

Tesis de Posgrado

Regulación por nucleótidos cíclicos y hormonas del transporte de aminoácidos en células de tumor ascítico Ehrlich

Salceda, Susana

1990

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:

Salceda, Susana. (1990). Regulación por nucleótidos cíclicos y hormonas del transporte de aminoácidos en células de tumor ascítico Ehrlich. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2321_Salceda.pdf

Cita tipo Chicago:

Salceda, Susana. "Regulación por nucleótidos cíclicos y hormonas del transporte de aminoácidos en células de tumor ascítico Ehrlich". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2321_Salceda.pdf


EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires


UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULACION POR NUCLEOTIDOS CICLICOS Y HORMONAS DEL
TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN CELULAS DE TUMOR
ASCITICO EHRlich**

SUSANA SALCEDA

DIRECTOR DE TESIS: DRA EUGENIA H. RAMOS

LUGAR DE TRABAJO: DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1990

2321
ef 2

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Eugenia H. Ramos por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la investigación, por su orientación y la confianza depositada en mí durante la dirección de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo económico brindado a través de las becas y junto con la Universidad de Buenos Aires por los subsidios otorgados.

A la Dra Ana María Stella por su preocupación y tiempo dedicado como consejera de Estudio.

A la Dra Lucía Conches de Bongioanni con quien comencé el trabajo de laboratorio, por su disposición a enseñarme, en particular a observar y desconfiar.

Al Dr Natalio Kotliar por su permanente estímulo y con quien mantuve diálogos abiertos y sinceros.

A la Dra Mirta Flawlá por su colaboración en las determinaciones de AMPcíclico.

A la Dra Irene Vacas por su invaluable ayuda en la realización de los ensayos de receptores y principalmente por su calidez personal

A mis compañeros del laboratorio 5, María Susana Acciaresi, Isabel Burgos y Carlos Stella por los momentos compartidos que hicieron que todo resultara más fácil y placentero

A la Dra María Susana Acciaresi por su amistad.

A la Sra Isabel Burgos de Swit por su asistencia técnica en el trabajo de laboratorio.

A la Sra Irene Blasón de López por su disposición y eficiencia en la preparación del material de laboratorio.

Al Sr Hector Cabrera por la colaboración proporcionada durante los primeros años de trabajo.

Al Dr A. C. C. Frasch por permitirme el uso de su computadora para la corrección e impresión de la tesis.

Al Dr Daniel Sánchez por su dedicación y eficiencia en el procesamiento e impresión del texto.

A mis padres y hermana Adriana, por estar siempre a mi lado brindándome su afecto y apoyo.

A Roberto Macina cuyo estímulo y colaboración fue fundamental para la culminación de este trabajo.

A mis padres
A mi hermana Adriana

A mi esposo Roberto
A mi hija Verónica

Abreviaturas

AMPc o AMPcíclico	3',5' monofosfato de adenosina.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
Hepes	ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfónico.
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
Trizma base	Tris [hidroximetil]aminometano.
PPO	2,5-difeniloxazol.
POPOP	1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]benceno.
SSE	solución salina de Earle.
α -AIB	ácido α -aminoisobutírico.
α -MeAIB	ácido α -metilaminoisobutírico.
TCA	ácido tricloroacético.
PBS	amortiguador fosfato salino.
DHA	dihidroalprenolol.
ADN	ácido desoxirribonucleico.
ARN	ácido ribonucleico.
$V_{m\acute{a}x}$	velocidad máxima de entrada para un aminoácido por un sistema dado.
K_m	concentración de un aminoácido necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de entrada por un sistema dado.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

INDICE

INTRODUCCION	1
1.1 Células de tumor ascítico Ehrlich.....	2
1.1.1 Carcinoma de Ehrlich. Su transformación en tumor ascítico.....	2
1.1.2 Mecanismos de conversión de un tumor sólido en ascítico.....	3
1.1.3 Definición de tumor ascítico.....	4
1.1.4 Características generales del tumor ascítico Ehrlich.....	5
1.2 La membrana citoplasmática: barrera natural del pasaje de nutrientes.....	6
1.3 Sistemas de transporte de aminoácidos en células animales. Especificidad de los sistemas.....	7
1.3.1 Sistemas de transporte para aminoácidos neutros.....	10
1.3.1.1 Sistemas Na ⁺ -dependientes.....	10
1.3.1.2 Sistemas Na ⁺ -independientes.....	12
1.3.2 Sistemas de transporte para aminoácidos catiónicos.....	14
1.3.3 Sistemas de transporte para aminoácidos aniónicos.....	14
1.3.3.1 Sistemas Na ⁺ -dependientes.....	14
1.3.3.2 Sistemas Na ⁺ -independientes.....	15
1.3.4 Sistema de la γ -glutamiltanspeptidasa.....	15
1.4 Mecanismos de regulación de los sistemas de transporte.....	17
1.5 Regulación hormonal de los sistemas de transporte.....	18
1.6 Mecanismo de regulación adaptativa.....	23
1.6.1 Desrepresión del transporte de aminoácidos.....	24
1.6.2 <i>Trans</i> -inhibición, represión de la actividad de transporte.....	26
1.6.3 Modelos moleculares de la regulación adaptativa.....	27
1.6.4 Importancia fisiológica de la regulación adaptativa.....	29
1.7 Avances y perspectivas.....	30
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y METODOS	35
11.1 Células de tumor ascítico Ehrlich.....	36
11.1.1 Animales de experimentación.....	36
11.1.2 Origen de las células TAE.....	36

II.1.3	Técnica de transplante de las células tumorales.....	36
II.1.4	Obtención de las células TAE para la realización de los ensayos.....	37
II.1.5	Suspensión celular de trabajo: Correlación entre número de células y peso seco.....	37
II.1.6	Coloración vital.....	37
II.1.7	Técnicas de incubación.....	38
II.1.8	Ensayos de incorporación de [¹⁴ C] aminoácidos.....	38
II.1.8.1	Determinación de la radiactividad en las muestras.....	38
II.1.8.2	Determinación cromatográfica de metabolitos de L-leucina y L-alanina.....	39
II.1.9	Ensayos de salida.....	39
II.1.10	Medida de la concentración intracelular de AMP cíclico.....	40
II.1.10.1	Método de radioinmunoensayo.....	40
II.1.10.2	Método de la proteína quinasa.....	40
II.1.11	Medida del contenido endógeno de aminoácidos.....	41
II.1.12	Medida del contenido de [¹⁴ C] aminoácido incorporado a proteínas.....	42
II.1.13	Determinación de proteínas.....	43
II.1.14	Determinación de glucosa.....	43
II.1.15	Caracterización de receptores β-adrenérgicos.....	43
II.1.15.1	Preparación de membranas citoplasmáticas.....	43
II.1.15.2	Ensayos de ligado de (-) [³ H] dihidroalprenolol.....	44
II.2	Fibroblastos normales y transformados en cultivo.....	44
II.2.1	Origen de las líneas celulares de fibroblastos.....	44
II.2.2	Mantenimiento de las líneas celulares.....	45
II.2.3	Preparación de las células para los ensayos.....	45
II.2.4	Técnica de incubación.....	45
II.2.5	Medida de la entrada de [¹⁴ C] aminoácidos.....	45
II.2.6	Medida de la concentración de proteínas.....	46
II.3	Origen y calidad de las drogas utilizadas.....	47
	RESULTADOS	48
III	Características generales del tumor ascítico Ehrlich.....	49

IV Sistemas de transporte en células TAE.....	51
IV.1 Caracterización del sistema L de transporte.....	51
IV.1.1 Estudio del proceso de incorporación de L-leucina.....	51
IV.1.2 Incorporación de L-leucina en proteínas.....	51
IV.1.3 Estudio del proceso de entrada de L-leucina.....	53
IV.1.4 Determinación de los parámetros cinéticos.....	55
IV.2 Caracterización del sistema A de transporte.....	55
IV.2.1 Estudio del proceso de incorporación.....	55
IV.2.2 Incorporación de los aminoácidos del sistema A en proteínas.....	60
IV.2.3 Estudio del proceso de entrada.....	61
IV.2.4 Determinación de los parámetros cinéticos.....	62
IV.3 Identificación de los sistemas de transporte.....	62
V. Efecto de la insulina y glucagón sobre el transporte de aminoácidos en células TAE.....	65
V.1 Efecto de la insulina sobre la actividad del sistema L y del sistema A.....	65
V.1.2 Relación entre el efecto de la insulina sobre la entrada de L-leucina y el tiempo de exposición a la hormona.....	68
V.1.3 Efecto de la insulina sobre el eflujo de L-leucina.....	68
V.1.4 Efecto de la insulina sobre la concentración intracelular de AMPcíclico.....	69
V.1.5 Participación de la síntesis de proteína.....	70
V.1.6 Contenido intracelular de aminoácidos.....	70
V.2 Efecto del glucagón sobre la actividad de los sistemas A y L.....	71
VI Efecto de catecolaminas sobre el transporte de aminoácidos en células TAE.....	72
VI.1 Niveles endógenos de AMP cíclico en células incubadas con catecolaminas.....	72
VI.2 Caracterización de receptores β -adrenérgicos.....	74
VI.3 Efecto de catecolaminas sobre el transporte de aminoácidos.....	76

VII Mecanismo de regulación adaptativa por ayuno de aminoácidos.....	78
VII.1 Control adaptativo del transporte de aminoácidos en células TAE.....	78
VII.2 Caracterización de los sistemas de transporte en fibroblastos normales y transformados.....	81
VII.3 Control adaptativo de la actividad de los sistemas transportadores de aminoácidos.....	83
VII.3.1 Parámetros cinéticos del sistema L en condiciones de ayuno.....	84
VII.3.2 Parámetros cinéticos del sistema ASC en condiciones de ayuno.....	86
VII.3.3 Parámetros cinéticos del sistema A en condiciones de ayuno.....	86
VII.3.3.1 Efecto de inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas sobre el transporte por el sistema A en fibroblastos normales.....	90
DISCUSION.....	94
CONCLUSIONES.....	111
REFERENCIAS.....	114

INTRODUCCION

1.1 Células de tumor ascítico Ehrlich.

1.1.1 Carcinoma de Ehrlich. Su transformación en tumor ascítico.

A principios de siglo, Ehrlich y Apolant del Instituto de Cancer de Berlín comenzaron la investigación del trasplante de tumores malignos. Estos investigadores pusieron máximo énfasis en la observación de un tumor murino grande y múltiple, de aparición espontánea en la glándula mamaria, el cual fue denominado *carcinoma mamario de Ehrlich* (Ehrlich y Apolant, 1905; Ehrlich, 1907).

En 1930, Loewenthal y Jahn obtuvieron una variante del carcinoma de Ehrlich. Después de la inoculación de ratones con suspensiones de células del carcinoma en forma intraperitoneal, observaron la formación de tumores sólidos, en la mayoría de los casos. En algunos ratones, el comportamiento fue diferente; diez a catorce días después de la inoculación se había formado un gran volumen de ascitis lechosa o sanguinolenta con gran cantidad de células aisladas, sin formación de tumor sólido. Estos investigadores denominaron *tumor ascítico* a esta nueva forma del carcinoma de Ehrlich que se obtenía por pasajes intraperitoneales seriados del exudado peritoneal.

A partir de esta primera descripción, la forma ascítica del tumor fue distribuida a un gran número de investigadores.

En el mismo año, Fisher en Copenhague, mantuvo el carcinoma mamario de Ehrlich en tres formas diferentes: sólida, ascítica y en cultivo de tejidos. Por la misma época, Hans Lettré en Heidelberg, comenzó sus estudios con estas células (Klein, G. y Klein, E., 1956).

En 1948, George y Eva Klein del Instituto Karolinska, convirtieron una línea sólida del carcinoma provista por A. Fisher en la forma ascítica, usada actualmente como el tumor tetraploide ascítico de Ehrlich (Klein y col., 1950; Klein, G. y Klein, E., 1951; Klein, 1955a; Klein, 1955b).

En 1950, Haouschka recibió la línea tetraploide de Klein y en 1953 la línea Heidelberg de Lettré; observó que esta última era hiperdiploide.

Actualmente, la relación entre estos dos tumores tetraploide e hiperdiploide, ambos identificados con el nombre de Ehrlich y originarios aparentemente del mismo lugar, no está totalmente establecida. Sin embargo, esta diferencia no es sorprendente ya que la variabilidad genética en

poblaciones celulares malignas, propagadas durante años en ratones huéspedes genéticamente diferentes, es un hecho muy probable. Este cambio genético no es predecible (Haouschka y Levan, 1953).

Por lo tanto, los tumores ascíticos de Ehrlich mantenidos en numerosos laboratorios pueden ser aún similares al original pero distan de ser idénticos.

1.1.2 Mecanismos de conversión de un tumor sólido en ascítico.

Los neoplasmas de ratones según su capacidad para convertirse en tumor ascítico al ser transplantados, pueden ser clasificados en tres categorías:

- 1) los que crecen rápidamente en la cavidad peritoneal,
- 2) los que crecen como ascitis en forma gradual, luego de un período de adaptación,
- y 3) los que no pueden convertirse.

Para que el tumor sólido se transforme en ascítico, fueron establecidas dos condiciones necesarias aunque no suficientes. Una de ellas es que el tumor sea de crecimiento lento y la otra que tenga un alto grado de anaplasia. La transformación está relacionada con la sobrevivencia de la célula tumoral en la cavidad peritoneal (Klein, 1954).

Los tumores de conversión rápida pueden dividirse en dos grupos; el primero comprende los linfomas, leucemias y algunos sarcomas espontáneos e inducidos. Tienen la característica de crecer en forma ascítica independientemente del número de pasajes; no necesitan adaptación o mutación particular para desarrollarse en el nuevo medio. El segundo grupo comprende los carcinomas y sarcomas como el de Ehrlich, el 37, el 180 y el epiteloma 2146. Se caracterizan por necesitar un gran número de pasajes antes de obtener la forma ascítica.

Mientras que para el primer grupo el mecanismo de selección-mutación queda prácticamente descartado, puede explicar la transformación en el caso del segundo grupo (Klein, 1955a).

Los tumores de transformación gradual han sido ampliamente estudiados (Klein, G. y Klein, E., 1956; Klein, 1954). El número de células tumorales aumenta paulatinamente al aumentar el número de pasajes. Dos mecanismos se han propuesto para explicar lo descripto: 1) mecanismo de selección clonal

y 2) mecanismo de adaptación fisiológica. En el primer caso, la transformación es el resultado del cambio de unas pocas células que sobreviven en las nuevas condiciones, dando como resultado una concentración selectiva de ellas. El segundo caso es un cambio adaptativo fisiológico, inducido por el medio sobre la mayoría de la población.

Numerosos resultados apoyan el mecanismo de selección clonal para explicar el comportamiento de los tumores de transformación gradual.

Los tumores que no pueden convertirse son aquellos que no adquirieron la capacidad para la conversión inmediata, en los cuales la transformación gradual no se pudo lograr con las técnicas empleadas, las que son exitosas con otros neoplasmas. Nada se puede decir acerca del comportamiento futuro de estos neoplasmas; por ejemplo, el tumor de Ehrlich fue inconvertible en los primeros años de estudio.

A este grupo de tumores pertenecen todos los carcinomas y sarcomas de ratón, de crecimiento lento, con pocos trasplantes en su desarrollo. Se puede considerar que el cambio mutacional que permite el crecimiento en la forma ascítica, no ha ocurrido en estos tumores, o que ocurre a tan baja frecuencia que los mutantes se pierden durante el trasplante (Klein, 1954).

1.1.3 Definición de tumor ascítico.

Algunos autores coinciden en que no es adecuado el uso de la expresión *tumor ascítico*, ya que no se trata de un grupo especial de tumores, sino de una forma particular de crecimiento tumoral (Goldie y Felix, 1951).

Dado que las denominaciones de tumor ascítico y forma ascítica de crecimiento tumoral han sido ampliamente aceptadas, se las conserva por razones históricas. Sin embargo, es conveniente restringir la denominación a tumores análogos al ascítico de Loewenthal y Jahn, es decir, al de un tumor en el que la multiplicación activa de células neoplásicas libres y/o formando complejos celulares, se pueda observar en el líquido peritoneal alcanzando una alta concentración absoluta y relativa de células tumorales (Loewenthal y Jahn, 1932).

La suspensión intraperitoneal de células puede considerarse como un cultivo puro (Klein, G. y Klein, E., 1956). Los nutrientes necesarios para su desarrollo son suministrados a través de los vasos peritoneales. El

peristaltismo intestinal y los movimientos del ratón mezclan, continuamente el líquido y las células, de tal manera que no se crean gradientes de difusión y todas las células comparten la misma mezcla de nutrientes, así como también están expuestas a los mismos productos metabólicos. En un tumor totalmente desarrollado, los nutrientes disponibles por célula y por unidad de tiempo, son escasos debido al gran incremento en el número de células.

Esta es una de las principales ventajas que presentan los tumores ascíticos respecto de los sólidos. Las células de los tumores sólidos viven bajo condiciones nutricionales no homogéneas al estar sujetas a gradientes de difusión. Es así que las células que se encuentran cerca de los vasos nutricios están en mejores condiciones que el resto de la población celular. La misma heterogeneidad es aplicable a la distribución de los productos de desechos metabólicos.

1.1.4 Características generales del tumor ascítico Ehrlich.

La suspensión de células del tumor ascítico Ehrlich puede crecer en la cavidad abdominal de diferentes cepas de ratón (Kanematsu, 1953). La inoculación de aproximadamente 1×10^6 células, produce un ascitis en el ratón de 5 a 20 ml en 7 a 14 días; a los 10 días el número total de células es de 8×10^8 . El ratón muere entre la segunda y la sexta semana posterior a la inoculación. Al transmitirse a otros ratones, el éxito del trasplante es del 100 por ciento. La edad del huésped tiene gran influencia en el número de implantes y la velocidad de crecimiento.

La examinación de los fluidos ascíticos muestra un gran número de células tumorales y un porcentaje muy bajo de células no tumorales. Estas últimas son observadas también en fluidos peritoneales normales, su cantidad depende de la cepa de ratón utilizada. Así, en los ratones Suizos albinos se encuentra la menor frecuencia de células no tumorales, 13,4 por ciento, entre ellas, células mesoteliales, histiocitos, linfocitos y polimorfonucleares (Klein, 1951).

Las células Ehrlich presentan un núcleo grande e irregular, con uno o más nucleolos. La relación núcleo/citoplasma es de 0,8 (Selby y col., 1956). El

contenido de ARN, ADN y proteínas es respectivamente de 50, 24 y 200 $\mu\text{g}/10^6$ células (Goldberg y col., 1950; Bassler y De Parmentier, 1977).

El crecimiento de estas células es una función del número total de células libres. A la fase inicial corta de proliferación rápida le sigue una fase de desaceleración de tipo asintótica (Patt y Blackford, 1954; Patt y Straube, 1956). El crecimiento inicial con un inóculo de 10^6 células responde a una función exponencial positiva. Entre el tercer y cuarto día se observa una disminución en la velocidad de crecimiento que continúa hasta la etapa terminal. Durante la fase exponencial, el ciclo mitótico es de 8 horas, uno de los más cortos de células de mamíferos tanto normales como malignas (Defendi y Manson, 1963; Baserga, 1965).

1.2 La membrana citoplasmática: barrera natural del pasaje de nutrientes.

Existen numerosas evidencias que demuestran el papel fundamental de las membranas en la organización de los seres vivos. Las membranas otorgan a las células su individualidad, separándolas del medio que las rodea, controlando así, el movimiento e intercambio de nutrientes y desechos desde el interior con su medio externo.

