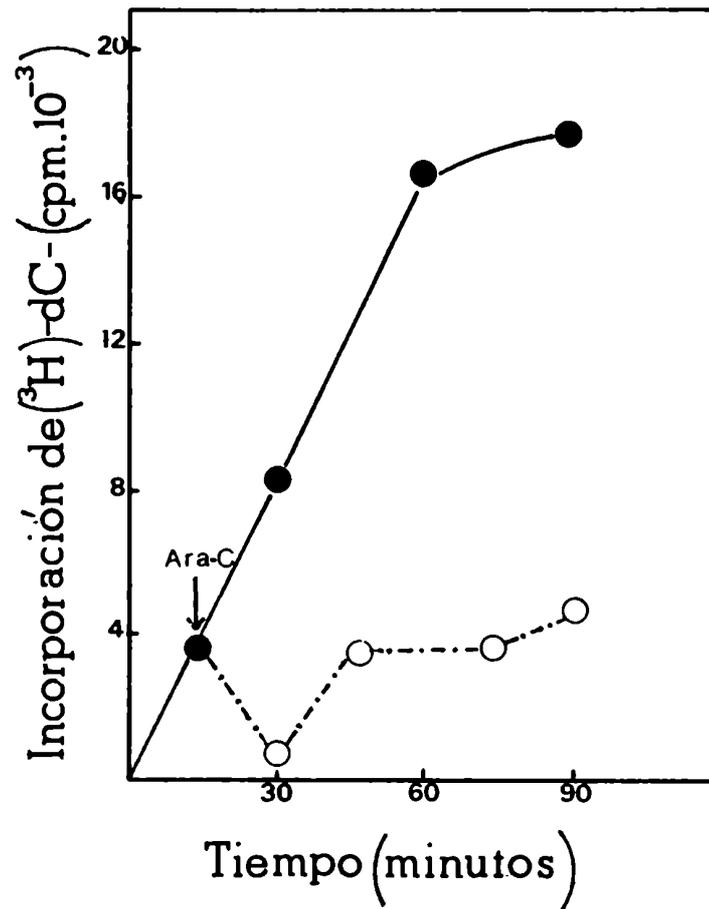


Fig. 31. Efecto del Ara-C sobre la incorporación de (3H)-dC a linfocitos + PMA.

Para cada ensayo se usan 10^7 células + PMA resuspendidas en 0.5 ml de ME. conteniendo 10 % de suero fetal. Se incubó con 2 uCi de (3H)-dC. Al tiempo indicado se agregó 25 ug de Ara-C. Se precipitó con PCA y se ex-

trajo como ya fue descripto.

- cpm incorporadas a fase orgánica en ausencia de Ara-C;
- cpm incorporadas a fase orgánica en presencia de Ara-C.

DISCUSION

El estudio de la biosíntesis y regulación del liponucleótido CDP-diglicérido (fosfatidil-CMP) como forma activada del ácido fosfatídico data de bastante tiempo atrás, habiéndose obtenido evidencias de que en eucariotes sería el precursor de los fosfolípidos fosfatidil-inositol, fosfatidil-glicerol y cardiolipina (Thompson, 1973). A pesar de que las reacciones que estarían involucradas en su síntesis, y que fueron descritas en la Introducción de esta Tesis, fueron propuestas hace ya dos décadas (Agranoff et al, 1958; Paulus y Kennedy, 1960), el liponucleótido ha sido aislado sólo recientemente a partir de sistemas biológicos. Hauser y Eichberg en 1975, mediante el uso de precursores radioactivos, hallaron formación de CDP-diglicérido en glándula pineal y Thompson y Mc Donald (1976), mediante el uso de procedimientos de extracción en gran escala, aislaron dicho compuesto a partir de hígado y cerebro bovino. Estos trabajos permitieron demostrar la existencia in vivo de este compuesto. Raetz y Kennedy (1973) y Thompson y Mc Donald (1976) proponen en bacterias y en células de mamíferos respectivamente, que la concentración intracelular del compuesto es sumamente baja, representando alrededor del 1-5% de la concentración del ácido fosfatídico.

Dichos compuestos constituirían de esta manera la etapa limitante de la velocidad en los procesos biosintéticos involucrados.

Es interesante destacar, que en bacterias, donde los liponucleótidos de citidina actúan como precursores de todos los fosfolípidos (Ambron y Pieringer, 1973), el pool de dichos nucleótidos consiste en cantidades aproximadamente equimoleculares de CDP-diglicérido y dCDP-diglicérido (Raetz y Kennedy, 1973). No obstante los resultados anteriormente mencionados en bacterias, no se había informado previamente sobre la presencia in vivo de dCDP-diglicérido (fosfatidil-dCMP) en eucariotes. Los resultados expuestos en esta Tesis constituyen la primera evidencia de su presencia in vivo.

Esta conclusión fue obtenida a partir de los experimentos realizados in vitro e in vivo y presentados en la sección de Resultados y que serán discutidos a continuación en forma sucesiva.

I) Síntesis de fosfatidil-dCMP in vitro utilizando linfocitos permeabilizados.