Las membranas también controlan el flujo de información entre células y contienen receptores específicos para estímulos externos. Alternativamente, algunas membranas son capaces de generar señales, ya sean químicas o eléctricas, desempeñando un papel determinante en la intercomunicación celular.

Además, los dos procesos más importantes de transducción de energía en las células, se llevan a cabo en sistemas localizados en membranas y constituidos por arreglos ordenados de enzimas, otras proteínas y lípidos: en la fotosíntesis, la luz se transforma en energía de unión química y en la fosforilación oxidativa, se sintetiza ATP por oxidación de compuestos químicos.

Doudoroff en 1951 y Davis, cinco años después, fueron los primeros en señalar la importancia del problema del control del metabolismo y el crecimiento, así como la coordinación e integración de los procesos bioquímicos en el seno de las células. El interés creciente de la bioquímica

por la actividad de membranas celulares responde a las inquietudes expuestas por estos investigadores. Una célula o una organela puede considerarse una unidad fisiológica diferente del medio, la cual desarrolla actividades distintas de aquellas que se producen fuera de ella (Doudoroff y col.,1951; Davis,1956).

Es evidente que para que esto ocurra se requiere la existencia de una barrera que envuelva y aisle a las células del medio; al mismo tiempo, para vivir, crecer y reproducirse, cada célula debe comunicarse con el medio que la rodea, para lo cual debe tener con éste un intercambio altamente organizado.

Las membranas deben poseer características especiales y un claro ejemplo es el funcionamiento de órganos como intestino y riñón, cuya actividad se basa principalmente en procesos de permeabilidad de membrana.

Las membranas no se limitan a cumplir una función pasiva, por la cual a través de ella las moléculas fluyen de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, sino que es necesario considerar la existencia de sistemas que funcionen activamente para captar sustancias del medio después de haberlas reconocido. Estos sistemas deben permitir la entrada de compuestos del medio a la célula y eventualmente concentrarlos, a favor de un gradiente de concentración o potencial químico. Por lo tanto, la función de la membrana de separar los reactantes del medio y asegurar la acumulación de metabolitos o nutrientes sólo se lleva a cabo si ésta resulta selectivamente permeable.

Las dificultades que ha encontrado la experimentación en el campo del estudio de la permeabilidad celular en diferentes tejidos se pone de manifiesto por la necesidad de aplicar métodos rigurosos para evidenciar la existencia de distintos sitios específicos localizados en la membrana y establecer interacciones múltiples y recíprocas en el transporte de distintos nutrientes (Newey y Smyth,1964; Saunders e Isselbacher,1965; Alvarado,1966).

1.3 Sistemas de transporte de aminoácidos en células animales. Especificidad de los sistemas.

En 1913, Van Slyke y Meyer observaron que en las células hepáticas, los valores de las concentraciones intracelulares de L-aminoácidos eran mayores que los de la sangre. Esto los llevó a proponer que las células eran capaces de

mantener una significativa concentración interna de aminoácidos, acumulando estos compuestos que incorporan del fluido extracelular en contra de una diferencia de concentración.

Años más tarde (Christensen y col,1948) fueron confirmados estos resultados, el aminoácido glicina era concentrado en el hígado unas 33 veces y en músculo esquelético unas 8 veces, respecto de los valores hallados en plasma.

A partir de estas evidencias, numerosos fueron los trabajos que se publicaron (Christensen,1969; Oxender,1972; Christensen y col.,1973 y 1974) en los cuales se estudiaron varios aspectos de la permeabilidad de la membrana celular a los aminoácidos.

Los niveles intracelulares de aminoácidos son mantenidos por la célula como el resultado del balance entre los aminoácidos provenientes de la biosíntesis endógena, la proteólisis intracelular, el transporte desde el medio externo y la utilización en la síntesis de proteínas, su metabolismo para suplir las necesidades energéticas o como intermediarios de otros compuestos y la salida al medio extracelular.

Si la concentración de un aminoácido en el medio extracelular es aumentada, la velocidad de incorporación no seguirá aumentando en forma lineal indefinidamente, sino que alcanza un valor máximo, que será constante e independiente del incremento posterior de la concentración externa. Este comportamiento indica la existencia de un sistema de transporte mediado, localizado en la membrana citoplasmática.

Los aminoácidos son incorporados en las células y tejidos animales a través de *sistemas transportadores* o *translocadores*. El número y tipo de los sistemas transportadores en la membrana celular fue definido, principalmente en base a ensayos de competencia. Para cada uno de ellos es posible definir las siguientes características: diferente reactividad hacia los sustratos (L-aminoácidos), dependencia de energía e iones, sensibilidad al pH e inhibidores metabólicos y principalmente un comportamiento cinético definido.

El proceso molecular del transporte de aminoácidos es más complejo que una simple secuencia de unión-translocación-disociación y liberación

hacia el citoplasma celular del aminoácido, a través de un componente de la membrana plasmática.

Existen mecanismos de regulación, los cuales continuamente adaptan la eficiencia del transporte a las necesidades reales de la maquinaria intracelular.

La entrada mediada de solutos es un proceso reversible. Por lo tanto, existe la posibilidad de entrada del aminoácido como de la salida del mismo, utilizando el mismo transportador. Un sustrato presente sobre uno de los lados de la membrana puede afectar de dos maneras el flujo de otro sustrato:

1) en la misma dirección, por inhibición a través de la competencia entre ellos por el sitio receptor sobre el transportador, mecanismo de *cis*-inhibición o por una estimulación cooperativa del transporte, mecanismo de *cis*-estimulación

y 2) en la dirección opuesta, ya sea incrementando la disponibilidad de un sitio receptor en la posición adecuada, mecanismo de *trans*-estimulación o por el contrario disminuyéndola, mecanismo de *trans*-inhibición.

Christensen (1969 y 1985) describió una serie de estudios cinéticos para lograr una correcta discriminación de los sistemas de transporte. Mediante la aplicación de estas técnicas discriminatorias y la ayuda de líneas celulares defectivas en el transporte de aminoácidos (Finkelstein y col., 1977), se pudo caracterizar una serie de sistemas transportadores cuyas afinidades por los sustratos, en general, son similares en los distintos tejidos animales.

Un aminoácido en particular puede ser transportado simultáneamente por 2 ó 3 sistemas independientes. A pesar de la "superposición" de los sistemas transportadores, se ha demostrado cierta especificidad parcial hacia aminoácidos con características estructurales semejantes.

Los sistemas transportadores pueden agruparse en: (Christensen, 1984 y 1985; Guldotti y col., 1978):

- 1) sistemas para aminoácidos neutros,
- 2) sistemas para aminoácidos catiónicos,
- 3) sistemas para aminoácidos aniónicos
- y 4) sistema de la γ -glutamyltranspeptidasa.

1.3.1 Sistemas de transporte para aminoácidos neutros.

Los sistemas de transporte para aminoácidos neutros se agrupan en
 1) sistemas Na⁺-dependientes,
 y 2) sistemas Na⁺-independientes,
 basándose en el requerimiento de la presencia o ausencia de sodio en el medio extracelular, para ser transportado.

1.3.1.1 Sistemas Na⁺-dependientes.

Sistema A

El sistema A es utilizado preferentemente para el transporte de L-aminoácidos con cadenas laterales cortas, polares o lineales (Oxender y Christensen, 1963). Entre ellos, glicina, L-alanina, L-prolina y el análogo no metabolizable: el ácido α -aminoisobutírico (α -AIB), así como derivados α -amino metilados. Entre estos últimos el análogo no metabolizable: el ácido α -metilaminoisobutírico (α -MeAIB) es transportado sólo por el sistema A y se lo considera como el sustrato modelo para este sistema (Christensen y col., 1965). Esta propiedad lo distingue de los sistemas ASC y L.

El sistema A es Na⁺ dependiente como ya se indicó previamente. Lever y col. (1984) determinaron una estequiometría 1:1 para ión sodio a aminoácido transportado, usando vesículas de membrana de células epiteliales de riñón de perro (células MDCK). Reemplazando el sodio extracelular por potasio, la actividad de este sistema es prácticamente despreciable (Oxender y Christensen, 1963; Christensen y Handlogten, 1977).

El sistema es sensible a cambios de pH (Oxender y Christensen, 1963) y a inhibidores metabólicos (Christensen y col., 1967).

Muestra débiles propiedades de intercambio, pero presenta un importante efecto de *trans*-inhibición.

El sistema A se describió y caracterizó por primera vez, en células de tumor ascítico Ehrlich (Oxender y Christensen, 1963); posteriormente en la mayoría de las células y tejidos de animales superiores. Por el contrario, no se detectó actividad en eritrocitos y reticulocitos (Christensen, 1969; Wise, 1976).

Sistema GI.

Es un sistema que transporta glicina. Puede, además, transportar sustratos con grupos N-metilos, como sarcosina o cualquier otro sustituyente en el grupo α -amino.

No es sensible a cambios de pH del medio extracelular.

Se describió en eritrocitos y reticulocitos (Christensen y col., 1967; Christensen, 1969). La falta de actividad del sistema A en estas células, pero la presencia del sistema GI llevó a postular que estos sistemas pueden ser una extrema variante uno del otro. Más recientemente se caracterizó en hepatocitos y en una línea de hepatoma (Christensen y Handlogten, 1981).

Sistema N.

El sistema N transporta aminoácidos que contienen nitrógeno en su cadena lateral. Es específico para L-glutamina, L-histidina y L-asparagina.

La disminución del pH del medio extracelular produce un efecto pronunciado sobre la entrada de estos aminoácidos.

Su actividad se detectó solamente en hepatocitos y en células de hepatoma, lo que sugiere que el sistema N está sólo presente en el hígado (Kilberg, 1982).

Sistema ASC.

El sistema ASC transporta aminoácidos que tienen entre 3 y 5 átomos de carbono en su molécula, L-alanina, L-serina y L-cisteína, de ahí su nombre. Pueden ser sustratos, los aminoácidos aniónicos de cadena de igual número de átomos de carbono, si el pH del medio disminuye a valores menores de 6. Presenta una inusual alta estereoespecificidad, sugiriendo la importancia de la cadena lateral para el reconocimiento del sustrato.

A diferencia del sistema A, no es tan sensible a cambios de pH del medio extracelular y a inhibidores de los caminos metabólicos que suministran energía; no transporta sustratos N-metilados y es *trans*-estimulado por la presencia de aminoácidos intracelulares.

Si bien en las células Ehrlich (Wise, 1976) representa un componente minoritario de transporte, se demostró que en otro tipo de células y tejidos es uno de los sistemas más importantes. Se describió en reticulocitos de

conejo (Winter y Christensen, 1965) y en reticulocitos de paloma (Eavenson y Christensen, 1967), células en las cuales no se detectó el funcionamiento del sistema A. Además, se encontró actividad del sistema ASC en hepatocitos de rata (Edmondson y col., 1979), fibroblastos humanos en cultivo (Gazzola y col., 1980; Franchi-Gazzola y col., 1982) y en células de ovario de hamster chino (CHO) (Bass y col., 1981; Shotwell y col., 1981). La discriminación del sistema ASC se puede realizar en forma muy fácil para células cultivadas en un medio rico en aminoácidos, en el cual el sistema A está relativamente reprimido (Kilberg y col., 1981).

Sistema β .

El sistema β transporta β -aminoácidos, β -alanina, taurina y el ácido 4-aminobutírico.

La actividad de este sistema se demostró en células Ehrlich (Christensen, 1964), hepatocitos de rata, así como en otras células eucariotas (Van Winkle, 1988).

1.3.1.2 Sistemas Na^+ -Independientes.

Sistema L.

El sistema L es altamente activo para aminoácidos con cadenas ramificadas y con anillos aromáticos: L-leucina, L-isoleucina, L-valina y L-fenilalanina. Además, muchos aminoácidos con mayor afinidad por otros sistemas, son transportados por el sistema L. Por ejemplo, L-metionina, es transportado por el sistema A (ver 1.3.1.1) y también puede utilizar el sistema L (Oxender y Christensen, 1963). Numerosos análogos sintéticos se probaron con el fin de encontrar alguno que fuera transportado exclusivamente por el sistema L. Se encontró que el análogo no-metabolizable: el ácido 2-aminobiciclo-[2,2,1]-heptano-2-carboxílico (BCH) cumple con este requisito y se lo considera el sustrato modelo (Christensen y col., 1969).

Una de las características más importantes de este sistema es su no dependencia con la concentración externa de sodio (Oxender y Christensen, 1963; McGivan y col., 1977).

El sistema L presenta baja sensibilidad al cambio de pH extracelular (Oxender y Christensen, 1963).

Este sistema se caracteriza por ser *trans*-estimulado por los mismos sustratos intracelulares (Oxender y Christensen, 1963; Matthews y Zand, 1977).

El sistema L se caracterizó en células de tumor ascítico Ehrlich (Oxender y Christensen, 1963) y en una amplia variedad de células animales (Guidotti y col., 1978).

En hepatocitos de ratas adultas en cultivo primario (Weissbacch y col., 1982), se describieron dos sistemas de transporte Na^+ -independientes para aminoácidos neutros. Estos fueron designados sistemas L_1 y L_2 . La incorporación por el sistema L_1 es sustancialmente inhibido por L-cisteína, L-valina, L-iso-leucina, L-leucina, L-metionina, L-histidina, L-triptofano, L-tirosina, L-fenilalanina y BCH. Sin embargo, el sistema L_2 es completamente inhibido por L-iso-leucina, L-fenilalanina, L-leucina y BCH. Los aminoácidos transportados por ambos sistemas muestran cinéticas bifásicas dando valores de K_m para el componente L_1 en el rango μmolar , mientras los valores para el sistema L_2 son un orden de magnitud mayor. En hepatocitos aislados frescos, la actividad del sistema L_2 es relativamente alta y disminuye después de transcurridas las 24 a 48 horas iniciales de cultivo. En cambio, en el transporte por el sistema L_1 , se observa un incremento durante el cultivo luego de un periodo inicial de 12 a 24 horas. Este incremento es bloqueado por cicloheximida o actinomicina D. El sistema L_1 está presente también en hepatocitos fetales. En una línea de hepatoma, opera un solo componente Na^+ -independiente y se considera que uno de los sistemas presente en el hepatocito normal adulto no se expresa en estas células transformadas.

Sistema T.

El sistema T transporta α -aminoácidos aromáticos, principalmente L y D triptofano. La L-tirosina es parcialmente transportada por este sistema y el sistema L; la L-fenilalanina es transportada preferentemente por el sistema L.

Está presente en eritrocitos humanos (Rosenberg y col., 1980; Vadgama y Christensen, 1985). En estas células, es específicamente inhibido por 4-azido fenilalanina y es altamente sensible, comparándolo con el sistema L, a la inhibición por N-etilmaleimida. Presenta una débil respuesta a la *trans*-estimulación.

Sistema asc.

El sistema asc transporta selectivamente los α -aminoácidos que utilizan el sistema ASC: L-alanina, L-serina y L-cisteína. La diferencia es que este sistema es Na^+ -independiente.

Esta presente en algunas células rojas maduras de mamíferos (Young y col., 1975; Fincham y col., 1982; Vadgama y Christensen, 1985).

1.3.2 Sistemas de transporte para aminoácidos catiónicos.

Un solo sistema se describió para aminoácidos catiónicos. Se lo designó sistema y^+ (anteriormente Ly^+)(White, 1985). Este sistema se caracteriza por ser Na^+ -independiente. El signo positivo indica la necesidad de una carga positiva sobre su cadena lateral para ser transportado. Entre sus sustratos se encuentran: L-diaminoácidos, L-arginina y la forma catiónica de la L-histidina.

Presenta fuerte *trans*-estimulación.

1.3.3 Sistemas de transporte para aminoácidos aniónicos.

En los sistemas de transporte para α -aminoácidos aniónicos puede considerarse dos tipos: sistemas Na^+ -dependientes y sistemas Na^+ -independientes.

1.3.3.1 Sistemas Na^+ -dependientes.

Sistema X_{AG}^- .

El signo menos indica la necesidad de una carga negativa en la cadena lateral del α -aminoácido para ser transportado. Presenta igual reactividad con L-aspartato y L-glutamato.

Se caracterizó en hepatocitos de rata (Makowske y Christensen, 1982), eritrocitos de perro (Ellory y col., 1981) y en fibroblastos de piel en cultivo (Gazzola y col., 1981; Dall'Asta y col., 1983).

Sistema X_A^- .

Este sistema transporta L-aspartato y sus análogos, pero no L-glutamato y sus análogos de cadena lateral más larga.

1.3.3.2 Sistemas Na^+ -Independientes.

Sistema x_G^- .

El sistema x_G^- transporta L-glutamato y sus análogos, pero no L-aspartato y sus análogos de cadena lateral más corta.

Sistema x_C^- .

Este sistema transporta L-cistina y L-glutamato.

1.3.4 Sistema de la γ -glutamyltranspeptidasa.

Meister (1973), ha propuesto un mecanismo diferente para el transporte de aminoácidos al interior de las células de la corteza adrenal, que se conoce como el ciclo del γ -glutamilo (figura 1). Es un sistema multienzimático que comprende la participación de seis enzimas. Una de ellas es la γ -glutamyltranspeptidasa que está localizada en membrana. Cataliza la transferencia de un resto glutamilo desde el tripéptido glutatión al aminoácido que se transporta, formando un γ -glutamyl-aminoácido y cisteinilglicina.

El γ -glutamyl-aminoácido se transporta a través de la membrana y se cliva en el compartimento citosólico por acción de la γ -glutamylciclotranspeptidasa, liberando el aminoácido y 5-oxoprolina. Esta última se convierte en glutamato y resintetiza glutatión en el citosol. Se utilizan tres moléculas de ATP en la nueva síntesis, lo que hace que la reacción de la γ -glutamyltranspeptidasa no esté en equilibrio y que el aminoácido sea transportado al interior de la célula a pesar de su alta concentración intracelular.

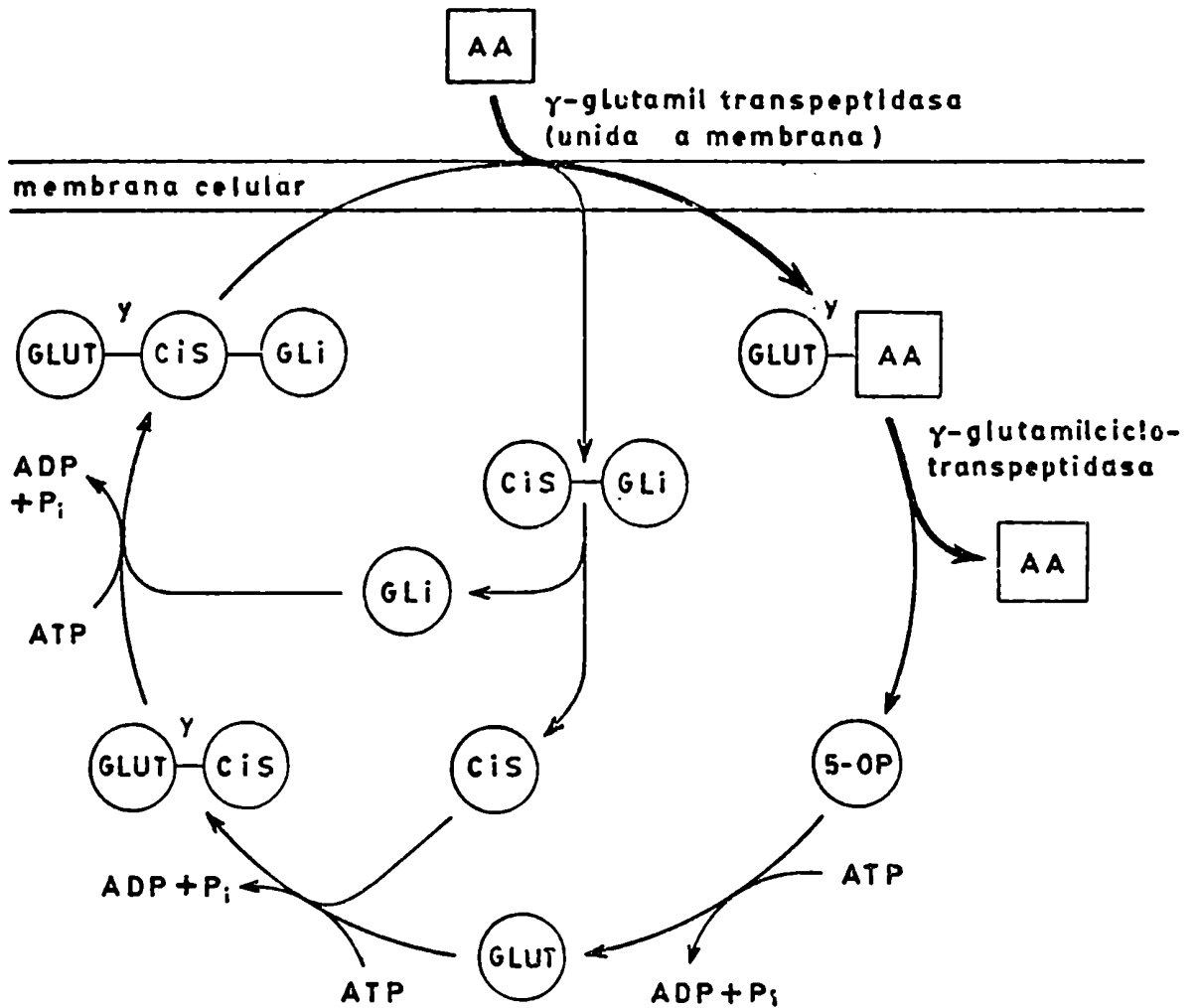


Figura 1 Sistema de la γ -glutamiltranspeptidasa para el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares.

Cada reacción se cataliza por una enzima diferente. Abreviaturas: AA: aminoácido transportado; GLUT: Glutamato; GLI: glicina; CIS: cisteína; 5-OP: 5-oxoprolina.

El ciclo del γ -glutamilo se describió en diferentes células y tejidos; entre ellos en la mucosa del yeyuno (Cornell y Meister, 1976), hígado de rata (Higashi y col., 1976) y en una línea celular de hepatoma (Inoue y col., 1977).

I.4 Mecanismos de regulación de los sistemas de transporte.

El transporte de los aminoácidos es mediado por proteínas específicas situadas en la membrana celular, las cuales permiten que los aminoácidos del medio externo sean translocados al medio interno donde son liberados en una forma no modificada. El proceso descrito ha tenido un desarrollo temprano en la evolución ya que es la manera de capturar los aminoácidos que están en concentraciones bajas en el medio y que son necesitados por la célula para su propia estructura, sintetizando proteínas esenciales, además de proveer energía requerida para distintos procesos metabólicos. Con la aparición de los sistemas de transporte, capaces de reconocer en forma específica su sustrato, comenzaron a operar mecanismos de regulación para asegurar que esa actividad se adapte a las condiciones del medio extracelular.

En eucariotes unicelulares, el mantenimiento de las condiciones de homeostasis para los aminoácidos dentro de las células, cuenta con mecanismos de control, los cuales establecen una relación directa entre el proceso de transporte y el sustrato involucrado. La concentración de aminoácidos, ya sea en el medio extracelular como en el intracelular, afectan la eficiencia de los sistemas y/o su capacidad.

Estos mecanismos de control operan en hongos y levaduras y han sido mantenidos en eucariotes superiores, donde este tipo de regulación se denominó *regulación por retroalimentación* y *regulación adaptativa*.

En eucariotes pluricelulares, las células están organizadas dando lugar a tejidos y órganos. La relación de cada célula con el medio que la rodea es, ahora, más compleja y por lo tanto, nuevos y más finos mecanismos de regulación deben operar sobre los sistemas de transporte. La aparición de receptores en la cara externa de la superficie celular para el reconocimiento de células vecinas y de sustancias, como hormonas y factores de crecimiento, constituye el proceso por el cual se asegura un control superior del transporte de aminoácidos.

En las últimas décadas, numerosos estudios han provisto información importante del efecto de hormonas sobre el transporte de aminoácidos en células y tejidos.

La complejidad de los problemas que caracteriza la interacción de las hormonas con sus células blanco, ha tenido un rápido progreso permitiendo la elucidación de los mecanismos regulatorios. Sin embargo, aún no se conoce cual es la participación de los procesos de transporte en la acción total de la hormona, aunque parte de la regulación hormonal del metabolismo depende del control de la entrada de los sustratos a través de la membrana, como ha sido expresado apropiadamente por Kilberg (Kilberg, 1986b).

Dos mecanismos de regulación sobre el transporte de aminoácidos serán tratados a continuación:

- 1) regulación hormonal
- y 2) regulación adaptativa.

1.5 Regulación hormonal de los sistemas de transporte.

En organismos superiores, se requieren de mecanismos regulatorios, con el fin de ajustar el flujo de nutrientes entre los diferentes tipos de células en cada órgano, así como entre los diferentes órganos en el organismo total. El control por hormonas es un mecanismo por el cual se logra este objetivo.

El estudio de la regulación hormonal de los sistemas de transporte (Shotwell y col., 1983) fue realizado en distintas células y tejidos. A pesar de los resultados presentados en numerosas publicaciones, muy pocas generalizaciones pueden hacerse en base a ellos. Muchos de los primeros estudios se realizaron usando animales enteros. En estos casos, al interpretar los resultados de los experimentos, se debe considerar la posibilidad de que la administración de hormonas puede causar la liberación de otras hormonas o factores de crecimiento y producir efectos secundarios. El desarrollo de técnicas de cultivos *in vitro* permitieron un avance importante en ese territorio.

El sistema de transporte que se encontró generalmente sensible a la acción de las hormonas es el sistema A.

En la mayoría de los casos hay una correlación entre la estimulación de la entrada de aminoácidos por una hormona en su tejido blanco y un incremento en la actividad anabólica de la célula, tal como síntesis de macromoléculas, producción de energía o división celular. Por el contrario, el

transporte no es afectado o puede ser inhibido cuando el efecto de la hormona es catabólico, como en el caso de los glucocorticoides.

GLUCAGON

De las muchas hormonas y factores de crecimiento conocidos, que estimulan el sistema A en una gran variedad de tejidos, la inducción dependiente de glucagón es una de las mejores caracterizadas en hepatocitos aislados de rata. Los aminoácidos transportados por el sistema A, L-alanina, glicina, L-serina y L-prolina, son precursores gluconeogénicos muy eficientes. Durante los períodos de hipoglucemia, el glucagón no solamente induce la síntesis hepática de glucosa por la vía gluconeogénica, sino que también aumenta la cantidad de aminoácidos precursores disponibles por el hepatocito, a través de su efecto estimulatorio de la actividad del sistema A hepático.

Edmondson y Lumeng (1980) observaron una estimulación de la actividad del sistema A, insensible a la cicloheximida, luego de pocos minutos de agregado el glucagón. El incremento más importante ocurre después de 90 minutos de incubación y es bloqueado por inhibidores de ARN o de la biosíntesis de asparagina unida a glicoproteínas (Barber y col., 1986). Esta observación es compatible con la propuesta que la expresión de un gen, que codifica para una glicoproteína integral de membrana, es mejorada por acción del glucagón. El tiempo requerido para observar el aumento del transporte por el sistema A es debido a la síntesis, procesamiento, tránsito e inserción de la proteína transportadora en la membrana. Existen nuevas evidencias que apoyan esto y es que vesículas de membrana plasmática de hígado de rata, provenientes de animales tratados con glucagón, presentan una actividad de transporte aumentada (Schenerman y Kilberg, 1986). Además, a partir de estas vesículas pueden solubilizarse las proteínas con detergentes iónicos o no iónicos y luego preparar proteoliposomas, los cuales retienen la actividad aumentada del sistema A (Bracy y col., 1987).

Aunque aún no se conoce si la nueva proteína sintetizada representa la proteína transportadora, la presencia de cadenas de carbohidratos apoya esta hipótesis.

La relación entre el número de receptores ocupados por la hormona y el grado de estimulación del transporte parece no ser lineal, en hepatocitos de rata. La entrada de α -AIB alcanza el 50 por ciento de la estimulación máxima, cuando sólo el 5 al 20 por ciento de los receptores de glucagón están ocupados. Además el 50 por ciento de los receptores ocupados produce la velocidad máxima de transporte de α -AIB.

INSULINA

En numerosas células y tejidos se observó un efecto estimulador de la insulina sobre el transporte de aminoácidos (Shotwell y col., 1983). El sistema de transporte predominantemente afectado por la hormona es el sistema A. La relación entre la ocupación de los receptores y la estimulación del transporte es casi lineal, es decir, se observa la mitad de la estimulación máxima para α -AIB cuando aproximadamente el 50 por ciento de los receptores están ocupados (Santora y col., 1979).

Englesberg y Moffett aislaron una mutante constitutiva que denominaron Ala^r6 (Moffett y col., 1987) trabajando con CHO. En esta mutante el valor de $V_{m\acute{a}x}$ del sistema A es 4 a 5 veces mayor que el que corresponde a la línea parental CHO-K1. La insulina es requerida para el crecimiento óptimo de las células CHO-K1. Sin embargo, pueden ser crecidas en un medio libre de la hormona y en estas condiciones el agregado de insulina induce el sistema A. La inducción es inhibida por cicloheximida y actinomicina D indicando que es a nivel transcripcional. Aunque Ala^r6 también requiere insulina para crecer, cuando es crecida en la presencia o ausencia de insulina, no hay efecto sobre la actividad del sistema A. El fenotipo de Ala^r6 es recesivo al fenotipo parental, demostrando que la mutación está en un gen regulador. Además, cuando se cruzó con la mutante Ala^r4 oua^r HPRT⁻ se observó que ambas mutantes eran complementarias. La mutante Ala^r4 oua^r HPRT⁻ presenta una mutación en el gen *R1* descrito anteriormente (1.5.3). Estos resultados indican que la mutación en Ala^r6 está en un gen regulador diferente, que se lo denominó *R2*; el producto de su expresión es el represor *r2* (figura 2): la insulina induce al sistema A por inactivación del represor *r2*, pero la mutante Ala^r6 expresa un *r2* inactivo y como consecuencia no se observa el efecto de la hormona (Englesberg y Moffett, 1986; Englesberg y col., 1986). El

represor $r2$ no responde a aminoácidos efectores y junto con $r1$ regula la expresión del gen A (que codifica para la proteína transportadora del sistema A) por un proceso de control negativo.

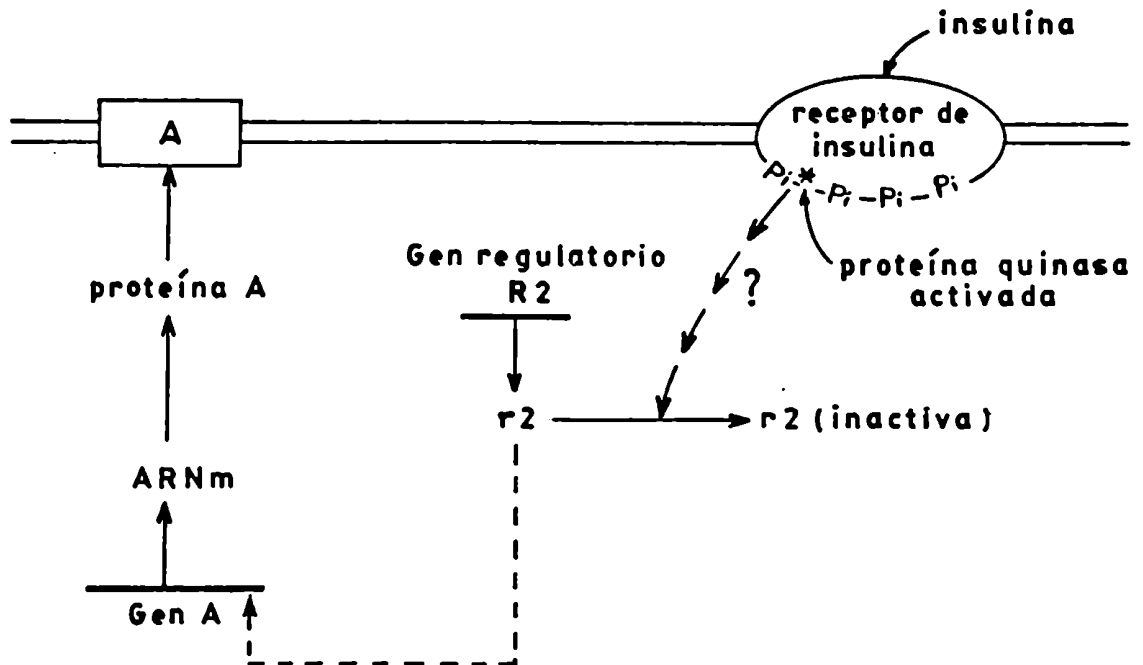


Figura 2 Modelo para la regulación de la actividad del sistema A por insulina.

Modelo propuesto por Englesberg (Englesberg y Moffett, 1986) en células CHO. **R2** representa al gen regulador cuyo producto, **r2**, es un represor constitutivo y controla la transcripción del gen estructural para el sistema A.

CATECOLAMINAS

En los resultados del efecto de catecolaminas sobre el transporte de aminoácidos pueden considerarse, aquellos que producen un aumento en la entrada, por ejemplo en los hepatocitos en cultivo (Pariza y col., 1977) y hepatocitos aislados de hígado de rata (LeCam y Freychet, 1978; Canivet y col., 1980) y otros que inhiben la entrada en adipocitos aislados de ratón

(Touabí y Jeanrenaud, 1969) y en células de diafragma aislado de rata (Sanders y Jacob, 1970).

En el estudio del efecto de las catecolaminas sobre el transporte, las evidencias han demostrado efecto sólo sobre el sistema A. Teniendo en cuenta los valores de DE₅₀ (dosis efectiva 50) para la estimulación del transporte de α -AIB, la epinefrina fue cuatro veces más potente que la norepinefrina y cien veces más potente que el isoproterenol. La inducción del transporte de aminoácidos por epinefrina o isoproterenol incrementó los niveles endógenos de AMP cíclico en hepatocitos en cultivo (Pariza y col., 1977). Utilizando antagonistas α -adrenérgicos, se mostró que la estimulación de la incorporación de aminoácidos, producida por las catecolaminas, era una respuesta mediada por receptores α -adrenérgicos, tanto en hepatocitos en cultivo como en los aislados enzimáticamente del hígado de rata. En cambio, el aumento de AMP cíclico era a través de receptores β -adrenérgicos. Sin embargo, existen algunas diferencias según el tejido estudiado. Kinzie y col. (1976), observaron en células de mucosa intestinal de rata que el efecto de las catecolaminas era mediado a través de la activación de receptores β -adrenérgicos.

El efecto que estas hormonas producen sobre los parámetros cinéticos del transporte de aminoácidos es variado. En hepatocitos en cultivo se observó una disminución de Km sin afectar la V_{máx.}. En cambio, en hepatocitos aislados, el valor de Km permaneció sin alteración, mientras que hubo un incremento en la V_{máx.} La incubación de las células con cicloheximida inhibió el incremento en el transporte por las catecolaminas, sugiriendo que la síntesis de nuevos transportadores es necesaria para el efecto mencionado.

AMP CICLICO

Los pocos trabajos publicados estudiando el efecto del AMP cíclico sobre el transporte de aminoácidos por el sistema A se realizaron en hepatocitos. A pesar de ello, no puede establecerse una conclusión general, ya que los resultados no son coincidentes. En los primeros estudios realizados en tejido hepático se observó que el AMP cíclico mediaba la inducción por glucagón del transporte de aminoácidos, basado en parte por la correlación

entre el incremento del nucleótido cíclico y el incremento en el transporte, después de la incubación con la hormona. Resultados posteriores mostraron que incrementos en AMP cíclico puede no ser necesario para la estimulación del transporte de aminoácidos por glucagón o catecolaminas. El tratamiento de hepatocitos de rata con 3-isobutiril-1-metilxantina, inhibidor de la fosfodiesterasa, incrementó los niveles de AMPcíclico pero no afectó el transporte de aminoácidos (Pariza y col.,1976). Tanto la epinefrina como el isoproterenol incrementaron el AMP cíclico intracelular, pero solo el tratamiento con la epinefrina aumentó la entrada de α -AIB (Pariza y col.,1977). Además, en varias líneas de hepatoma la relación entre cambios en los niveles de AMP cíclico y el transporte de aminoácidos como respuesta al tratamiento hormonal, sugiere que incrementos en el AMP cíclico no es necesario ni suficiente para ver el efecto de las hormonas sobre el transporte (Butcher y col.,1972; Scott y col.,1972). Edmonson y Lumeng (1980) analizaron la estimulación del transporte de L-alanina por glucagón en hepatocitos aislados. La hormona provocó una estimulación temprana del transporte con un incremento posterior, el cual puede ser prevenido por cicloheximida. Comparando el efecto del glucagón a tiempos cortos con el efecto de la valinomicina, se propuso que la activación del transporte de L-alanina se debía a la hiperpolarización de la membrana por la hormona, un efecto ya observado en hígado perfundido (Petersen,1974). McGivan y col.(1981), demostraron que en hepatocitos, el transporte de L-alanina es estimulado por AMP cíclico, siendo esta estimulación independiente de la síntesis proteica. El mecanismo por el cual el glucagón y el AMP cíclico ejerce su efecto no es aún bien conocido. En hepatocitos, existen evidencias que la estimulación del transporte Na^+ -dependiente ocurre por un cambio en el potencial de membrana (Moule y col.,1987).

1.6 Mecanismo de regulación adaptativa.

Entre los sistemas de transporte de aminoácidos, numerosos estudios de regulación fueron dedicados al sistema A. Este sistema de transporte, como se mencionó en 1.5, responde a una variedad de hormonas y factores de crecimiento, los cuales regulan a nivel de síntesis de ARN y proteínas

(Tranacere y col., 1977; Derr y Smith, 1980; Crettaz y col., 1983). Además, hay evidencias de posibles sitios post-traduccionales de regulación.

Una forma adicional de control del Sistema A ocurre a través de un mecanismo denominado *regulación adaptativa, control adaptativo, respuesta adaptativa o transporte mejorado inducido por el ayuno*. Las células animales se adaptan a cambios en la disponibilidad de nutrientes, regulando la actividad de sus sistemas de transporte.

1.6.1 Desrepresión del transporte de aminoácidos.

Los primeros estudios realizados por Riggs y Pan (1972) en preparaciones de útero inmaduro de rata y Gazzola y col. (1972) en células de embrión de pollo, mostraron que una incubación en un medio libre de aminoácidos, condición de ayuno, por tres a cinco horas incrementaba el transporte de aminoácidos neutros. La entrada aumentada, debido a la adaptación, no es el resultado de un mecanismo de *trans*-inhibición ya que el mismo efecto derepresivo se produce en células con bajo contenido endógeno de aminoácidos, previo a mediciones de transporte (Moffett y Englesberg, 1986). El aumento en la actividad de transporte, se correlacionó con el sistema A en base a estudios de dependencia de cationes, sensibilidad al pH y análisis de inhibición (Riggs y Pan, 1972; Gazzola y col., 1973).