Los resultados obtenidos previamente por Mordoh y Fridlender (1977) y ampliados en esta Tesis, permitieron demostrar que el (^3H) dCTP se incorporaba más eficientemente que los otros dNTP_s en células permeabilizadas (Tabla IV, Fig. 6). Se sugirió que este comportamiento diferencial sería debido a que el (^3H) dCTP actuaría como precursor del DNA pero fundamentalmente de un compuesto soluble en solventes orgánicos (Tabla VI). La síntesis de este compuesto se incrementa cuando los linfocitos son desplazados del estado de reposo al de división celular (Tabla V).

La naturaleza lipídica del compuesto formado a partir del (^3H) dCTP fue demostrada en forma inequívoca por su comportamiento cromatográfico en distintos solventes (Fig. 7). Para determinar su naturaleza química se utilizaron diversos procedimientos analíticos que incluyeron saponificación, tratamiento con fosfolipasas C y D, hidrólisis alcalina y tratamiento con nucleótido-pirofosfatasa. El análisis de los resultados obtenidos (Tablas X-XIII, Figs. 8-12), demuestran que la molécula contiene un residuo de (^3H) dCMP unido a la porción lipídica por una unión pirofosfato. Con el propósito de analizar la composición de la porción lipídica se incubaron los linfocitos in vivo con (^{14}C) glicerol previamente a la marcación in vitro con (^3H) dCTP. De esta manera se obtuvo un compuesto doblemente marcado (Fig. 13, Tabla XIV), cuya hidrólisis alcalina condujo a la formación de (^3H) dCMP y (^{14}C) glicerol-P (Figs. 14 y 15).

Generalmente se observó como resultado de la hidrólisis alcalina la formación de un producto intermedio, identificado tentativamente como dCDP-glicerol (Fig. 15).

Estos resultados permiten concluir que el compuesto sintetizado in vitro es el fosfatidil-dCMP, cuya estructura se muestra en el esquema.

Con el propósito de lograr más información sobre las características fisiológicas del fosfatidil-dCMP, se realizaron experimentos para determinar la distribución subcelular del compuesto sintetizado in vitro en linfocitos permeabilizados a partir de (^3H) dCTP (Tabla XV). Se concluyó que la máxima incorporación estaba localizada en la fracción más pesada (600 g). Cuando se estudió la incorporación de (^3H) dCTP en fosfatidil-dCMP pero utilizando no ya linfocitos permeabilizados sino la fracción subcelular de 600 g, se halló que dicha síntesis es inhibida por Triton X-100, aún a bajas concentraciones (Fig. 16).

Este comportamiento es parecido a lo que sucede con la enzima microsomal de corteza cerebral de conejo. (Thompson, 1977), mientras que cuando se analiza la enzima mitocondrial, se observa que ésta no es afectada por la concentración de detergente ensayada. Por otra parte se ha demostrado (Mc Caman y Finnerty, 1968) que algunas formas bacterianas de CTP-fosfatídico-citidil-transferasa requieren para su actividad la presencia de detergentes no iónicos. Sería posible entonces que la síntesis de CDP diglicérido mitocondrial sea efectuado por una enzima de tipo procariótico, distinta de la enzima del retículo endoplásmico.

El agregado de ácido fosfatídico exógeno estimuló la síntesis (Fig. 17) observándose máximo efecto con aproximadamente 60-100 μM de ácido fosfatídico. Las concentraciones más altas fueron progresivamente inhibitorias debido probablemente a la presencia de un precipitado formado por ácido fosfatídico e iones Mg.

La purificación por gradiente de sacarosa de la fracción de 600 g (Fig. 18) mostró que a partir de ella se pueden obtener dos fracciones; a) una fracción llamada "núcleos" y b) una fracción denominada "membranas".

La naturaleza del compuesto orgánico sintetizado a partir de (^3H) dCTP parece ser el mismo ya sea aislada a partir de linfocitos entero, "núcleos" o "mem-

branas" (Fig. 18).

Cabe mencionar que si bien es cierto que la denominación propuesta como "núcleos" y "membranas" es parcialmente arbitraria ya que la pureza de la fracción nuclear sólo fue verificada por el microscopio óptico y no fueron determinadas enzimas marcadoras de las fracciones mencionadas, los resultados obtenidos posteriormente apoyarían esta nomenclatura. Por otra parte, aún para el CDP diglicérido, cuya síntesis ha sido exhaustivamente estudiada desde hace ya bastante tiempo, hay publicaciones contradictorias en lo que respecta al sitio subcelular de síntesis. En plantas, la CDP diglicérido sintetasa está localizada en el retículo endoplásmico y en la membrana mitocondrial (Doule et al, 1972). En corazón bovino e hígado de rata su localización es preferentemente mitocondrial (Vosbeck y Martin, 1970); en cambio en hígado de cobayo (Carter y Kennedy, 1966) e hígado de rata (Van Golde et al, 1974), se encontraría en el retículo endoplásmico, más aún, Thompson (1975) la halló localizada en el núcleo de neuronas de conejo.

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que los ensayos de actividad de esta enzima pueden ser difíciles de interpretar, en primer lugar debido a los niveles endógenos de ácido fosfatídico, inositol, nucleósidos trifosfatos y enzimas que degraden al producto, y en segundo lugar, debido al estado físico del sistema de ensayo, siendo un ejemplo la concentración variable de lipoproteínas (Dawson 1966, Thompson, 1975).