La regulación adaptativa del sistema A se estudió en un gran número de células y tejidos diferentes (Peck y col., 1976; Guidotti y col., 1978; Fehlmann y col., 1979; Hayes y McGivan, 1982); Incluyendo células en cultivo (Dall'Asta y col., 1978; Christopher y col., 1979; Kelley y Potter, 1979; Gazzola y col., 1981; Shotwell y col., 1981; White y Christensen, 1983; Boerner y Saler Jr., 1985; Gazzola y col., 1985; Bracy y col., 1986).

El análisis cinético de la respuesta o regulación adaptativa dió resultados variados:

1) la aparición de un transportador de alta afinidad inducido por el ayuno fue descrita por Fehlmann y col. (1979) en hepatocitos de hígado de rata en cultivo y por Boerner y Saler Jr. (1985) en células MDCK.

2) una disminución del Km con un aumento de Vmax se ha observado en la

desrepresión del transporte en placenta humana (Smith y col.,1973), células HeLa (Hume y Lamb,1976) y en células de músculo L6 (Logan y col.,1982)

y 3) no se ha observado variaciones en los Km pero sí un incremento en la Vmax en condiciones de ayuno en útero de rata (Riggs y Pan,1972), células de corazón de embrión de pollo (Gazzola y col.,1972), cortes de riñón (Reynolds y Segal,1976), cultivo primario de hepatocitos (Kelly y Potter,1978) y en células de hepatoma H4 (Kilberg y col.,1985).

En base a los resultados obtenidos utilizando inhibidores de la síntesis de macromoléculas, se ha demostrado que el mecanismo de control adaptativo es dependiente de la síntesis *de novo* de ARN y proteínas. (Gazzola y col.,1972 y 1981; Franchi-Gazzola y col.,1973; Heaton y Gelehrter,1977; Klips y col.,1983; Kelley y Potter,1978; Kilberg y col.,1985). Por ejemplo, Barber y col., (1983) observaron que la inducción del sistema A hepático es también bloqueado por tunicamicina, un inhibidor de la biosíntesis de glicoproteínas.

Los datos mencionados, junto con la observación que el estímulo del sistema A está asociado con un incremento de la Vmáx. y la descripción por Moffett y Englesberg (1984) de mutantes regulatorias en células CHO, llevaron a considerar que el aumento de la actividad de transporte es el resultado de un incremento en la expresión de un gen que codifica una glicoproteína cuyo carbohidrato es requerido para la actividad, estabilidad o inserción de ella en la membrana celular.

La importancia del núcleo como partícipe de la desrepresión provocada por el ayuno de aminoácidos sobre el transporte se observó en células HeLa, que normalmente responden a bajas concentraciones intracelulares de aminoácidos y no mantienen este comportamiento después de la enucleación por tratamiento con citocalasina B (Hume y col.,1975).

Al comienzo de las investigaciones sobre la regulación adaptativa se sugirió, en base a los resultados obtenidos, que este tipo de control era una propiedad de las células de origen embrionario o tejidos inmaduros (Reynolds y col.,1974; Guidotti y col.,1975). Sin embargo, también se observó en linfocitos (Peck y col.,1976), hepatocitos de ratas adultas (Fehlmann y col.,1979; Kilberg y col.,1980), fibroblastos en cultivo (Guidotti y col.,1978; Gazzola y col.,1980; Shotwell y col.,1981) y en una línea celular de músculo

(Logan y col., 1982), es decir que no es excluyente de células diferenciadas así como de células de animales adultos.

1.6.2 *Trans*-inhibición, represión de la actividad de transporte.

Los resultados del estudio de la regulación adaptativa sobre la actividad del sistema A demostró que puede ser revertido luego de la re-exposición de la preparación celular a determinados aminoácidos. Se consideró el mecanismo de la regulación adaptativa como una derepresión de la actividad del sistema transportador, lo cual incluía considerar que en condiciones de provisión de aminoácidos, el sistema A está reprimido.

La represión es una propiedad de los sustratos de sistema A, incluyendo los análogos de L-alanina no metabolizables α -AIB y α -MeAIB demostrando que el metabolismo del sustrato no es requerido para la represión (Gazzola y col., 1972; Fehlmann y col., 1979; Shotwell y col., 1981). Sin embargo, algunos de los aminoácidos son capaces de inhibir la actividad del sistema A por el conocido mecanismo de *trans*-inhibición (Jacquez, 1975; Kelley y Potter, 1978; Gazzola y col., 1980). El efecto de la *trans*-inhibición puede interferir cuando se desea cuantificar la represión que estos aminoácidos producen en el sistema A. La dificultad señalada justifica la falta de correlación observada en algunos casos, entre la afinidad del sistema por su sustrato y el mecanismo de represión para ciertos aminoácidos (Heaton y Gelehrter, 1977; Handlogten, 1982).

Bracy y col., (1986) propusieron que en la inactivación dependiente de aminoácidos del transporte pueden considerarse dos procesos diferentes:

1) un proceso que es independiente de la síntesis de proteínas se lo denomina: *trans-inhibición* (Kelley y Potter, 1979; Kilberg y col., 1985). La *trans*-inhibición es una consecuencia de la acumulación de transportadores en la cara interna de la membrana celular, debido a los elevados niveles intracelulares de sustratos, entre ellos aminoácidos o Na^+ (White y Christensen, 1983),

y 2) un proceso que representa una fracción de la disminución inducida por aminoácidos que es bloqueado por cicloheximida o por actinomicina D (Gazzola y col., 1981; Kilberg y col., 1985) y se denomina *represión*.

El requerimiento de la síntesis de un ARN mensajero para la derepresión se investigó en mayor detalle utilizando inhibidores específicos de la poli (A) polimerasa: cordicepina y adenina 9- β -D-arabinopiranosido. Ambos inhibidores bloquean completamente la derepresión sin afectar la represión del sistema A (Kilberg, 1986 a y b). Estas observaciones conducen a postular dos alternativas:

1) el ARNm, codificante de la glicoproteína asociada al sistema A, requerida para incrementar la actividad del transporte en respuesta al ayuno de aminoácidos, puede poseer una extensión de poli (A),

y 2) el ARNm que codifica la proteína/s responsable para la represión-aminoácido dependiente puede pertenecer a una pequeña clase de ARNm al cual le falta la extensión de poli (A). Entre los miembros de esta clase están los ARNm que codifican para las histonas que se unen al ADN. Algunas de las histonas están involucradas directa o indirectamente en la regulación de la expresión de genes.

1.6.3 Modelos moleculares de la regulación adaptativa.

En base a los datos de varios grupos de trabajo, dedicados al estudio de la regulación adaptativa, se propusieron dos modelos moleculares para este mecanismo (Saier y col., 1988).

Kilberg y col.(1986) propusieron el modelo que se presenta en la figura 3a.

Este modelo asume que la velocidad de inactivación del sistema A es continua, alta e independiente de la concentración de sustrato. La síntesis de la proteína del transportador se incrementa en ausencia de aminoácidos extracelulares (pasos S₁ y S₂). Cuando S₂ excede la velocidad de inactivación, se observa un aumento de la actividad de transporte. La represión ocurre cuando aminoácidos específicos reducen la transcripción del gen de la glicoproteína asociada al sistema A. En el modelo descrito se propone que una proteína que se une a aminoácidos intracelulares, sensaría los niveles citoplasmáticos de aminoácidos. Esta proteína promueve la iniciación de la síntesis del ARNm deficiente en poli (A) (1.5.2) el cual codifica para una proteína regulatoria nuclear, involucrada en la regulación

negativa de la expresión del gen del sistema A y es por lo tanto el "sensor", en la represión dependiente de aminoácidos.

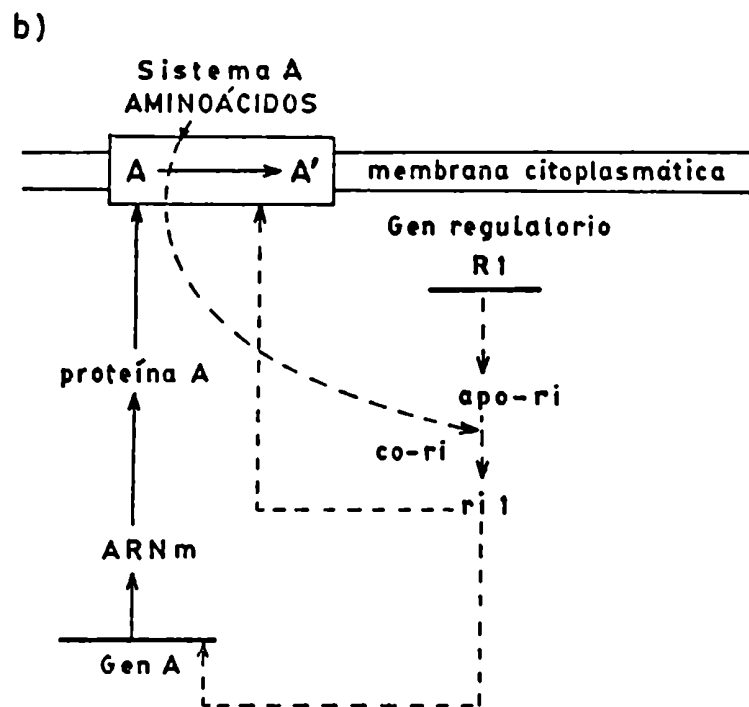
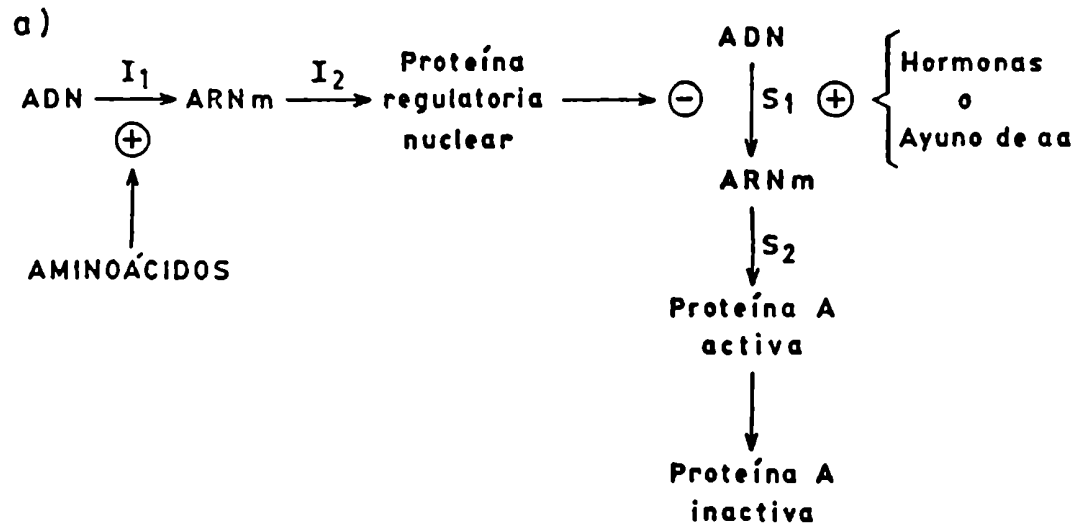


Figura 3 Modelos para la regulación adaptativa de la actividad del sistema A.

(a) Modelo de Kilberg (Kilberg y col., 1986) propuesto para hígado de rata (b) Modelo de Englesberg (Englesberg y Moffett, 1986) propuesto para células CHO.

Por otro lado, Englesberg y Moffett (1986) a partir de los resultados obtenidos con células CHO-K1 propusieron un modelo que tiene en cuenta que la expresión del aparato genético del sistema A es controlado por un gen regulatorio: *RI* (Figura 3b) El gen *RI* codifica para un apo-represor-inactivador (**apo-ri**) el cual está en equilibrio con un represor-inactivador (**ri1**). El **apo-ri** se convierte en **ri1** cuando un aminoácido represivo se une al sitio activo de esta proteína de unión al ADN.

En condiciones de derepresión por ayuno, el equilibrio de **apo-ri** y **ri** está desplazado hacia **apo-ri**. La velocidad de síntesis del ARNm del gen A aumenta y se sintetizan proteínas transportadoras adicionales del sistema A. La adición de aminoácidos desplaza el equilibrio hacia **ri1**. La mayoría de los sustratos del sistema A actúan, generalmente, como co-represores y como co-inactivadores. Por este motivo se los denomina co-represor-inactivadores o **co-ri1** y regulan el cambio hacia **ri1** por unión a la proteína reguladora.

Aminoácidos específicos efectores también determinan si la molécula alterada actúa como represor (**r**) o como represor-inactivador (**ri**). El represor previene la posterior síntesis del ARNm de los transportadores del sistema A interaccionando con el sitio de control del gen A.

1.6.4 Importancia fisiológica de la regulación adaptativa.

La amplia distribución del mecanismo de la regulación adaptativa del transporte de aminoácidos en diferentes células animales, a llevado a diversos grupos de investigación a la discusión del significado fisiológico del mecanismo mencionado. La observación experimental en tejidos o células generalmente requiere condiciones extremas: ausencia o presencia de aminoácidos, durante un determinado intervalo de tiempo, las cuales son raramente encontradas *in vivo*. Quizás el mejor ejemplo de un cambio abrupto en los niveles de aminoácidos en plasma es el que ocurre durante el nacimiento de los cobayos (Christensen, 1973). El parto ocasiona una drástica disminución en la concentración extracelular de aminoácidos durante las primeras horas post-nacimiento. Esta podría ser la señal de derepresión, la cual produciría la elevada actividad de transporte del sistema A en tejidos de

los cobayos, durante los primeros días después del nacimiento (Christensen y Clifford, 1963; Christensen, 1973).

Otros posibles ejemplos que pueden considerarse son:

1) la limitación en la provisión de aminoácidos, hecho que incrementa el transporte de aminoácidos Na^+ -dependiente en el intestino de ratas, medido en preparaciones de membrana de intestino (Hopfer, 1977)

y 2) el efecto represivo de altos niveles de glicina endógena sobre la absorción intestinal en pájaros afectados con distrofia muscular.

Diversos estudios demostraron que la actividad de los sistemas ASC y L no son afectados por un ayuno prolongado de aminoácidos (Gazzola, 1973 y 1975; Heaton y Gelehrter, 1977; Kelley y col., 1979; Shotwell y col., 1981; Shotwell y Oxender, 1983).

Sin embargo, Moreno y col., (1985) demostraron que, por la disponibilidad de aminoácidos del sistema L, la actividad de este sistema está sujeta a regulación en células CHO-K1.

La dificultad de detectar anteriormente esta regulación pudo deberse a la presencia de bajo contenido de aminoácidos en los sueros dializados comerciales, ya que bajas cantidades de leucina son suficientes para observar una actividad de transporte normal. Moreno y col., teniendo en cuenta que en una línea celular mutante de CHO, defectiva en la leucil-ARNt sintetasa, se observa un aumento similar del transporte con altas concentraciones de leucina, propusieron que el mecanismo de regulación estaría relacionado con los niveles de aminoacilación del ARNt más que con los niveles intracelulares de aminoácidos (Moore y col., 1977; Shotwell y col., 1982). En apoyo de la propuesta mencionada es el resultado del incremento de la actividad del sistema de transporte L, en condiciones de ayuno, por el leucinol, una sustancia que no es sustrato de ese sistema pero que es un inhibidor competitivo de la enzima leucil-ARNt sintetasa.

1.7 Avances y perspectivas

La proteína(s) responsable del transporte de aminoácidos por cada uno de los sistemas transportadores, aún no se ha aislado y caracterizado.

El conocimiento actual de estos sistemas está limitado a los datos obtenidos a partir de estudios cinéticos. Dos métodos se han utilizado para la

Identificación y aislamiento de las proteínas de transporte; uno de ellos es la preparación de vesículas a partir de membranas citoplasmáticas (Bracy y col., 1987; Moffett y col., 1987). El segundo, es la incorporación de fracciones de un extracto proteico proveniente de membranas citoplasmáticas en membranas fosfolipídicas artificiales (Lynch y Mc Givan, 1987; McCormick y Johnstone, 1988a y b).

Por otro lado, durante los últimos cinco años, numerosos grupos de investigación han trabajado en la obtención de células mutantes en genes estructurales y regulatorios del transporte de aminoácidos utilizando células de mamíferos en cultivo. El estudio de esos mutantes permitirán esclarecer la naturaleza de la regulación genética y metabólica de los transportadores (El-Gewely y Oxender, 1985; Oxender y col., 1985; Englesberg y Moffett, 1986; Moffett y col., 1987).

Un método más relevante y directo para identificar el componente(s) de un transportador es el de unirle un derivado aminoacídico fotoreactivo. Recientemente, Segel y col. (1989) observaron que un derivado de la serina, O-díazacetil-L-serina (azaserina) es transportado por el sistema L. La azaserina forma un carbeno intermediario altamente reactivo luego de la fotólisis con luz de 365 nm, el cual es capaz de unirse covalentemente a proteína(s) de membrana en o cerca del sistema de transporte L. Por lo tanto, la utilización de este compuesto permitirá la identificación del transportador del sistema L para aminoácidos neutros en diferentes células y tejidos.

OBJETIVOS

El proceso de transporte de nutrientes a través de la membrana citoplasmática, en organismos procariotes y eucariotes, ha sido extensamente estudiado.

Las primeras investigaciones de las propiedades de este proceso se dedicaron al estudio de la cinética de los sistemas de permeación involucrados, su especificidad y los requerimientos energéticos para la operación de los mismos.

El conocimiento de la ultraestructura celular extendió la búsqueda de sistemas transportadores en organelas, como vacuolas y mitocondrias, y a integrar el proceso de incorporación de un sustrato en la célula entera.

En la exposición y discusión de los resultados obtenidos por los distintos grupos de trabajo, se fue reconociendo la importancia de los mecanismos de regulación de la actividad de los sistemas transportadores.

Una distinción se puede establecer en la incorporación de nutrientes en organismos procariotes y eucariotes inferiores y en organismos eucariotes superiores. En el primer caso, las células crecen a menudo, en medios cuya composición varía ampliamente, por ejemplo, en iones, carbohidratos y aminoácidos. A fin de tomar los sustratos necesarios para su metabolismo, esas células han desarrollado entidades de membrana citoplasmática que le permiten adaptarse a condiciones externas no constantes. Generalmente, sus permeasas son inducibles y sus actividades dependen de la concentración iónica del medio, de la fuente de carbono y nitrógeno y de la concentración externa del sustrato que se incorpora. Más aún, la concentración interna de ese sustrato, a su vez, controla la actividad de su sistema/s transportador/es por los mecanismos de *trans*-estimulación y *trans*-inhibición, muy importantes en procariotes y eucariotes inferiores.

En el caso de eucariotes superiores, si se toman como ejemplo los mamíferos, las células toman sus nutrientes de un medio como la sangre que tiene una muy fina regulación de concentraciones de aminoácidos, glucosa y otros nutrientes, que permite el mantenimiento de ellas en condiciones fisiológicas diferentes. La actividad de los sistemas transportadores en este tipo de células, aún cuando en ellas también operan la *trans*-estimulación y *trans*-inhibición, están sometidas a otros dos tipos de regulación: la regulación hormonal y el control adaptativo en condiciones de ayuno.

Las células de tumor ascítico Ehrlich constituyen un material muy conveniente para la realización de estudios citológicos y bioquímicos. Entre ellos merece especial atención, dado el carácter tumoral de la células, el estudio de la incorporación de nutrientes y su metabolismo.

En la presente Tesis se estudiaron los mecanismos de regulación del transporte de aminoácidos en células TAE, por la acción de hormonas y la respuesta adaptativa a condiciones de ayuno.

De acuerdo a esta propuesta se diseñó el siguiente plan de trabajo para el desarrollo del proyecto de investigación:

1. Estudio de las características de las células TAE.
2. Caracterización de los sistemas de entrada de aminoácidos neutros en dichas células. Determinación de los parámetros cinéticos de los sistemas de transporte.
3. Efecto de la Insulina sobre la actividad de transporte.
4. Efecto del glucagón sobre la actividad de transporte.
5. Efecto de catecolaminas y L-isoproterenol, un agonista β -adrenérgico, sobre el contenido intracelular de AMPcíclico y la actividad de transporte.
6. Caracterización de receptores β -adrenérgicos en membrana citoplasmática de células TAE.
7. Estudio de la respuesta adaptativa en condiciones de ayuno de aminoácidos en células TAE, células transformadas *in vivo*.
8. Estudio de la respuesta adaptativa en condiciones de ayuno de aminoácidos en fibroblastos normales y transformados *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

II.1 Células de tumor ascítico Ehrlich.

II.1.1 Animales de experimentación.

Las células de tumor ascítico Ehrlich (TAE) se cultivaron en ratones machos suizos albinos, cuya edad osciló entre 2 y 3 meses. Todos recibieron alimento balanceado y agua *ad-libitum*

II.1.2 Origen de las células TAE.

Las células TAE fueron provistas por la Dra. Rose M. Johnstone de la McGill University, Department of Biochemistry, Montreal, Quebec, Canada.

II.1.3 Técnica de transplante de las células tumorales.

Un ratón con desarrollo tumoral se sacrificó por dislocación cervical. Abierta la cavidad peritoneal, se inyectó aproximadamente 5 ml. de amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7,4, para una mejor remoción de las células y se recogió el ascitis con jeringa. Se lavó la cavidad peritoneal una o dos veces con el amortiguador. Se centrifugó a 2000 rpm, 2 minutos, en una centrífuga Rolco. En todas las preparaciones celulares en las que se describe una centrifugación a 2000 rpm, indica que se utilizó una centrífuga Rolco. El precipitado de células se resuspendió en el amortiguador PBS y se trasvasó a nuevos tubos de centrífuga. Durante esta operación se trató de evitar la resuspensión y recolección de los eritrocitos adheridos a la pared del tubo. El lavado se repitió luego, con amortiguador diluido 1:4 para eliminar, por lisis celular, los eritrocitos que pudieran contaminar la suspensión de células. A continuación de un último lavado con el amortiguador sin diluir, el precipitado se resuspendió en el volumen necesario de PBS, de manera de obtener una suspensión conteniendo 10^7 a $3,3 \times 10^7$ células por mililitro. Los ratones a utilizar se inocularon intraperitonealmente con 300 μ l., dejando desarrollar el tumor ascítico durante 7 días.

II.1.4 Obtención de las células TAE para la realización de los ensayos.

La técnica utilizada para la obtención de las células TAE es la indicada en II.1.3. Se reemplazó el lavado con amortiguador PBS diluido, por un nuevo lavado con el amortiguador sin diluir. Esta modificación se realizó para evitar daños a nivel de membrana, que podrían producirse al disminuir la osmolaridad de la solución de lavado. Las suspensiones celulares con alto contenido de glóbulos rojos fueron descartadas.

II.1.5 Suspensión celular de trabajo: Correlación entre número de células y peso seco.

El sedimento de células TAE se resuspendió en amortiguador PBS y se efectuaron recuentos en cámara de Neubauer.

La concentración celular se estimó diluyendo con el mismo amortiguador una alícuota de la suspensión celular (1:100) y se leyó por turbidimetría en un fotocolorímetro Crudo Caamaño (laboratorio Crudo Caamaño, Buenos Aires, Argentina) empleando filtro verde. El dato obtenido se interpoló en una curva standard trazada con concentraciones conocidas de suspensión celular. El valor de la concentración así establecido se consideró aproximado. El valor exacto se determinó en cada experimento, mediante el método patrón de pesada de una alícuota de la suspensión de trabajo, mantenida en estufa a 104°C hasta peso constante.

II.1.6 Coloración vital.

Suspensiones de células TAE de 10^5 células/ml en estabilizador osmótico salino, se incubaron a temperatura ambiente, 15 minutos con 0,2 ml de solución colorante trypan blue 0,2% (P/V) en amortiguador PBS. Al cabo de ese período se efectuaron recuentos celulares, distinguiendo células viables (no coloreadas) de no viables (coloreadas).

II.1.7 Técnicas de incubación.

Todos los experimentos se realizaron a 37°C, en un baño agitador rotatorio New Brunswick modelo G-76, con una mezcla de incubación cuya composición fue la siguiente: suspensión de células TAE (concentración necesaria para obtener 2 mg de peso seco de células por muestra), amortiguador Krebs Ringer Hepes (NaCl 0,121 M, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgSO₄ 1mM) pH 7,4 y las adiciones que se especifican en cada caso. El volumen final de esta suspensión varió en función del número de muestras a extraer.

II.1.8 Ensayos de incorporación de [¹⁴C] aminoácidos.

Luego de la adición de el [¹⁴C] aminoácido a la mezcla de incubación a tiempo T₀, se extrajeron alícuotas de 200 µl y se colocaron en tubos cónicos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad.

La reacción se detuvo por dilución con 1 ml de solución fisiológica (NaCl 0,9% (P/V)) enfriado a 0°C e inmediata centrifugación en centrifuga Eppendorf modelo 5414 (Eppendorf Gerätebau Netheler, Hamburgo, Alemania), durante 4 segundos. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos conteniendo las células se lavaron 2 veces con solución fisiológica fría antes de determinar su contenido de radiactividad.

II.1.8.1 Determinación de la radiactividad en las muestras.

Los sedimentos lavados conteniendo las células se trataron con 200 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (P/V) a 0°C. Las muestras se centrifugaron y se transfirieron cuantitativamente a viales conteniendo 5 ml de líquido de Bray (Bray, 1960) como mezcla centelladora (2,5-difeniloxazol (PPO) 4g., 1,4-bis[5-fenil-2-oxazolil]benceno (POPOP) 0,2g., naftaleno 60g., etilenglicol 20 ml, metanol 100 ml y dioxano hasta completar un litro). Las muestras así preparadas se contaron en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic modelo Delta 300.

II.1.8.2 Determinación cromatográfica de metabolitos de L-leucina y L-alanina.

Suspensiones de células TAE se incubaron con L-[¹⁴C] leucina, 2 mM y L-[¹⁴C] alanina, 1 mM, por distintos tiempos. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se descartaron. Los precipitados de células se resuspendieron en etanol 70% (v/v) a 22°C, 2 h y se centrifugaron a 1500 x g, 10 min. Los precipitados se lavaron con etanol 70% (v/v). Los sobrenadantes etanólicos se juntaron y se evaporaron a sequedad. Luego, se resuspendieron en 0,5 ml de agua. Alícuotas de 100 µl se utilizaron para la realización de la cromatografía en papel. Se empleó papel Whatman Nº 1 y 1-butanol/ácido acético/agua (50:11:25, vol) para el desarrollo del cromatograma (Hacking y Eddy, 1981). Las tiras secas de papel se procesaron según Randerath (1970) para la obtención de fluorografías. Para ello, se humedecieron con una solución de PPO 7% (p/v) en éter etílico. Una vez evaporado el solvente se colocaron en contacto con películas radiográficas y se revelaron luego de diferentes tiempos de exposición.

II.1.9 Ensayos de salida.

Para la determinación de la salida de L-leucina, una suspensión de células TAE en amortiguador Krebs Ringer Hepes se incubó con el aminoácido radiactivo (concentración final 2 mM) por distintos tiempos. El volumen total se centrifugó a 800xg, 2 minutos. El sobrenadante se descartó, el sedimento se lavó 2 veces con el amortiguador Krebs Ringer Hepes y se resuspendió hasta obtener el mismo volumen inicial. Las células cargadas con el aminoácido radiactivo se utilizaron para las incubaciones con los reactivos especificados en cada experimento.

Alícuotas de 200 µl se tomaron a partir de la suspensión celular, a distintos tiempos. Cada muestra se centrifugó y transfirió el sobrenadante a un vial conteniendo 5 ml de líquido de Bray. Los sedimentos se resuspendieron en TCA 5% (P/V) a 0°C, se centrifugaron y la radiactividad se determinó según se describe en II.1.8.

II.1.10 Medida de la concentración intracelular de AMP cíclico.

La medida de la concentración del nucleótido 3',5'-adenosina monofosfato (AMP cíclico o AMPc) se realizó por dos métodos:

II.1.10.1 Método de radioinmunoensayo.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: a alícuotas de la suspensión celular, se les agregó TCA 12% (P/V) y [³H] AMPcíclico para efectuar luego la corrección de los valores obtenidos de acuerdo a la recuperación. Las muestras se centrifugaron y se extrajeron con éter sulfúrico hasta obtener un pH 6-7. Las muestras se liofilizaron y almacenaron a -20°C. La determinación de la concentración de AMPc se realizó por radioinmunoensayo utilizando un equipo de New England Nuclear. El método se basa en el procedimiento propuesto por Steiner y col (1972). El principio básico del RIA es la competencia entre el antígeno no radiactivo (AMPc proveniente de la muestra) y el radiactivo, por un número fijo de sitios de unión al anticuerpo. El antígeno marcado es un succinil tirosina-[¹²⁵I]-metil éster derivado del AMPc. La separación del antígeno unido al anticuerpo, del antígeno libre se produce por el agregado de un segundo anticuerpo. Este último deriva de una especie animal diferente del usado para obtener el primer anticuerpo.

II.1.10.2 Método de la proteína quinasa.

La concentración endógena de AMPcíclico se determinó por el método de Brown y col, (1971).

1 Aislamiento de la proteína quinasa de adrenal bovina.

Luego de la separación de la médula, las cortezas de glándulas adrenales bovinas, se homogeneizaron, utilizando un homogeneizador tipo Polytron (Brinkmann) a 0°C, con 1,5 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, conteniendo sacarosa 0,25 M, KCl 25 mM y MgCl₂ 5mM. El homogenato se centrifugó a 2000xg durante 15 minutos. El sobrenadante de esta última centrifugación se guardó en alícuotas de 0,5 ml a -20°C. La preparación se

descongeló y diluyó con el amortiguador de trabajo (Tris-HCl 50 mM, teofilina 8 mM, 2-mercaptoetanol 6 mM, pH 7,4) (TMT) en el momento de usarse.

2 Preparación de las muestras para la determinación de AMP cíclico.

Una suspensión de células TAE preparadas como se describió en II.1.4 se utilizó en los ensayos para la determinación de AMP cíclico intracelular.

La resuspensión final se realizó en amortiguador de trabajo Krebs Ringer Hepes con el agregado de teofilina (NaCl 0,121 M, KCl 0,005 M, KH_2PO_4 0,001 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 M, Hepes 25 mM y teofilina 1mM, pH 7,4). La mezcla de incubación, constituida por la suspensión de células se incubó a 37°C, 10 minutos. Luego, cada muestra se centrifugó en tubos Eppendorf 9 segundos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en amortiguador TMT. Los tubos se colocaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Las muestras se congelaron a -20°C hasta el momento de la determinación (DeBlasi y col., 1986).

3 Ensayo para la determinación de AMP cíclico intracelular.

Las muestras obtenidas según se describió en 2 se descongelaron y centrifugaron durante 3 minutos en centrífuga Eppendorf. El sobrenadante se utilizó para efectuar la determinación. La mezcla de reacción contenía 100 μl de una dilución apropiada de la muestra, 50 μl de proteína quinasa y 50 μl de [^3H] AMP cíclico. La incubación se realizó a 0°C, 90 minutos. Finalizada la incubación, el AMP cíclico libre se separó por el agregado de 300 μl de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Luego de 30 min. a 0°C se centrifugó durante 2 min. El precipitado se resuspendió en 100 μl de agua y se agregó líquido de centelleo. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

II.1.11 Medida del contenido endógeno de aminoácidos.

Alícuotas de una suspensión celular, incubadas con o sin el agregado de diferentes compuestos, se trataron con TCA 10% (P/V) y se incubaron a 0°C durante una noche. Después de centrifugar en centrífuga Eppendorf, los precipitados se descartaron. Los sobrenadantes se extrajeron repetidas veces

con éter sulfúrico hasta la eliminación total del TCA. Las muestras se liofilizaron y almacenaron a -20°C . Las determinaciones se realizaron en un analizador automático de aminoácidos previa resuspensión de las muestras en el amortiguador de corrida.

II.1.12 Medida del contenido de [^{14}C] aminoácido incorporado a proteínas.

Para la determinación del contenido de aminoácido radiactivo incorporado a proteínas las células TAE se incubaron con el [^{14}C] aminoácido y a diferentes tiempos se tomaron alícuotas de la suspensión. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con NaCl 0,9% (P/V) a 0°C . La medida de la radiactividad incorporada en proteínas se realizó por dos métodos.

1) Método A

Los precipitados obtenidos se trataron con TCA al 5% (P/V) a 0°C . Se centrifugaron y lavaron dos veces con TCA. Los sedimentos se resuspendieron en agua y se colocaron en viales con 5 ml de líquido de centelleo Bray para la determinación de la radiactividad presente en cada muestra.

2) Método B

La determinación de [^{14}C] aminoácido en las proteínas de las alícuotas de células TAE, se efectuó por el método de Kostyo y Rillema (1971). Las muestras se centrifugaron y los precipitados de células se trataron con TCA 10% (P/V) a 0°C . Después de centrifugarlas a 2000xg por 10 minutos, los sedimentos se resuspendieron en TCA 10% (P/V) conteniendo 0,1% del aminoácido no radiactivo. Esta mezcla se mantuvo toda la noche a 0°C . Los tubos se centrifugaron a 2000xg, 10 minutos y el precipitado se resuspendió en TCA 10% (P/V). La mezcla se calentó a 85°C y se centrifugó a 2000xg, 10 minutos para remover ADN y ARN. Los lípidos fueron eliminados de las muestras por lavado de los precipitados con una mezcla éter/etanol/cloroformo (2:2:1, vol.) dos veces y una vez con acetona. Las mezclas se calentaron a 45°C durante 15 minutos en cada lavado y luego se

centrifugaron a 2000xg, 10 minutos. Los sedimentos finales se solubilizaron en NaOH 1N calentando la mezcla por 30 a 60 minutos. La radiactividad en la muestra se determinó contando una alícuota en viales con líquido de centelleo Bray.

Los valores obtenidos de aminoácido radiactivo incorporado a proteínas por ambos métodos difirieron en menos de 5%.

II.1.13 Determinación de proteínas.

El contenido de proteínas en las muestras de células TAE se determinó por el método de Lowry y col. (1951), usando albúmina bovina como standard.

II.1.14 Determinación de glucosa.

La determinación de glucosa se realizó por el método enzimático de glucosa oxidasa-peroxidasa, con colorimetría según Trinder (1969).

II.1.15 Caracterización de receptores β -adrenérgicos.

II.1.15.1 Preparación de membranas citoplasmáticas.

Para la determinación de receptores se usó una preparación de membranas citoplasmáticas de células TAE, obtenidas según Lucas y Bockaert (1977).

El precipitado de células obtenido según se describió en II.1.4, se resuspendió en una solución amortiguadora hipotónica a 0°C (Tris-HCl 25mM, EDTA 5 mM, pH 8,0). La suspensión celular se homogeneizó, utilizando un homogeneizador teflón-vidrio. La ruptura de las células se siguió por observación en microscopio.

La preparación se centrifugó a 2000 rpm, 1 minuto, obteniéndose un precipitado escaso constituido por células enteras incluidas en una masa viscosa. El agregado de ADNasa a la resuspensión de ese precipitado en amortiguador Tris-Mg (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8,0) y posterior incubación a 37°C, 5 minutos, confirmó la presencia de ADN.

El sobrenadante se centrifugó a 5000xg a 0°C, 20 minutos. El precipitado se resuspendió en amortiguador de trabajo (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 8,0 a 30°C).

II.1.15.2 Ensayos de ligado de (-) [³H] dihidroalprenolol.

La suspensión de membranas citoplasmática descrita se usó para los ensayos de receptores. El (-) [³H] dihidroalprenolol ([³H]-DHA), un potente antagonista β-adrenérgico, se utilizó como ligando para su caracterización.

La suspensión de membranas se incubó con diferentes concentraciones de [³H]-DHA a 30°C, 10 minutos. La mezcla de incubación, 400 μl, se diluyó con 4 ml de amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 20 mM, pH 8,0 a 0°C). La mezcla diluida fue rápida y cuidadosamente filtrada a través de filtros de vidrio GF/B, los que luego se lavaron dos veces con 4 ml de amortiguador. Los filtros se secaron a 50°C y se colocaron en viales con líquido de centelleo (PPO 4 g/l, POPOP 50 mg/l, TRITON X-100 20%, tolueno hasta completar 1 l). La radiactividad presente en las muestras se determinó usando un contador de centelleo líquido.

El ligado específico se definió como la diferencia entre la cantidad de [³H]-DHA pegado en ausencia y presencia de 10⁻⁵ M de propranolol. El ligado específico y no específico se determinó por triplicado y duplicado, respectivamente.

II.2 Fibroblastos normales y transformados en cultivo.

II.2.1 Origen de las líneas celulares de fibroblastos.

Se utilizaron dos líneas celulares de fibroblastos que fueron gentilmente cedidas por la Dra Estela Medrano del Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar. Una de ellas, las células Balb 3T3 clon A31-C1 7 (A-31) son fibroblastos de embrión de ratón Balb/C y la otra, BP-3T3-C17-5¹⁶ (BPA-31), provienen de las anteriores por transformación con el agente químico benzopireno.

II.2.2 Mantenimiento de las líneas celulares.

Las células crecieron en monocapa en medio mínimo Dulbecco modificado por Eagle, pH 7,4, suplementado con glutamina 4 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y suero bovino 10% (V/V), en atmósfera húmeda de CO₂ 5% a 37°C.

II.2.3 Preparación de las células para los ensayos.

Dos o tres días previos a los ensayos de transporte de [¹⁴C] aminoácidos, las células crecidas en botellas de cultivo de 75 cm², se tripsinizaron (tripsina 0,25% (P/V) en PBS, pH 7,4) y se transfirieron a cajas de cultivo de 24 pozos de 2 cm² cada uno.

II.2.4 Técnica de incubación.

Las monocapas se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina de Earle (SSE) pH 7,4. Luego, se incubaron con 1 ml de SSE, Hepes 20 mM, suero bovino 10% (V/V) dializado, por el tiempo indicado en cada ensayo, en atmósfera de CO₂ 5%. Finalizado el tiempo de incubación, la SSE se separó rápidamente de la caja de cultivo.

Para la realización de los ensayos de transporte se construyó una *tapa de experimentación* y una *tapa de lavado*, similar a las descritas por Gazzola y col (1981). Esta técnica permitió el agregado rápido y simultáneo del aminoácido radiactivo y la solución de lavado a cada uno de los 24 pozos de la caja de cultivo. Para su construcción, dos tapas se perforaron y se colocaron 24 tubos invertidos, es decir, con la boca del tubo hacia el interior de la caja (figura 2.1). La diferencia entre la tapa de experimentación y de lavado fue el tamaño de los tubos, como consecuencia de los diferentes volúmenes a utilizar en cada caso, 200 µl y 1 ml respectivamente.

II.2.5 Medida de la entrada de [¹⁴C] aminoácidos.

Las cajas preparadas como se describió en el punto II.2.4 se utilizaron para las mediciones de transporte.

La mezcla de incubación consistió en: 200 μ l de SSE, Hepes 20 mM, pH 7,4 y el aminoácido radiactivo en la concentración que se indica en cada caso. Esta mezcla se colocó en la *tapa de experimentación*, la que se transfirió por inversión sobre los 24 pozos conteniendo las células.