Todas estas variables podrían explicar las distintas localizaciones enzimáticas propuestas para los diferentes tejidos ensayados.

Sin embargo, es también posible que exista verdadera diferencia entre las distintas especies en la localización de por lo menos alguna de las enzimas del metabolismo de los fosfolípidos.

Los resultados de las Tablas XVII y XVIII sugerirían además, que la enzima (o enzimas) es capaz de utilizar también al CTP como precursor pero que en linfocitos estimulados por PHA se encontraría aumentada la afinidad por el deoxiderivado.

II) Síntesis *in vivo* de fosfatidil-dCMP

La demostración de la síntesis *in vitro* del fosfatidil-dCMP no permitía inferir que dicha reacción tuviera lugar también *in vivo*. En efecto, era posible que las condiciones de permeabilización de las células al producir notables deformaciones estructurales en las mismas (FotosAyB), "relajaran" de alguna manera la especificidad de la enzima CTP-fosfatídico-citidiltransferasa permitiendo también la utilización del dCTP.

Cualquier especulación entonces sobre el rol fisiológico del fosfatidil-dCMP debía previamente contar con la demostración de su formación *in vivo*.

Los primeros experimentos realizados *in vivo* utilizando el nucleósido (^3H)-dC como precursor no fueron demasiado concluyentes, ya que si bien se demostró que nuevamente se formaban dos productos, la radioactividad incorporada y extraíble por solventes orgánicos, si bien detectable, era muy pequeña (Fig.19). El análisis cromatográfico del producto lipídico (Fig. 20) reveló similitud entre los productos sintetizados *in vivo* e *in vitro*. Es interesante comparar las incorporaciones obtenidas en el precipitado (DNA) y en la fracción soluble en cloroformo-metanol (fosfatidil-dCMP) cuando el experimento se realiza *in vitro*, con células permeabilizadas y (^3H) dCTP como precursor, o *in vivo* con linfocitos intactos y (^3H)dC como precursor (Fig. 6 y 19). En el primer caso, la formación de fosfatidil-dCMP es mucho mayor que la de DNA, mientras que *in vivo* dicha relación se invierte.

En el curso de intentos realizados para modificar el metabolismo fosfolípidos de la célula, se halló que el agregado de clorpromazina (CPZ) incrementaba notablemente la incorporación de (^3H)-dC en un producto extraíble por solventes orgánicos (Fig. 21). Este efecto fue observado no sólo en linfocitos estimulados por PHA (linfocitos T) y en reposo, sino también en linfocitos de la serie B transformados por virus de Epstein-Barr (líneas HRIK y Raji "S") y de una leucemia prolinfocítica. Estos resultados ofrecen considerable interés, ya que

la droga ensayada tiene uso terapéutico, habiéndose demostrado que en los pacientes tratados largo tiempo con la misma, se produce fosfolipidosis (Brindley et al, 1975).

El compuesto sintetizado en presencia de CPZ utilizando (^{14}C)-glicerol y (^3H) dC como precursores radioactivos dio lugar a un compuesto con doble marca de (^{14}C) y (^3H). La hidrólisis alcalina de este compuesto arrojó como productos (^{14}C) glicerol-P y (^3H) dCMP, (Fig. 25) en forma similar a lo ocurrido con el compuesto sintetizado in vitro. En base a esta evidencia es posible afirmar que el producto obtenido in vivo en presencia de CPZ es también fosfatidil-dCMP, si bien es cierto que el contenido de ácido grasos puede ser diferente.

Con respecto a la observación realizada de que la síntesis in vitro de fosfatidil-dCMP es mucho más importante que la síntesis in vivo al final de este trabajo se propone una posible explicación.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren fuertemente que el fosfatidil-dCMP actuaría como un intermediario en la síntesis de fosfatidil-inositol (PI). Los datos mostrados en la Tabla XX demuestran que la presencia de inositol modifica la incorporación de (^3H) dCTP o (^3H)dC de diferente manera. La inhibición obtenida in vitro en diversas condiciones osciló entre el 80 y 94%, mientras que in vivo sólo fue del 20-30%. La utilización del fosfatidil-dCMP sintetizado in vitro es demostrada en la Fig. 26, observándose que el agregado de inositol desplaza la radioactividad incorporada en el fosfatidil-dCMP por probable formación de PI, ya que cuando se marca con (^{14}C) glicerol in vivo e in vitro aparece (^{14}C)-PI. Los resultados expuestos en la Tabla XXII demuestran que la relación (^{14}C) fosfatidil dCMP/(^{14}C)-PI es mayor in vitro que in vivo en presencia de CPZ; cuando el experimento in vivo se realiza en ausencia de CPZ, dicha relación es menor (Tabla XXIII).

En la Fig. 32 se propone una hipótesis que explicaría los resultados obtenidos.

In vitro el dCTP reaccionaría con el ácido fosfatídico para formar fosfatidil-dCMP. Para dar lugar a la formación de PI se requiere inositol, pero la con-

centración intracelular del mismo estaría sumamente disminuída por efecto de la permeabilización. Estos fenómenos conducirían a la acumulación de fosfatidil-dCMP.

In vivo, por el contrario, el fosfatidil-dCMP formado a partir de la (³H) dC reaccionaría rápidamente con el inositol libre intracelular dando origen al PI. El fosfatidil-dCMP sería así velozmente consumido in vivo explicando los bajos niveles detectados.

SINTESIS DE FOSFATIDIL-dCMP EN LINFOCITOS HUMANOS

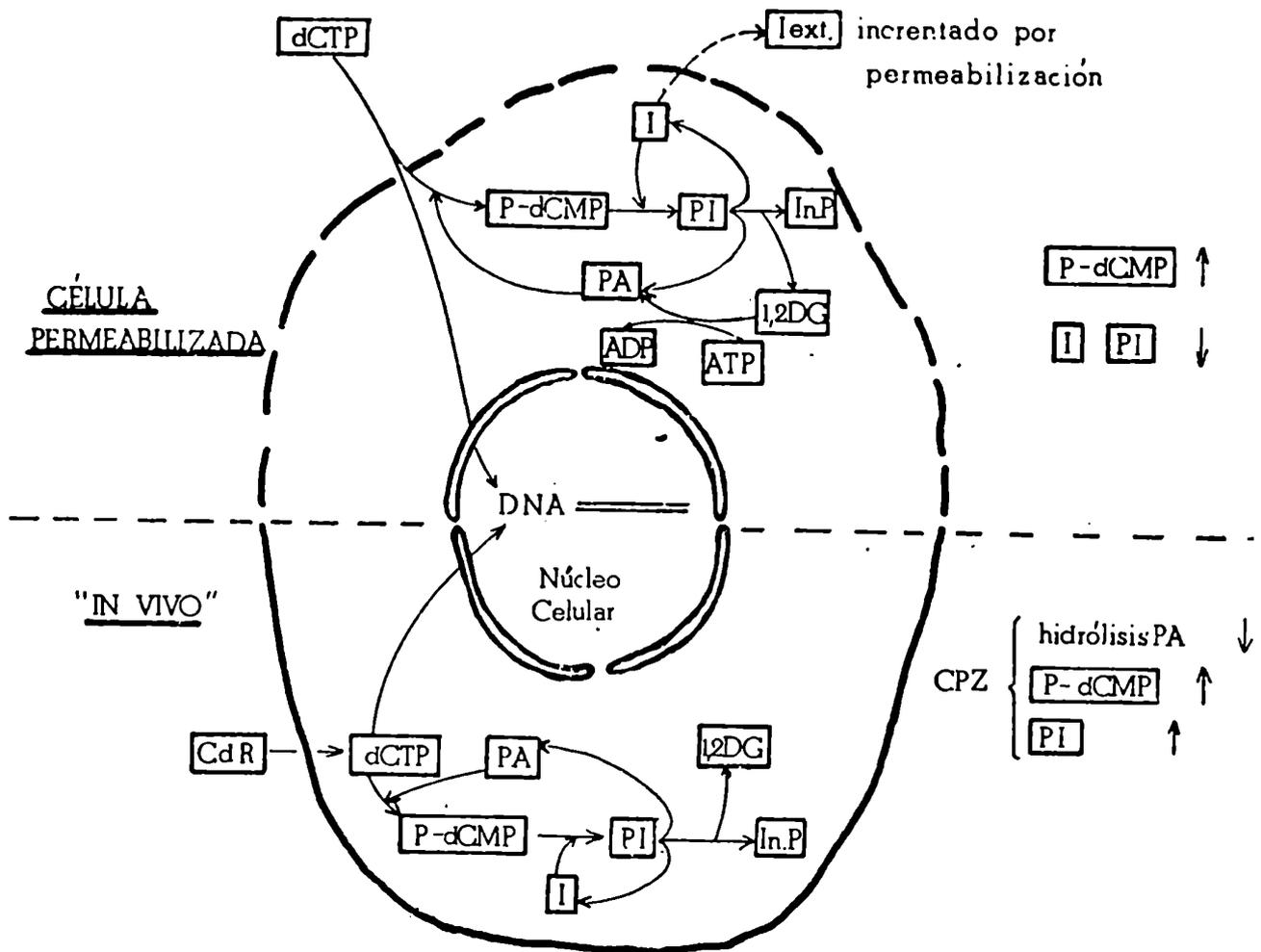


Fig. 32. "Síntesis *in vivo* e *in vitro* de Fosfatidil-dCMP"

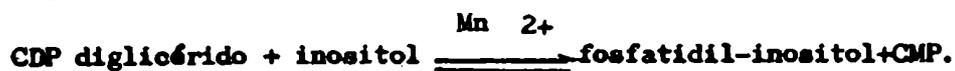
dCTP; deoxicitidina 5' trifosfato
 CdR; deoxicitidina
 P-dCMP; fosfatidil-dCMP
 PI; fosfatidil-inositol
 DNA; ácido desoxirribonucleico

InP; fosforil-Inositol
 CPZ; clorpromazina
 PA; ácido fosfatídico
 1,2DG; 1,2 diglicérido

Los resultados obtenidos por incubación in vivo o in vitro con Fosfolipasa C ofrecen considerable interés. Las fosfolipasas son enzimas hidrolíticas capaces de romper en sitios específicos moléculas de fosfolípidos. Los datos obtenidos aportarían evidencia respecto a la posible ubicación en la membrana plasmática del fosfatidil-dCMP ya que la estimulación en la incorporación observada in vivo (Tabla XXI) no se debería por ejemplo al transporte aumentado de nucleósidos, ya que el mismo resultado se observa in vitro donde dicho fenómeno es inespecífico. Como se supone que estas enzimas no son permeabilizadas por la célula, su acción sobre membranas intactas está restringida a la superficie externa (Bergelson y Barsukor, 1977; Zwaal et al, 1973).