Las incubaciones se realizaron en baño de agua a 37°C. La reacción se detuvo por una rápida eliminación de la mezcla de incubación por una inversión. Luego se lavaron dos veces con 2 ml de solución salina (NaCl 0,9% (P/V)) usando la *tapa de lavado*

Cada monocapa se extrajo con 300 μ l de una solución de NaOH 0,2 N y dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,2 % (P/V).

La radiactividad presente en 200 μ l del extracto se transfirió a viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo Bray.

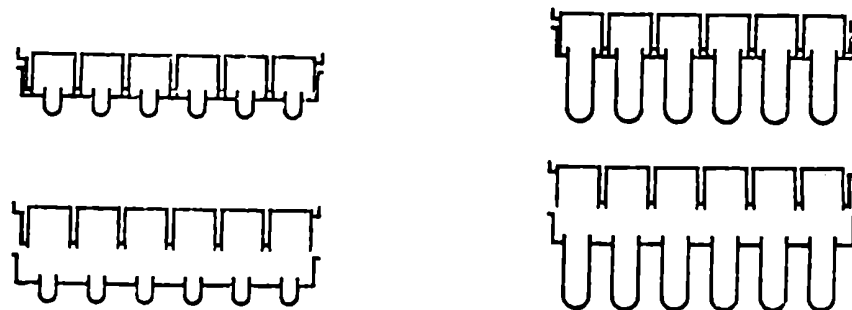


Figura 2.1 Esquema de las secciones longitudinales de la *tapa de experimentación* y *tapa de lavado* propuestas por Gazzola y col. (1981).

II.2.6 Medida de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry modificado, descrito por Markwell y col.(1978) sobre una alícuota del extracto contenido en cada pozo.

El agregado de SDS en el reactivo alcalino y el incremento en la concentración del tartrato de cobre, en el método original de Lowry, permite usar la reacción en preparaciones de membrana y lipoproteínas sin previa solubilización o extracción de lípidos. Además, la presencia del SDS previene la formación de precipitados cuando se usa preparaciones de membrana tratadas previamente con detergentes.

II.3 Origen y calidad de las drogas utilizadas.

Acido α -aminoisobutírico, ácido α -metilaminoisobutírico, adrenalina (epinefrina), ADNasa I, L-alanina, albúmina bovina, dibutirilAMPcíclico, EDTA, L-fenilefrina, fentolamina, glucagón, α -D(+)-glucosa, 2-deoxi-D glucosa, Hepes, L-isoproterenol, L-leucina, PPO, DL-propranolol, SDS, teofilina y trizma base de Sigma Chemical Company, St. Louis, EEUU.

Actinomicina D y el equipo de determinación de glucosa de Boehringer Mannheim, Alemania.

POPOP de Nuclear Chicago, Mass., EEUU.

Etilenglicol, éter sulfúrico de Merk, Darmstadt, Alemania.

Insulina bovina, cedida por los laboratorios Ely Lilly.

Medio mínimo Dulbecco modificado por Eagle, suero bovino de GIBCO.

Equipo de radioinmunoensayo para AMPcíclico, L-[^{14}C (U)]-leucina, L-[^{14}C (U)] alanina, ácido α -[1- ^{14}C]- aminoisobutírico, ácido α -[1- ^{14}C]- metilaminoisobutírico, (-)[^3H] dihidroalprenolol, [5,6- ^3H]uridina de New England Nuclear, EEUU.

RESULTADOS

III Características generales del tumor ascítico Ehrlich.

El tumor se desarrolló intraperitonealmente como un ascitis viscoso. El volumen del líquido evacuado de los ratones, con un desarrollo del tumor de 7 días, fue de $7,3 \pm 0,5$ ml (n=40). Su pH era $6,93 \pm 0,14$ (n=10).

En general, los fluidos extraídos eran una suspensión celular homogénea. En algunos casos se observó la presencia de eritrocitos en grado variable que fueron eliminados previamente a la realización de los ensayos de transporte (Materiales y Métodos II.1.3).

La determinación de glucosa en el fluido ascítico, por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa indicó la presencia de concentraciones por debajo de los niveles detectables. El valor de la glucemia en los ratones antes de ser inoculados fue de 7,6 mM (136 mg%). La inoculación posterior de células TAE produjo una disminución en los niveles de glucosa en la sangre, que fue de 3,4 mM (61 mg%) luego de un desarrollo del tumor de 7 días.

Además, en la incubación de las células con glucosa, se observó simultáneamente con la disminución de su concentración, una marcada acidificación del medio externo (tabla 3.1)

Tabla 3.1 Consumo de glucosa y modificación del pH extracelular en células TAE durante la incubación con glucosa.

Tiempo de incubación (min)	Concentración de glucosa (mM)	pH externo
0	5,0	7,4
10	3,68	6,8
20	2,92	6,5
30	2,52	6,1

Células TAE se incubaron en presencia de glucosa 5 mM. A los distintos tiempos se midió el pH del medio de incubación y se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de glucosa por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa, descrito en Materiales y Métodos.

Tabla 3.2: Determinación de los niveles de L-aminoácidos en las células del tumor ascítico Ehrlich (TAE) y en el fluido ascítico.

Aminoácido	Concentración de aminoácidos (nM)		Relación Células/Fluido
	células	Fluido ascítico	
L-lisina	0,49	0,12	4,0
L-histidina	0,56	0,10	5,6
L-arginina	0,11	0,024	4,6
L-treonina	2,12	0,17	12,5
L-serina	0,58	0,045	12,9
L-ac. glutámico	3,49	0,063	55,4
L-prolina	4,09	0,15	27,3
glicina	5,50	0,19	28,9
L-alanina	7,76	0,34	22,8
L-valina	1,40	0,20	7,0
L-isoleucina	0,39	0,057	6,8
L-leucina	0,75	0,11	6,8
L-tirosina	0,21	0,024	8,8
L-fenilalanina	0,39	0,046	8,5

Células TAE y fluido ascítico extraído de los ratones se procesaron según II.1.11 de Materiales y Métodos. El contenido de L-aminoácidos libres en cada muestra se obtuvo utilizando un analizador automático de aminoácidos.

En la tabla 3.2 se presentan los valores de la concentración de aminoácidos en las células y la correspondiente en el fluido ascítico. La relación [AA] intracelular/[AA] en fluido para cada aminoácido indica la existencia de un proceso de acumulación de aminoácidos. El valor de la acumulación está relacionado con la estructura del aminoácido y a su vez, con el sistema de transporte que utiliza para su entrada. Así, L-lisina, L-histidina y L-arginina, aminoácidos que utilizan el sistema y⁺ para aminoácidos catiónicos, presentan una relación entre 4,1 y 5,6. L-prolina, glicina y L-alanina utilizan el sistema A para aminoácidos neutros, observándose una relación comprendida entre 22,8 y 28,9. L-valina, L-isoleucina, L-leucina y

L-fenilalanina son transportados por el sistema L para aminoácidos neutros y presentan un cociente células/fluido cuyos valores varían entre 6,8 y 8,5.

IV Sistemas de transporte en células TAE.

IV.1 Caracterización del sistema L de transporte.

IV.1.1 Estudio del proceso de incorporación de L-leucina.

La incorporación de L-aminoácidos de cadena larga, ramificados o con anillos aromáticos a las células eucariotas se realiza por el sistema L, como se describió en la Introducción. Para el estudio del proceso de incorporación por este sistema se elige el aminoácido L-leucina, el cual se caracteriza por su lento metabolismo intracelular.

En la figura 4.1 se observan los resultados del estudio de la incorporación de L-leucina en células TAE, concentraciones externas comprendidas entre 0,05 y 4,0 mM. Para la concentración 2 mM se llega a un estado estacionario, casi a los 20 minutos de incubación con el aminoácido. El valor de incorporación a ese tiempo es de 38,90 μ moles de L-leucina/ g.p.s..

Teniendo en cuenta que en estas condiciones experimentales la L-leucina permanece homogéneamente distribuida como tal en el reservorio soluble y considerando que el volumen de agua intracelular es de 3,47 μ l/mg.p.s. (Hacking, C. y Eddy, A. A., 1981) se puede calcular su concentración que es de 11,5 mM. Este valor indica que las células han realizado un proceso de acumulación de L-leucina ya que la concentración intracelular es 5 veces la concentración externa.

IV.1.2 Incorporación de L-leucina en proteínas.

En la figura 4.2 se observa la cinética de incorporación total de L-leucina, concentración externa 2 mM y de la incorporación del aminoácido a proteínas, esta última obtenida como la marca presente en la fracción ácido precipitable según se describió en Materiales y Métodos.

A tiempos de incubación menores de 5 minutos, no se observa incorporación del aminoácido a proteínas. A partir de ese tiempo, la L-leucina presente en el precipitado aumenta hasta alcanzar a los 20 minutos de

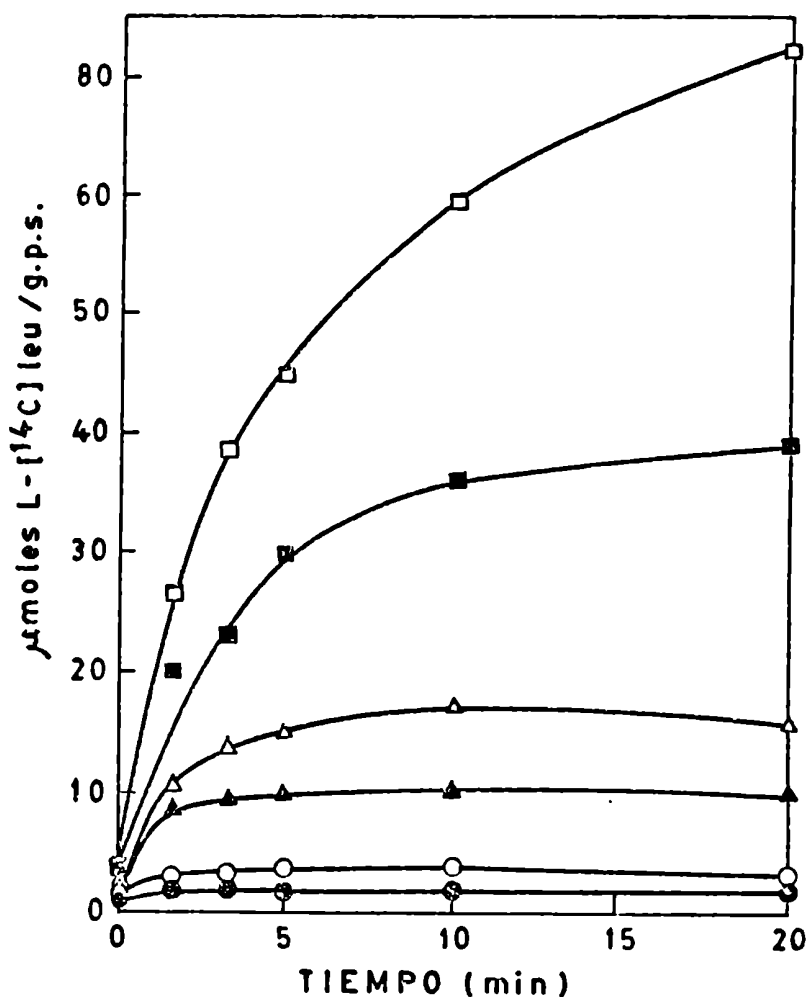


Figura 4.1 Incorporación de L-leucina en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hapes, pH 7,4, se incubaron en presencia de L-[¹⁴C] leucina (●) 0,06 mM, (○) 0,10 mM, (▲) 0,50 mM, (△) 1,0 mM, (■) 2,0 mM y (□) 4,0 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 200 μl que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular, según se describió en Materiales y Métodos.

Incubación un valor de 1,33 μmoles/g.p.s., que representa el 5 por ciento de aminoácido total, incorporado a la célula.

La detección cromatográfica de metabolitos de L-leucina se realizó como se describió en Materiales y Métodos. La identificación de compuestos

marcados radiactivamente en el cromatograma indicó la presencia de un único componente, identificado como el aminoácido L-leucina. Estos resultados se observaron aún hasta los 20 minutos de incubación de las células con el aminoácido.

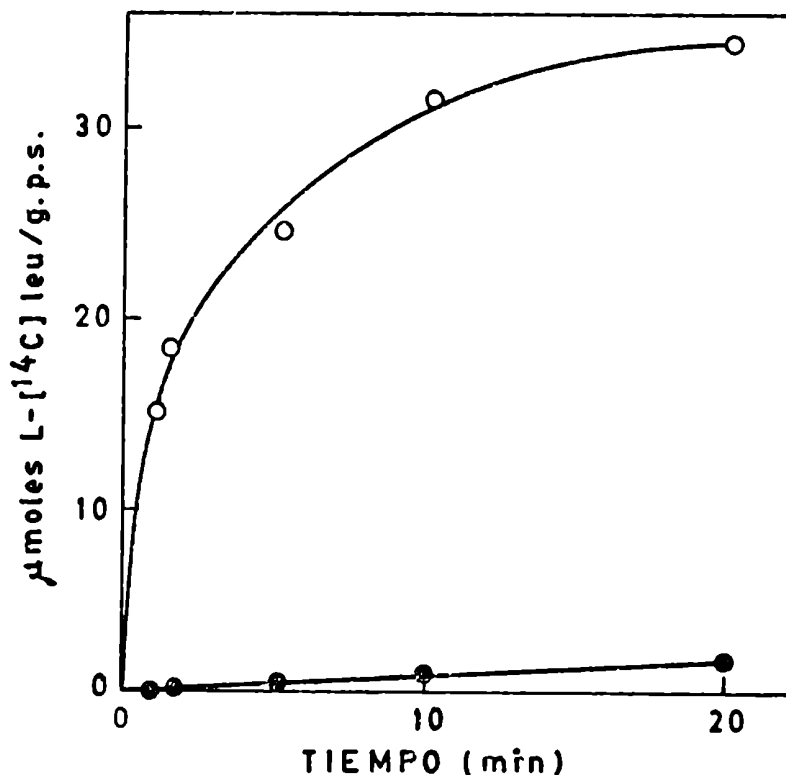


Figura 4.2 Incorporación de L-leucina en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hapes, pH 7,4, se incubaron con L-[¹⁴C] leucina 2,0 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular (○) y la incorporada a proteínas (●) luego del tratamiento con TCA.

IV.1.3 Estudio del proceso de entrada de L-leucina.

El trazado de la cinética de los valores de incorporación de L-leucina en las células TAE fue lineal hasta aproximadamente los 2 minutos para una

concentración externa del aminoácido de 2 mM, como se observa en la figura 4.2. Teniendo en cuenta estos resultados la medida de la incorporación a tiempos cortos puede considerarse como la medida del proceso de entrada.

Por lo tanto, se eligieron como condiciones experimentales para la determinación de la entrada, incubaciones de 90 segundos y concentración externa de L-leucina 2mM.

En la figura 4.3 se presenta los valores de la velocidad de entrada de L-leucina en función de la concentración externa del aminoácido. El trazado hiperbólico indica la operación de un proceso saturable.

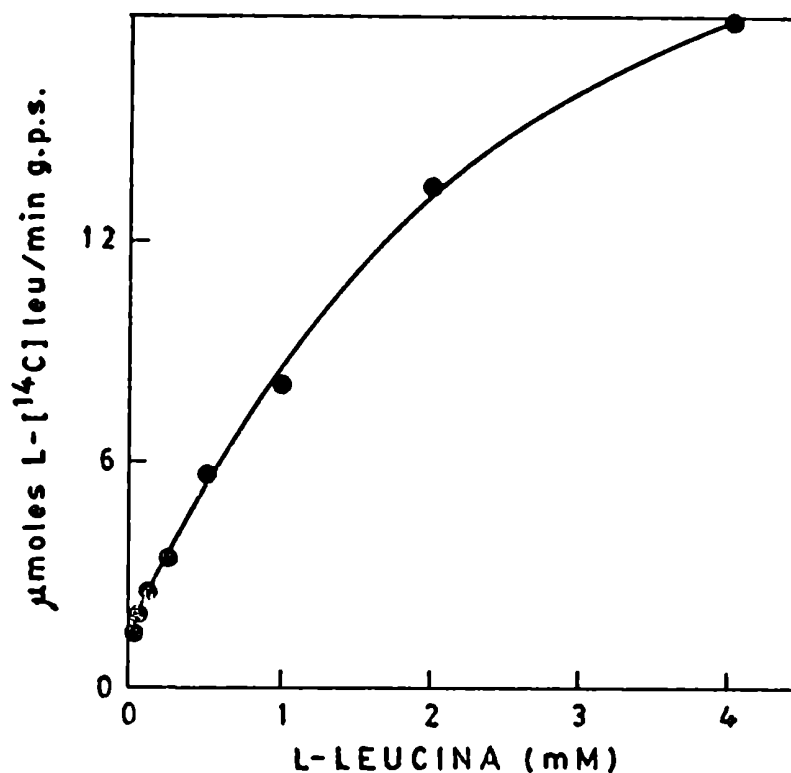


Figura 4.3 Relación entre la velocidad de entrada de L-leucina y la concentración externa del aminoácido.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hapes, pH 7,4, se incubaron en presencia de L-[¹⁴C] leucina en concentraciones externas crecientes (0,06 a 4,0 mM). A los 90s se tomaron alícuotas y se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

IV.1.4 Determinación de los parámetros cinéticos.

El análisis cinético de la entrada de L-leucina a través de la membrana plasmática puede hacerse a partir de los resultados presentados en la figura 4.3.

En general, la velocidad de entrada de un aminoácido (aa) está definida por:

$$v = \frac{V_{\text{máx}} \cdot S}{K_m + S} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

S: concentración de aminoácido.

$V_{\text{máx}}$: velocidad máxima

K_m : concentración de aminoácido para la cual $v = \frac{V_{\text{máx}}}{2}$

La ecuación 1 se puede reordenar en:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{máx}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

o ecuación de Lineaweaver-Burk.

La figura 4.4 es la representación gráfica de la ecuación 2 para el aminoácido L-leucina y del cual se calculó los valores de los parámetros cinéticos $K_m = 0,56 \text{ mM}$ y $V_{\text{máx}} = 14,0 \text{ } \mu\text{moles/ min.g.p.s.}$. La linealidad de la representación indica la existencia de un único sistema de transporte cinéticamente caracterizable.

IV.2 Caracterización del sistema A de transporte.

IV.2.1 Estudio del proceso de incorporación.

La incorporación de L-aminoácidos de cadena corta o de cadena lateral no ramificada es mediada por el sistema A de transporte, en la mayoría de las células eucariotas estudiadas. La denominación de sistema A se debe a que el aminoácido L-alanina es preferentemente transportado por él. En razón que

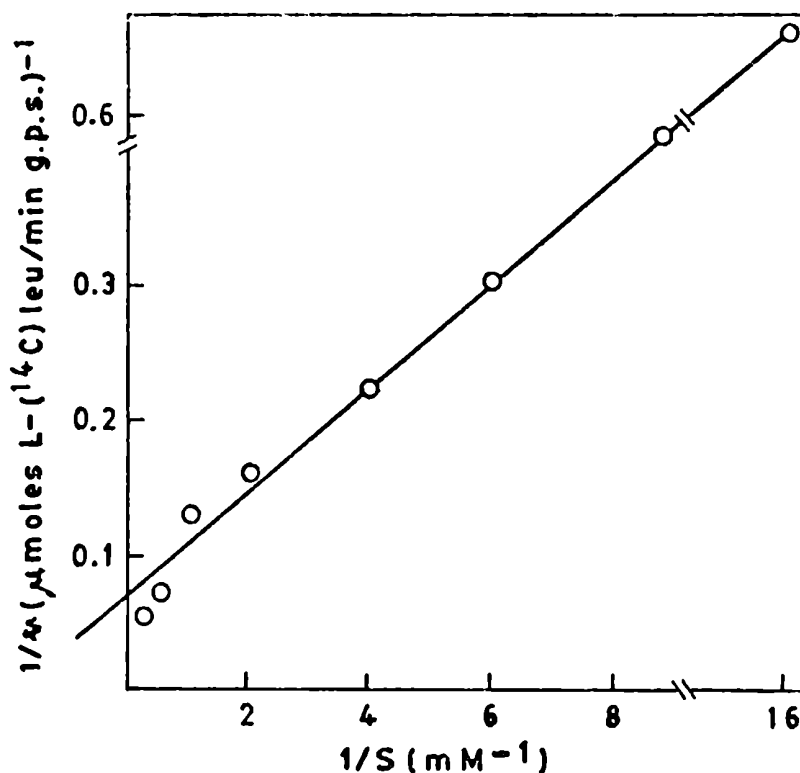


Figura 4.4 Relación entre la velocidad de entrada de L-leucina y la concentración externa del aminoácido.