La preincubación con ácido araquidónico estimuló la incorporación de (³H) dC a fosfatidil-dCMP y a una fracción que tenía el mismo R_f que el fosfatidil-inositol. La relación de marca para ambos picos fue de 0.77, siendo este valor semejante al obtenido por incubación in vivo en presencia de CPZ. Los resultados obtenidos permiten suponer una mayor afinidad de la enzima por las moléculas de ácido fosfatídico enriquecidas en ácido araquidónico, así como una acumulación del producto obtenido en esas condiciones.

Cabe mencionar que otros autores han demostrado la semejanza en el perfil de los ácidos grasos entre el CDP diglicérido y el PI (Thompson y Mc Donald, 1975; Thompson, 1977). Estos autores postulan que este hecho podría deberse a sucesivas deacilaciones y reacilaciones del liponucleótido y del PI. Otra explicación a este hecho sería que el CDP diglicérido proviene por lo menos en parte, de la reacción inversa de síntesis de fosfatidil inositol (Hokin-Neaverson, 1977, Agranoff, 1958).



El estudio del efecto de la droga arabinosil-citosina (ara-c) demostró que era capaz de inhibir la síntesis in vivo de fosfatidil-dCMP estimulada por clorpromazina. Debido a que los ácidos nucleicos son participantes activos en el desarrollo de ciertas enfermedades como ser infecciones virales y el crecimiento

de tumores se comenzó a usar bases purínicas y pirimidínicas sintéticas así como sus nucleósidos para el tratamiento de las mismas, siendo el ara-C uno de los análogos más empleados.

El resultado obtenido permitiría demostrar un nuevo mecanismo de la droga ya que la misma sería transformada en fosfatidil-AraCMP. Es interesante mencionar que Mordoh y Fridlender sospecharon la presencia de un compuesto lipídico (fig. 4) porque en el gradiente de ClCs aparecía además de DNA radioactivo, un pico que bandeaba en la zona más liviana. Un resultado similar fue obtenido por Graham y Whitmore (1970) cuando estudiaron la incorporación de (^3H)-AraC en células L de ratón mediante un gradiente alcalino de sacarosa. Dichos autores observaron también un pico de radioactividad en la zona liviana aunque lo atribuyeron al (^3H) Ara C incorporado a RNA que fue parcialmente degradado por el tratamiento alcalino.

Como conclusión, es necesario mencionar que es difícil todavía asignar un rol definitivo al compuesto descrito en este trabajo; el fosfatidil-dCMP. Si bien ha demostrado ser por lo menos parcialmente transformado en PI, será necesario estudiar en linfocitos humanos la posible síntesis de su análogo el fosfatidil CMP pero fundamentalmente será necesario establecer si ambos son sintetizados in vivo, cual de los dos es fundamental en la biosíntesis de los fosfolípidos celulares. También será necesario estudiar su distribución subcelular in vivo mediante un método que no altere la membrana plasmática como el usado en este trabajo para el estudio del compuesto in vitro. Este último punto será de fundamental importancia debido al rol de la membrana celular como sitio de iniciación de todos los procesos que conducen a la transformación y división celulares, así como por las interacciones que ejerce la misma con elementos del citoesqueleto (Moore et al, 1978). En efecto, de los diversos mecanismos que controlan la organización de la superficie celular, uno de los más interesantes es el que postula la existencia de efectos transmembranosos ejercidos a través de estructuras citoplasmáticas organizadas (Nicolson, 1976). Al respecto, es importante mencionar el rol que ejerce la droga clorpromazina sobre el sistema

de microtúbulos (Rao, 1978) así como el efecto estimulador que demostró sobre la síntesis de fosfatidil-dCMP siendo importante por lo mencionado más arriba estudiar si ambos fenómenos están relacionados entre sí.

Por otra parte, como la membrana nuclear es considerada una prolongación del retículo endoplásmico, será importante determinar si el "pool" del fosfatidil-dCMP es distinto o no del hallado en otros sitios de la célula así como estudiar si tiene algún rol en otros procesos celulares descritos para los fosfolípidos. Un ejemplo de esto último sería el hecho de ser considerados elementos involucrados en el mantenimiento de la integridad de los complejos de alto peso molecular del factor de elongación EFl_h en células de eucariotes (Lugocki y Weissbach, 1974).