Los valores de las inversas de la velocidad de entrada de L-leucina (v) y de la concentración externa del aminoácido (s) se calcularon a partir de los datos representados en la figura 4.3.

este aminoácido es metabolizado rápidamente por las células, se utilizan compuestos sintéticos análogos no metabolizables para asegurar que el proceso estudiado sea exclusivamente el de transporte. Dos son las sustancias que reúnen los requisitos necesarios para su uso en la caracterización del sistema A. Una de ellas es el ácido α -aminoisobutírico (α -AIB); la otra es el ácido α -metilaminoisobutírico (α -MeAIB). Este último presenta mayor afinidad por el sistema A como consecuencia del grupo metilo presente en el grupo α -amino, el cual además le confiere la propiedad de no ser transportado por los otros sistemas transportadores de aminoácidos neutros.

Para la caracterización del sistema A se estudió la incorporación de los tres aminoácidos mencionados anteriormente: L-alanina, α -AIB y α -MeAIB. En las figuras 4.5a, 4.6a y 4.7 se presentan las cinéticas de incorporación para cada uno de ellos a diferentes concentraciones externas del aminoácido correspondiente.

Como se describió para L-leucina, se observa una relación lineal entre la incorporación y el tiempo para los primeros minutos. Además, teniendo en cuenta el valor de agua intracelular (3,47 μ l/ mg.p.s.) y calculando la concentración citoplasmática de cada uno de estos aminoácidos (tabla 4.1) se observa que las células realizan un proceso de acumulación: 16 veces para α -MeAIB, 17 para α -AIB y 21 veces para L-alanina. A su vez si se comparan el dato de L-alanina con el de L-leucina (IV.1.1) es unas 4 veces más concentrativo.

Tabla 4.1 Determinación de la relación entre la concentración interna y externa para L-alanina, α -AIB y α -MeAIB.

Aminoácido	Concentración interna (mM)	Concentración externa (mM)	Relación int./ext.
L-alanina	20,9	1	21
α -AIB	17,2	1	17
α -MeAIB	15,7	1	16

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se incubaron con L-[14 C] alanina, α -[14 C] AIB o α -[14 C] MeAIB 1 mM durante 1 min.. La determinación del aminoácido radiactivo intracelular se realizó según se describió en Materiales y Métodos.

Una de las características del sistema A es que su actividad depende de la concentración extracelular de sodio. En las figuras 4.5b y 4.6b se muestran las curvas de incorporación en presencia y ausencia de sodio de L-alanina y α -AIB. Los valores de incorporación de estos aminoácidos en un medio libre de sodio, reemplazado por cloruro de colina, permite el cálculo de la fracción incorporada por el sistema L, ya que esta no es dependiente de la presencia de sodio.

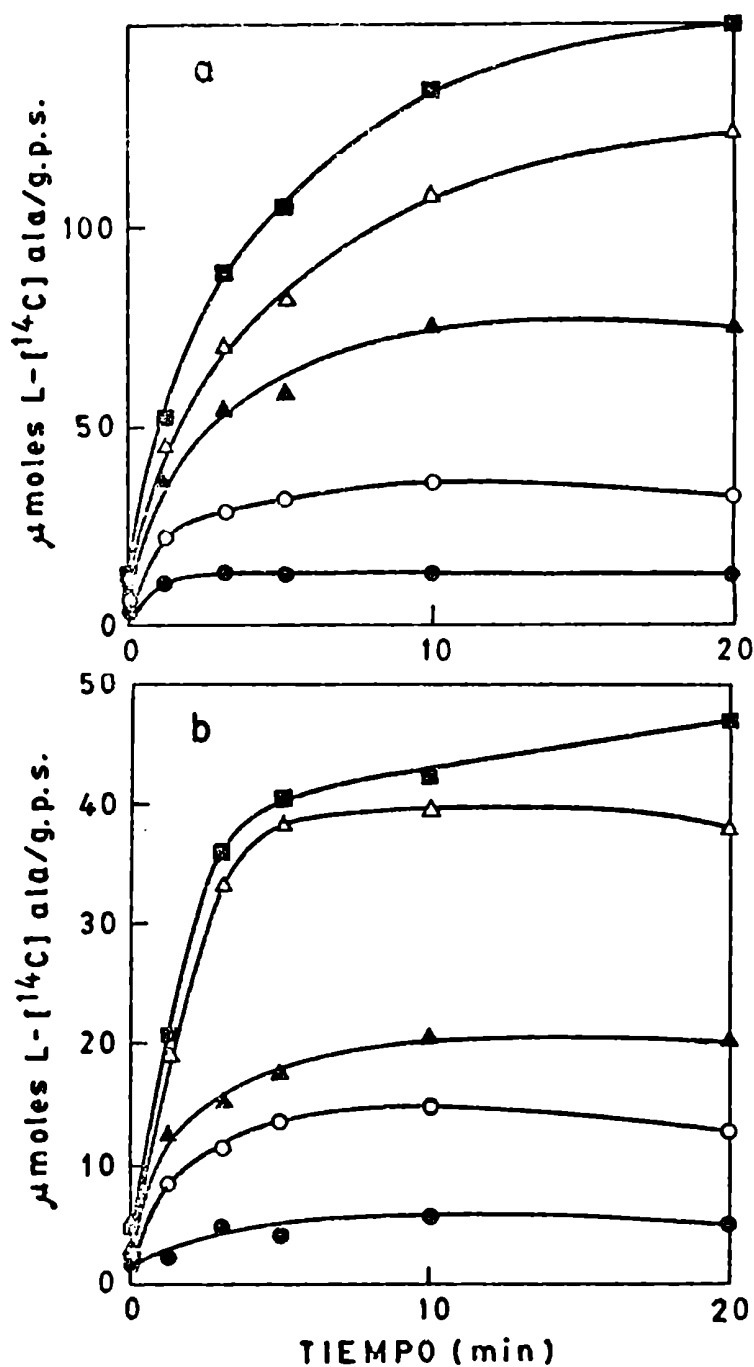


Figura 4.5 Incorporación de L-alanina en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 (a) o en el mismo amortiguador sin Na^+ , reemplazado por cloruro de colina (b), se incubaron en presencia de L-[^{14}C] alanina (\bullet) 0,15 mM, (\circ) 0,50 mM, (\blacktriangle) 1,0 mM, (\triangle) 2,0 mM y (\blacksquare) 4,0 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

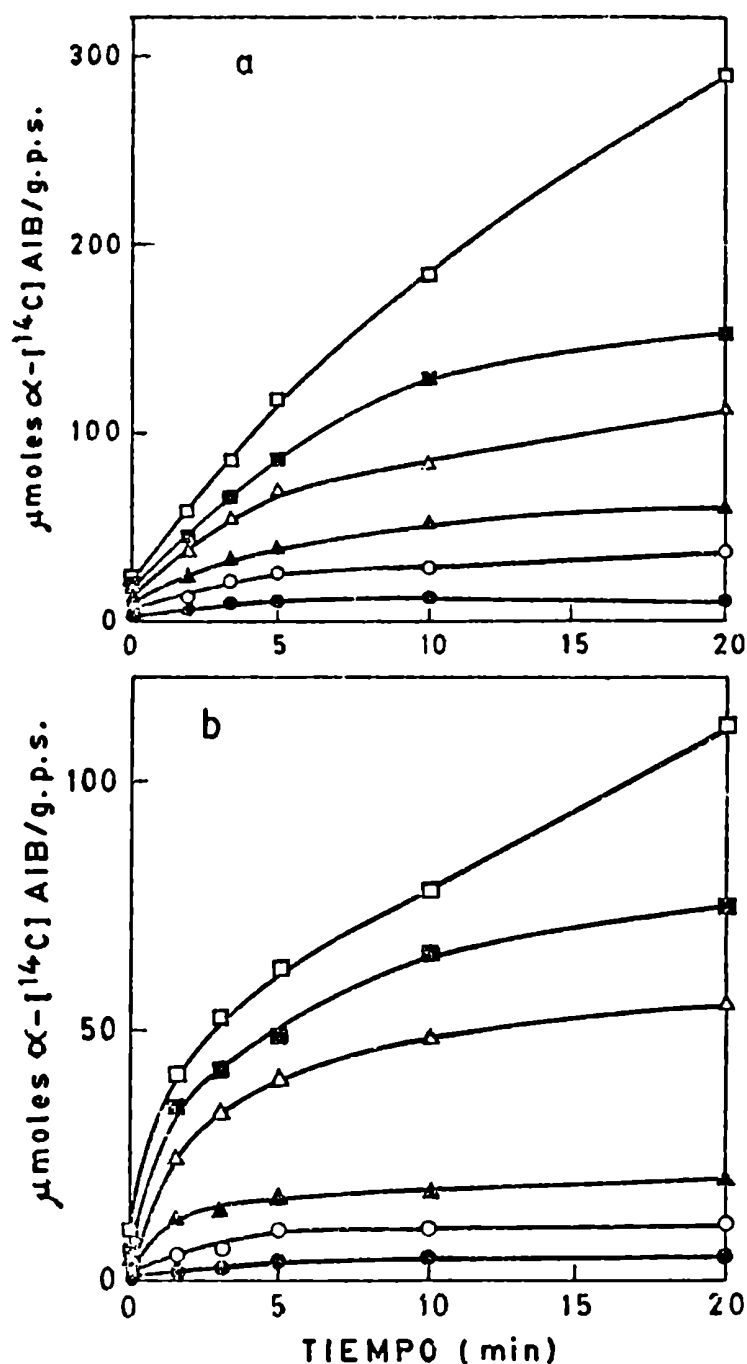


Figura 4.6 Incorporación de α -AIB en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 (a) o en el mismo amortiguador sin Na^+ , reemplazado por cloruro de colina (b), se incubaron en presencia de α -[^{14}C] AIB (●) 0,10 mM, (○) 0,50 mM, (▲) 1,0 mM, (△) 2,0 mM, (■) 4,0 mM y (□) 8,0 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

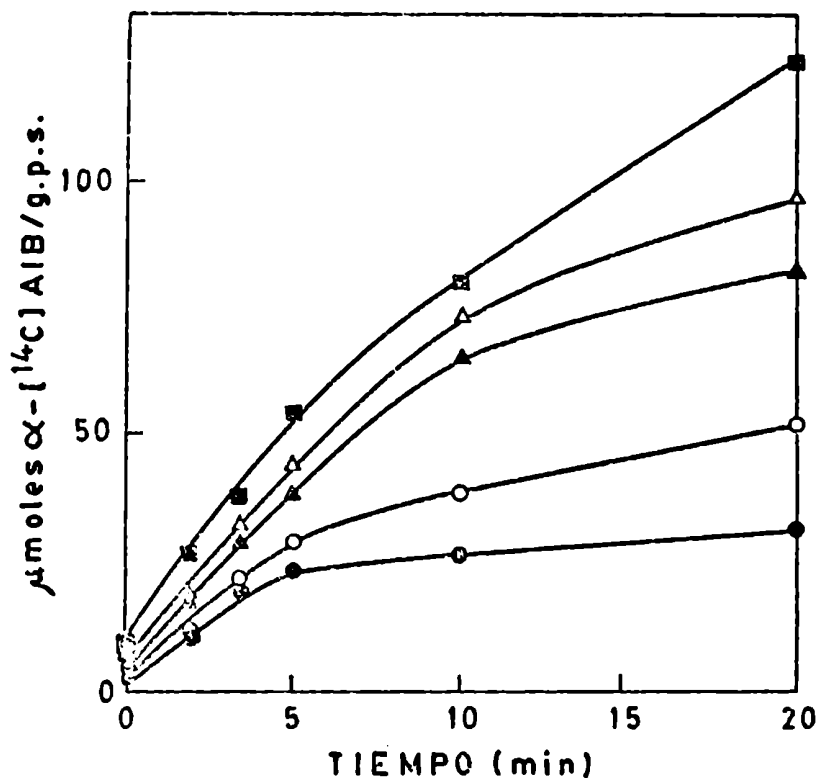


Figura 4.7 Incorporación de α -MeAIB en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 se incubaron en presencia de α - ^{14}C MeAIB (●) 0,5 mM, (○) 1,0 mM, (▲) 2,0 mM, (△) 4,0 mM y (■) 8,0 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

IV.2.2 Incorporación de los aminoácidos del sistema A en proteínas.

En la figura 4.8 se observa la incorporación celular de L-alanina 1 mM y su presencia en proteínas, obtenido como marca presente en la fracción ácido precipitable (ver Materiales y Métodos). Hasta el tiempo máximo estudiado, 20 minutos, no se observa incorporación significativa del aminoácido a proteínas. Similares resultados se obtuvieron para los análogos α -AIB y α -MeAIB, concentración externa 1 mM.

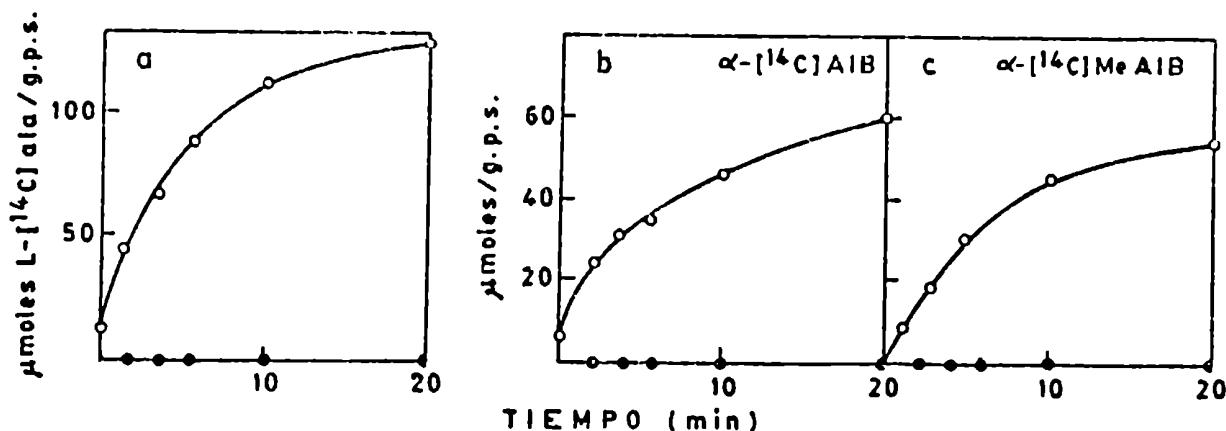


Figura 4.8 Incorporación de L-alanina, α -AIB y α -MeAIB en proteínas.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepar, pH 7,4 se incubaron con L-[^{14}C] alanina (a), α -[^{14}C] AIB (b) y α -[^{14}C] MeAIB (c), concentración final 1 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular (○) y la incorporada a proteínas (●) luego del tratamiento con TCA.

La identificación cromatográfica de metabolitos de L-alanina en un extracto celular señala la presencia de un único compuesto correspondiente al aminoácido radiactivo que se incorpora.

IV.2.3 Estudio del proceso de entrada.

Un análisis similar al realizado para L-leucina (IV.1.3), permitió determinar las condiciones experimentales para la medida de la entrada de los aminoácidos transportados por el sistema A. Ellos son: concentración extracelular 1 mM y tiempo 1 minuto. En la figura 4.9 se muestra la velocidad de entrada en función de la concentración externa de L-alanina, α -AIB y α -MeAIB. Todos ellos presentan curvas hiperbólicas indicando el funcionamiento de un proceso de entrada saturable. Además, L-alanina alcanza el valor de saturación a una concentración externa que es menos de la mitad de la requerida para α -AIB y α -MeAIB.

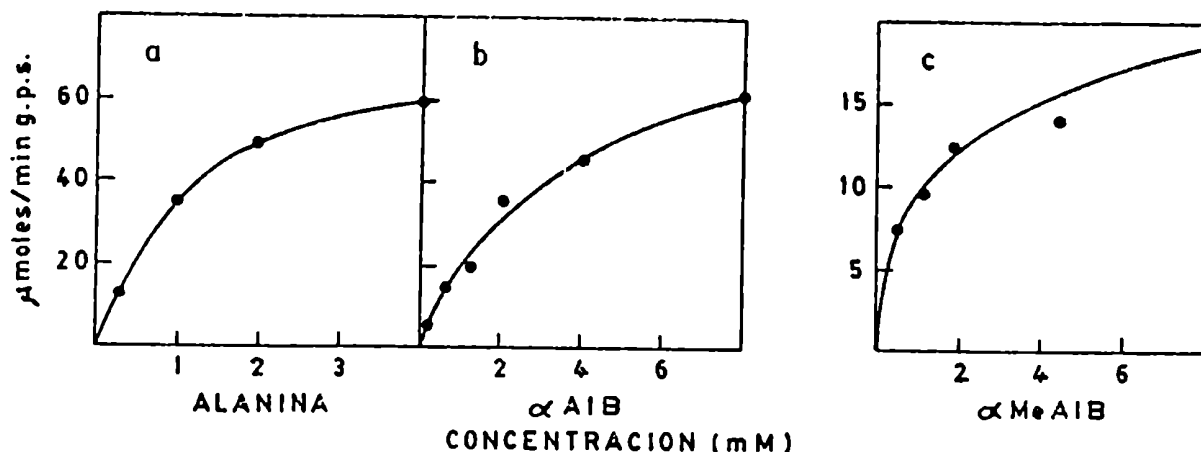


Figura 4.9 Relación entre la velocidad de entrada de L-alanina, α -AIB y α -MeAIB y su concentración externa.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 se incubaron en presencia de concentraciones externas crecientes de (a) L-[14 C] alanina: 0,25 a 4,0 mM, (b), α -[14 C] AIB: 0,1 a 8,0 mM y (c) α -[14 C] MeAIB: 0,5 a 8,0 mM. Luego de 1 min de incubación se tomaron alícuotas y se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

IV.2.4 Determinación de los parámetros cinéticos.

Aplicando la ecuación 2, descrita en IV.1.4, a los datos presentados en la figura 4.9 se calculó los valores de los parámetros cinéticos para L-alanina, α -AIB y α -MeAIB. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 4.2

IV.3 Identificación de los sistemas de transporte.

La incorporación de la mayoría de los L-aminoácidos neutros en las células animales es el resultado de la actividad de varios sistemas

de transporte, que operan simultáneamente o no, dependiendo de la afinidad de cada aminoácido por su transportador y también de las condiciones del medio.

Experimentalmente, puede dividirse la entrada total de un aminoácido en los siguientes componentes: sistemas A, ASC y L.

Tabla 4.2 Parámetros cinéticos del sistema A en células TAE.