BIBLIOGRAFIA

- Agranoff, B.W., Bradley, R.M. and Brady, R.O., (1958a) *J. Biol. Chem.* 233: 1077.
- Agranoff, B.W. and Bradley, R. (1958, b). *Federation Proc.* 17, 179.
- Agranoff, B.W., and Bradley, R.M., and Brady, R.O. (1958). *J. Biol. Chem.* 233: 1077.
- Allan, D. and Michell, R.H. (1974) *Biochem. J.* 142: 591.
- Allan, D. and Mitchell, R.H. (1975) *Biochem. J.* 148: 471.
- Allan, D., Low, M.G., Finean, J.B. and Mitchell, R.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 413: 309.
- Ambros, R.T. and Pieringer, R.A. (1973) in *Form and Function of Phospholipids* (Ansell, G.B., Hawthorne, J.N. and Dawson, R.M. p 289-331. Elsevier, Amsterdam.
- Andersson, J., Edelman, G.M., Moller, G. and Sjöberg, O. (1972). *Eur. J. Immunol.* 2: 233.
- Baserga, R. 1976. *Multiplication and Division in Mammalian Cells*. New York; Marcel Decker, 239 p.
- Barnett, R.E., Scott, R.E., Furcht, L.T. and Kerskey, J.H. (1974) a, *Nature*, 249: 465.
- Barnett, R.E., Furcht, L.T. and Scott, R.E. (1974) b. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 1992.
- Blaustein, M.P. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* 135: 653.
- Bazan, N.G., Ilinchita de Boscherio, M.G. and Giusto, N.M. (1977) in *Function and Biosynthesis of Lipids*. Ed. N. Bazán, R. Brenner and N. Giusto. *Advances en Exp. Med. and Biol.* 83: 377

- Bergelson, L.D. and Barsukov, L.I. (1977) *Science* 197: 224.
- Betel, I. and van den Berg, K.J. (1972) *Eur. J. Biochem*, 30: 571.
- Brindley, D.N. and Bowley, M. (1975) *Biochem. J.* 148: 470.
- Brindley, D.N., Allan, D. and Michell, R.H., (1975). *J. Pharm. Pharmac.* 27: 462.
- Brindley, D.N., Allan, D. and Michell, R.H. (1975). *J. Pharm. Pharmac.* 27: 462.
- Brindley, D.N., Bowley, M. Graham Sturton, R., Haydn Pritchard, P. Burditt, S.L. and Cooling, J. (1977), *Bioch. Soc. Trans.* 5: 40.
- Carminatti H., Passeron, S., Dankert M. and Reconds E. (1965) *J. of Chromat.* 18: 342.
- Carter, J.R., and Kennedy, E.P. (1966) *J. Lipid. Res.* 7: 678.
- Castellot, J.J., Miller, M.R., and Pardee, A.B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 351.
- Chu, M.Y., and Fischer, G.A. (1968) *Biochem. Pharmacol.* 17: 753.
- Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., South, M.A. and Good, R.A. (1966) *J. Exp. Med.* 123: 75.
- Crumpton, M.J., Allan, D., Auger, J. Green, M.M. and Maino, V.C. (1975) *Phil. Trans. Roy. Soc. LOND. B.* 272: 173
- Daleo, G.R., Piras, M.M. and Piras, R. (1974) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 61: 1043.
- Dawson, R.M.C. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 33: 68.

- Dawson, R.M.C. (1966) in *Essays in Biochemistry* (Campbell P.N. and Greville, E.D. ed.) vol. 2 p. 69-115. Academic Press, N. York.
- Dawson, R.M.C. and Hauser, H. (1970). In *Calcium and Cellular Function* p. 17-41. Ed. Cuthbert, A.N. London. Macmillan.
- De Petris, S. and Raff, M.C. (1971) *J. Cell. Sci.*
- De Petris, S. 1975. *J. Cell. Biol.* 65: 123.
- Diamantstein, T. and Ulmer, A. (1975) *Immunol.* 28: 121.
- Di George A.M. (1968). In *"Birth Defects, Immunologic Deficiency Diseases in Man*, p. 116. Nat. Found. March of Dimes, New York.
- Doule, R., Manella C.A., and Bönner, W.D. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49: 1504.
- Eichberg, J. and Hauser, G. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 60: 1460.
- Evans, N.H. (1977). *Preparation and Characterization of Mammalian plasma membranes. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Work and Work Ed.*
- Feinstein, M.B. (1964) *J. Gen. Physiol.* 48: 357.
- Ferber, E. and Resch, K. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, 296: 335.
- Fisher, D.B. and Mueller, G.C. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 60: 1396.
- Fischer, D.B. and Mueller, G.C. (1969) *Biochi, Biophys. Acta* 176: 316.
- Fisher, D.B. and Mueller, G.C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 248: 434.
- Ford, C.E., Micklen, H.S., Evans, E.P., Gray, J.C. and Ogden, D.A. (1966). *Ann. N.Y. Acad. Sci* 129: 283.

- Freedman, M.H., Raff., M.C. and Gompertz, B. (1975) *Nature* 225: 378.
- Freinkel, N., El Younsi, C. and Dawson R.M.C. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59: 245.
- Fridland Arnold (1977, a) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74: 72.
- Fridland Arnold (1977, b). *Biochem.* 16: 5308.
- Fridlender, B.R., Medrano. E, and Mordoh, J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71: 1128.
- Graham, F.L., and Whitmore, G.F. (1970). *Cancer Res.* 30: 2636.
- Grasbeck, R., Nordman, C. y de la Chapelli, A. (1963) *Lancet*, 2: 385.
- Greaves, M.F. and Bauminger, S. (1972,a). *Nature new biol.* 235: 67.
- Greaves, M.F. and Janossy, G. (1972, b). *Transplant. Rev.* 11, 87.
- Gliek, B., Chang, T.S. and Jaap, R.C. (1956) *Poult. Sci* 35: 224.
- Hardy, D.A. and Ling, N.R. (1969), *Nature* 221: 545.
- Hardy, D.A., Knight, S. and Ling, N.R. (1970) *Immunol.* 19: 329.
- Harrison, R. and Lunt G (1975) *Biological Membranes* Edit. Blackie England.
- Hart, D.A. (1978) *Exptl. Cell. Res.* 113: 139.
- Hauser, G. and Eichberg, J. (1975) *J. Biol. Chem* 250: 105.
- Hinman, N.D. and Cann, J.R. (1976) *Mol. Pharmacol.* 12: 769.
- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R. and Tomkins, G.M. (1971) *Nature New Biol.* 232: 206.
- Hokin, L.E. and Hokin, M.R. (1963) *Biochim., Biophys. Acta* 67: 470.

- Hokin-Neaverson, M. (1977) in *Function and Biosynthesis of Lipids* Ed. N. Bazán, R. Brenner and N. Giusto. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 83: p. 429.
- Hülser, D.F. and Peters, J.H. (1972) *Exp. Cell. Res.* 74: 319.
- Inbar, M. and Schinitzky, M. (1975) *Eur. J. Immunol.* 5: 166.
- Katz, D.H. (1977) in *Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation*, ed. Dixon and Kunkel, Academic Press, New York, pág. 247.
- Kay, J.E. (1971) *Exptl. Cell. Res.* 68: 11.
- Kessel, D. Hall, T.C. and Wodinsky, I. *Science* 156: 1240.
- Kirchner, H. and Rühl, H. 1970. *Exptl. Res.* 61: 229.
- Kornberg, A. (1974) *DNA Synthesis*, San Francisco, Calif. Freeman, p.226.
- Krishnaraj, R., and Taluar, G.P. (1973) *J. Immunol.* III: 1010.
- Lapetina, E.G. and Michell, R.H. (1973) *Biochem. J.* 131: 433.
- Lindahl-Kissling, K. (1972) *Exp. Cell. Res.* 70: 17.
- Ling, N.R. and Kay, J.E. (1975) *Lymphocyte stimulation*, North Holland, Amsterdam.
- Lischner, H.N. and Di George, A.M. (1969) *Lancet* 2: 1044.
- Loeb, L. (1974) in *Molecular Analysis of Lymphocyte Transf. Monograph. of The Fox Chase Center for Cancer and Medical Sciences, University of Pennsylvania School of Medicine.*
- Loor, F. (1973) *Exp. Cell. Res.* 82: 415.
- Loor, F. (1974) *Eur. J. Immunol.* 4: 210.
- Lugocki, A.B., Redfield, B., Liu, C. k., and Weissbach, H. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 2179

- Magee, W.L., Berry, J.F., Strickland, K.P. and Rossiter, R.J. (1963) *Biochem. J.* 88: 45.
- Maino, V.C., Hayman, MA and Crumpton, M.J. (1975).
- Mazzei, D., Novi, C. y Bazzi, C. 1966. *Lancet* II: 233.
- Masuzawa, Y. Osawa, T., Inoue, K. and Nojima, S. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 326: 339.
- Mc Canan, R.E. and Finnerty, W.R. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 5074.
- Medrano, E., Piras, R. and Mordoh, J. (1974) *Exptl. Cell. Res.* 86: 295.
- Michell, R.H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81.
- Michell, R.H., Allan, D. Bowley, M. and Brindley D.N. (1976) *J. Pharm. Pharmac.* 28: 331.
- Michell, R.H., Jafferji, S.S. and Jones, L.M. (1976) *FE Bs Lett.*69: 1.
- Michell, R.H., Jaferji, S.S. and Jones, L.M. in *Function and Biosynthesis of Lipids* Ed. N. Bazán, R. Brenner and N. Giust. *Advances in Exp. Med. and Biol.* 83: 447.
- Moore, P.B., Ownby C.L., and Carraway, K.L. (1978) *Exp. Cell. Res.* 115: 331.
- Mordoh, J. and Fridlender, B. (1977) *Molec. and Cell. Bioch.* 16: 177.
- Nicolson G.L. (1972) *Nature New Biol.* 239: 193.
- Nicolson, G.L., 1976. *Biochim. Biophys. Acta* 457: 57.
- Noonan, K.D. and Burger, M.M. (1973) *J. Cell. Biol.* 59: 134.
- Novogrodsky, A. and Katchalski, E., 1971. *Febs. Letters*, 12: 297.

- Novogradsky, A. (1974) *Nature*, 250: 788.
- Nowell, P.C., 1960, *Canc. Res.* 20: 462-466.
- Oliver, J.M., Zurer, R.B. and R.D. Berlin (1975) *Nature* 253: 471.
- Olmsted, J.B. and Borisy G.G. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* 42: 507.
- Overath, P. and Trauble, H. (1973) *Biochemistry*, 12: 2625.
- Palladini, A.C. and Leloir, L.F. (1952) *Biochim. J.* 51: 426.
- Palmer, F.B. St. C (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 326: 194.
- Paulus, H., and Kennedy, E.P. (1960) *J. Biol. Chem.* 235: 1303.
- Pauly, J.L., Caron, G.A. and Suskind, R.R. 1969. *J. Cell. Biol.* 40: 847.
- Poste, G., Papahadjopoulos, D., and G.L. Nicolson. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 4430.
- Preem Veer Reedy, G., and Mathews, C.K. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 3461.
- Raetz, C.R.H. and Kennedy, E.P. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 1098.
- Raetz, C.R.H., Chu, M.Y., Sprinaslara, S.P. and Turcotte, J.P. (1978). *Science* 196: 303.
- Raff M.C., and Di Petris S. in *Control of Proliferation of Animal Cells* Clarckson, B. and Baserga, R. eds. Cold Spring Harbour Press, New York, p. 237.
- Rama-Reddy, G.V., Goulian, M. and Hendlers, S.S. (1971) *Nature (London) New Biol.* 234: 286.
- Ras, A.G., and Cann. J.R. (1978) *Federation Proc.* 37 : 1352

- Resch, K., Gelfand, E.W., Hansen, K. and Ferber, E. (1972) *Eur. J. Immunol.*, 2: 599.
- Resch, K. and Ferber, E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27: 153.
- Resch, K., Ferber, E. and Gelfand, E.W. (1973). *Proc. seventh leucoc. cult. conf. Academic Press, New York and London*, p. 75.
- Resch, K. (1976) in *Receptor and Recognition*. Cuatrecasas P. and Graves, M.F. Vol. I. Chapman and Hall.
- Rosemann, S. (1970) *Chem. Phys. Lipids*, 5: 270.
- Rosensteich, D.L. and Witten, J.M. (1975) *Proc. ninth leucoc. cult. conf. Immune Recognition. Acad. Press*, p. 113.
- Rutishauser, V. and Sachs, L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 2456.
- Ryan, G.B., Unanue, E.R. and Karnovsky, M.J. (1974) *Nature (Lond)* 250: 56.
- Schnitzky, M. and Inbar, M. (1974). *J. Mol. Biol.* 85: 603.
- Sharon, N. 1976. *Lectins as mitogens in Mitogens in Immunobiology*. J.J. Oppenheim and D.L. Rosenstreich ed. Academic Press. New York.
- Snyder, J.A. and Mc Intosh J.R. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45: 699.
- Sundler, R. and Akesson, B. (1977) *Bioch. Soc. Trans.* 5: 42.
- Taylor, R.B., Duffus, W.P.H., Raff, M.C. and de Petris, S. (1971) *Nature New Biol.* 233: 225.
- Ter Schegget, J. Van den Bosch, Van Bask, M.A. Hostetler, K.Y. and Borst, P. (1971). *biochim.Biophys. Acta* 239: 234.

- Thompson, G.A. (1973) in *Form and Function of Phospholipids*. (Ansell, G.B. Hawthorn, J.N. and Dawson, R.D. ed. p. 67. Amsterdam.
- Thompson, R.J. (1974) *Febs Letters* 49: 223.
- Thompson, R.J. (1975) *J. of Neuroch.* 25: 811.
- Thompson, R.J. (1977). *Biochemical Society Transactions* 5: 49.
- Thompson, W. (1967). *Can. Biochem.* 45: 853.
- Thompson, W. and Mc Donald, G. (1975) *J. Biol. Chem* 250: 6779.
- Thompson, W. and Mac Donald, G. (1976). *Eur. J. Biochem* 65: 107.
- Thompson, W. (1977) in *Function and Biosynthesis of Lipids*. Ed. N. Bazan, R. Brenner and N. Giusts. *Advances in Exp. Med. and Bio.* 83: 367.
- Tyson, C.A., Zande, V.H., and Green, D.E. (1976) *J. Biol. Chem.* 251: 1326.
- Unanue, E.R. and M.J. Karnovsky (1973) *Transplant. Rev.* 14: 184.
- van den Bosch, H. (1974) *Ann. Rev. Biochem* 43: 243.
- Van Golde, L.M.G., Raben, J., Batenburg, J.J., Fleischer, B. Zambrano, F. and Fleischer, S. (1974) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 40: 901.
- Vorbeck, M.L. and Martin A.P. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 40: 901.
- Warner, N.L., Szenberg, A., and Burnet F.M. (1962) *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40: 373.
- Wedner, H.J., and C.W. Parker, 1976. *Prog. Allergy* 20: 195.
- Whitney, R.B. and Sutherland, R.M. (1972) *J. Cell. Physiol.* 80: 329.
- Wilson, G. and Fox, C.F. (1971) *J. Mol. Biol.* 55: 49.

Yahara I., and Edelman G.M. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci 70: 1442.

Yahara, I. and Edelman G.M. (1975) Annals fo the New York. Academic of Sciences.

Yahara, I. and F. Kakimoto-Sameshima (1978) Cell 15: 251.

Yin, H.H., Ukena, Th. E. and Berlin, R.D. (1972), Science 178: 867.

Yoshinaga, M, Waksman, B. and Malawista S.E. (1972) Transplant. Proc. 4: 325.