Aminoácido	K_m (mM)	$V_{máx}$ (μ moles/min.g.p.s.)
L-alanina	0,66	60,28
α -AIB	1,54	58,14
α -MeAIB	0,80	16,26

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los datos de las figuras 4.5, 4.6 y 4.7

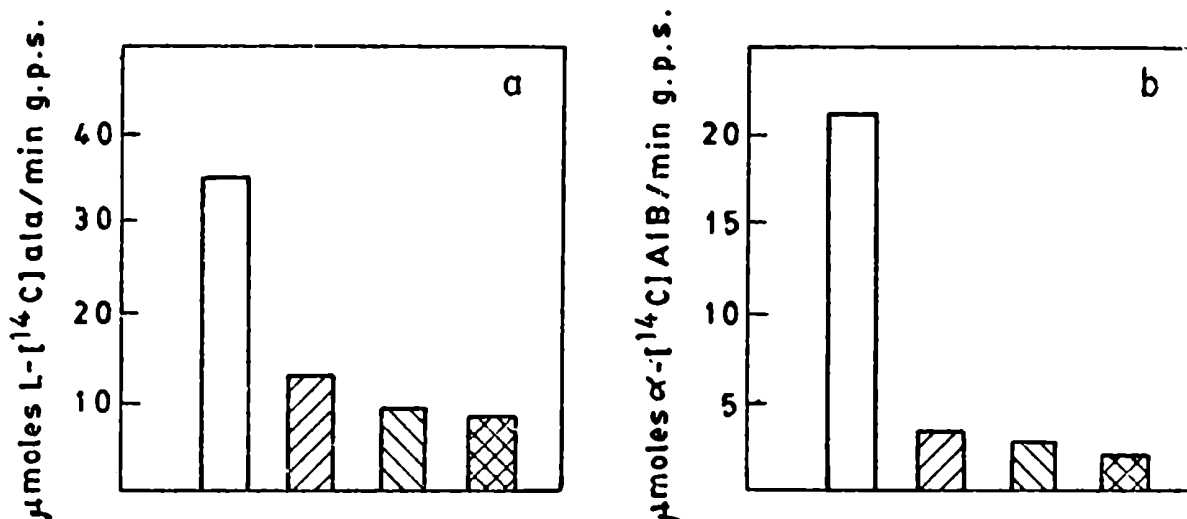


Figura 4.10 Efecto de diferentes concentraciones de α -MeAIB sobre la entrada de L-alanina y α -AIB.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 se incubaron durante 1 min con L-[14 C] alanina (a) o con α -[14 C]AIB (b), concentración final 1 mM, con los siguientes agregados: (\square) sin agregado, (diagonal lines) α -MeAIB 5 nM, (horizontal lines) α -MeAIB 10 nM, (cross-hatched) α -MeAIB 25 mM. Las muestras tomadas se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

En el método de Shotwell (1981), para discriminar que fracción del valor de la entrada total del aminoácido es mediada por cada sistema, se considera que corresponde: 1) al sistema A al valor determinado en un medio conteniendo Na^+ , inhibido por α -MeAIB 25 mM; 2) al sistema ASC, el valor

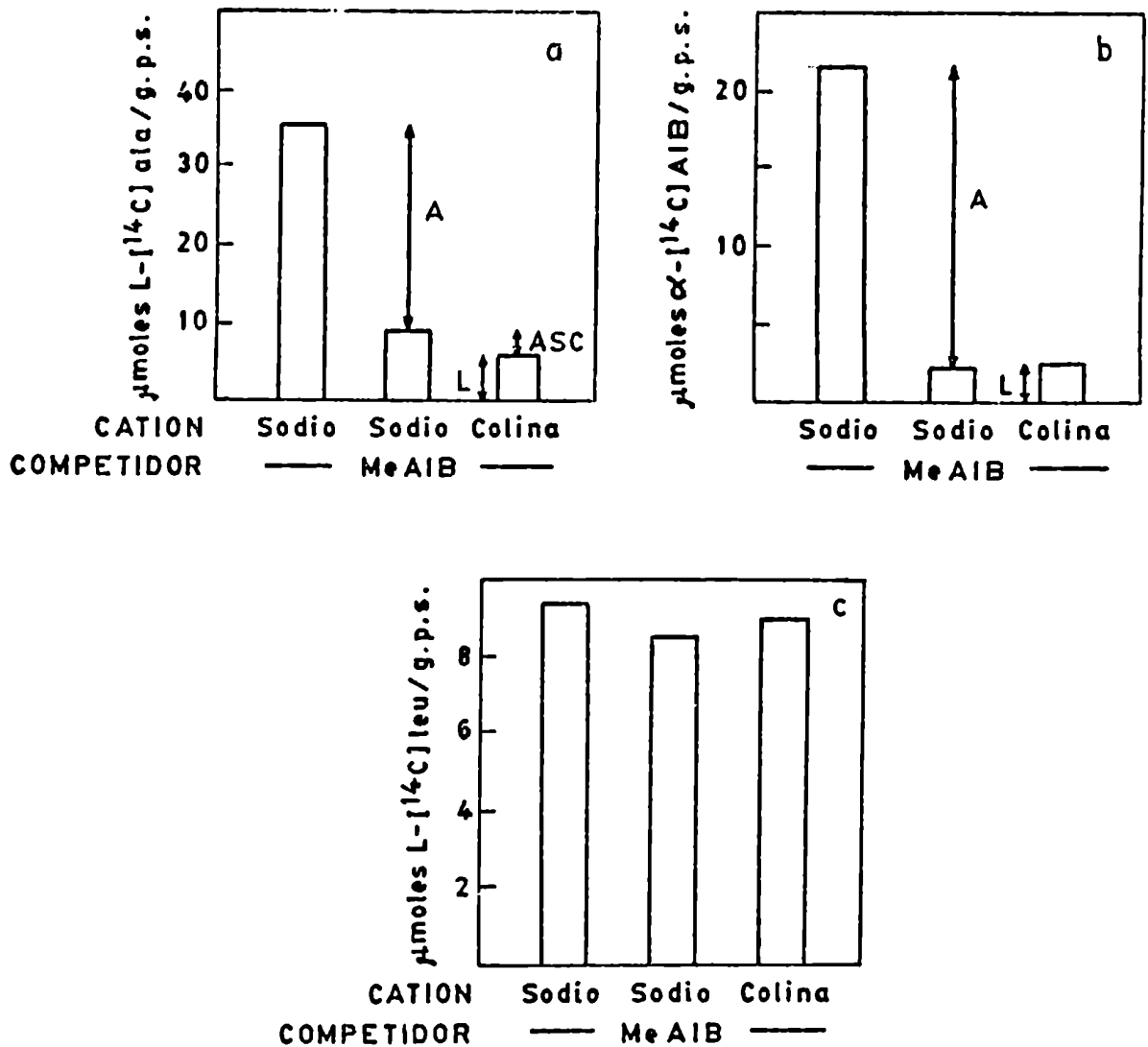


Figura 4.11 Participación en la entrada total de L-alanina, α -AIB y L-leucina de cada uno de los sistemas de transporte para aminoácidos neutros.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4 se incubaron con L-[^{14}C] alanina (a) y α -[^{14}C]AIB (b), concentración final 1 mM, 1 min, o con L-[^{14}C] leucina (c), concentración final 2 mM, 90 s, en ausencia o presencia de α -MeAIB 10 mM. Cuando las incubaciones se realizaron en ausencia de sodio, el NaCl del amortiguador se reemplazó por cloruro de colina para mantener la osmolaridad del medio extracelular. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular. La participación de los sistemas A, ASC y L se realizó según se describió en Resultados (IV.3).

Na^+ -dependiente no inhibido por α -MeAIB y 3) al sistema L el valor medido en un medio libre de Na^+ .

Con el fin de utilizar este diseño experimental se determinó previamente para L-alanina y α -AIB, la concentración de α -MeAIB capaz de producir la máxima inhibición. Como se observa en la figura 4.10 concentraciones iguales o mayores de 10 mM producen este efecto.

La determinación de la participación de cada uno de los sistemas mencionados, en la entrada total de los aminoácidos L-leucina, L-alanina y α -AIB se presentan en la figura 4.11. Para el aminoácido L-alanina, el 73 por ciento de la entrada total la realiza por el sistema A, mientras que un 10 por ciento y un 17 por ciento, lo hace utilizando los sistemas ASC y L respectivamente. En cambio, el α -AIB, entra a la célula preferentemente por el sistema A (89 por ciento). El resto del aminoácido lo hace únicamente por el sistema L (11 por ciento), no utiliza el sistema ASC. Para L-leucina se observa que el sistema L es la principal vía de entrada a la célula.

V. Efecto de la insulina y glucagón sobre el transporte de aminoácidos en células TAE.

V.1 Efecto de la insulina sobre la actividad del sistema L y del sistema A.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de concentraciones crecientes de insulina sobre el transporte de L-leucina (sistema L) y α -AIB (sistema A), se presentan en la figura 5.1. Se observa que en las células TAE las mayores concentraciones de la hormona inhibieron parcialmente la entrada del aminoácido L-leucina pero no hubo modificación para el α -AIB. El efecto de insulina 1,7 μM , a distintos tiempos de incubación en las células se muestra en la figura 5.2a. Los resultados indican que cuando las células se incuban con la hormona, se produce una disminución de la entrada de L-leucina. Este efecto no ocurre en forma inmediata, sino que requiere 30 minutos para su expresión y continúa hasta que la incubación se completó a 60 minutos. Por el contrario, los resultados presentados en la figura 5.2b

indican que el tratamiento con insulina, en las condiciones experimentales anteriores, no modifica la entrada de α -AIB.

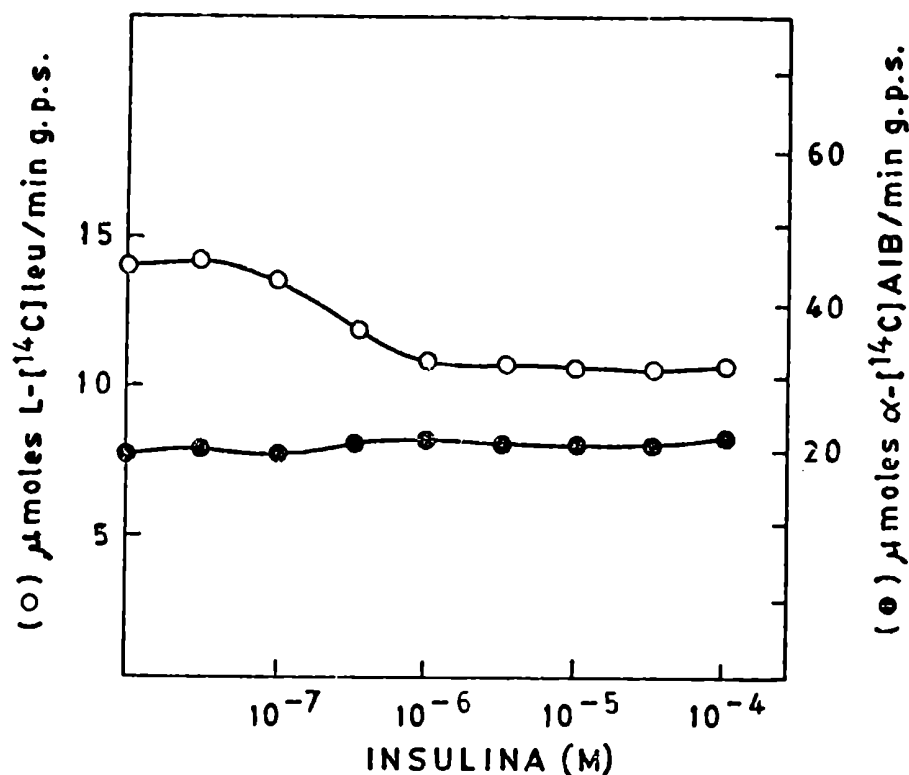


Figura 5.1 Efecto de la insulina sobre la entrada de L-leucina y α -AIB.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se preincubaron con diferentes concentraciones de insulina, según se indica en la abscisa, durante 60 min. Luego se incubaron con L-[¹⁴C] leucina, 2 mM, 90 s (○) o con α -[¹⁴C]AIB 1 mM, 1 min (●). Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

Los parámetros cinéticos del proceso de entrada de L-leucina se estudiaron utilizando una concentración externa de insulina de 1,7 μ M, tiempo de incubación 60 minutos y diferentes concentraciones externas de L-leucina. Como se observa en la tabla 5.1, las constantes cinéticas K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para las células control y las tratadas con insulina no difieren significativamente.

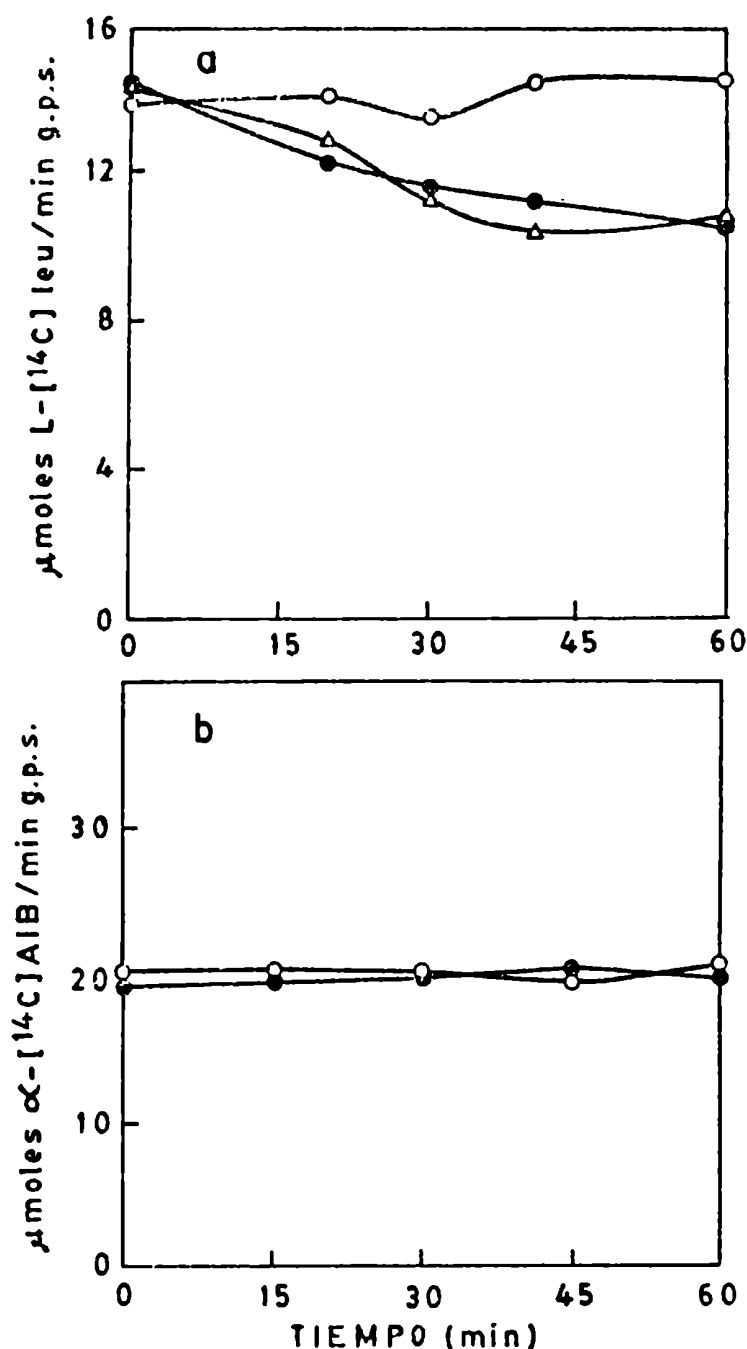


Figura 5.2 Entrada de aminoácidos en células TAE incubadas con Insulina por diferentes tiempos.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se incubaron en ausencia (O) o presencia de insulina 1,7 μM , en los 60 min (●) o sólo los 15 min iniciales de incubación (Δ). A los distintos tiempos se tomaron alícuotas y se incubaron con: (a) L-[¹⁴C] leucina, 2 mM, 90 s o (b) α -[¹⁴C] AIB 1 mM, 1 min. Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

Tabla 5.1 Efecto de la insulina sobre los parámetros cinéticos de la entrada de L-leucina.

Agregado	Km (mM)	V _{máx} (μ moles/min.g.p.s.)
--	0,24	5,03
Insulina 1,7 μ M	0,25	5,37

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hapes, pH 7,4, se incubaron sin o con insulina con concentraciones crecientes de L-[¹⁴C]leucina (0,05 a 4,0 mM) por 90 s. La determinación del aminoácido radiactivo intracelular se realizó según se describió en Materiales y Métodos.

V.1.2 Relación entre el efecto de la insulina sobre la entrada de L-leucina y el tiempo de exposición a la hormona.

Para estudiar la dependencia con el tiempo del efecto de la insulina sobre el transporte de L-leucina, las células TAE se expusieron en forma continua o sólo durante los primeros 15 minutos a la hormona. Los resultados obtenidos se presentan en la ya mencionada figura 5.2a. Como puede observarse, la disminución del transporte de L-leucina es similar en las dos condiciones experimentales.

V.1.3 Efecto de la insulina sobre el eflujo de L-leucina.

Con objeto de conocer si la disminución de la entrada de L-leucina es debido a un menor influjo o más bien a un incremento del eflujo de L-leucina al medio extracelular, se investigó el efecto de la hormona sobre la salida del aminoácido. Para ello, células previamente cargadas con L-[¹⁴C]leucina se incubaron, con o sin insulina y se midió la liberación al medio de incubación del aminoácido marcado a distintos tiempos, como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5.3. Se observa que, tanto en las células control como en las tratadas con la hormona, los valores de salida del aminoácido no difieren significativamente. De esta manera puede descartarse la posible acción de la hormona sobre el eflujo de aminoácidos que son transportados por el sistema L.

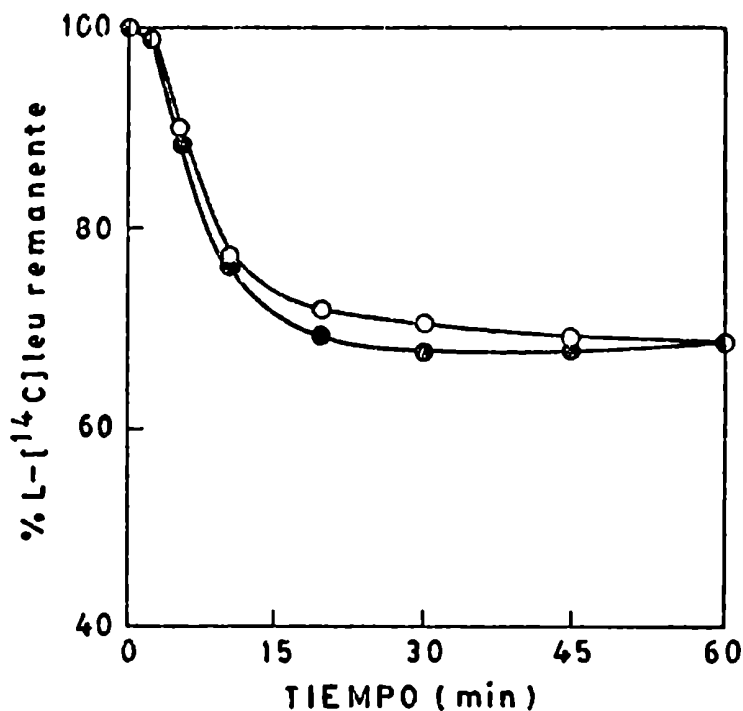


Figura 5.3 Efecto de la insulina sobre la salida de L-leucina en células TAE.

La salida de L-[¹⁴C] leucina se midió como se describió en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas y se determinó el contenido de radiactividad intracelular. Los resultados se expresan como porcentaje de la L-[¹⁴C] leucina remanente en (○) células control y (●) células incubadas con insulina 1,7 μM.

V.1.4 Efecto de la insulina sobre la concentración intracelular de AMPcíclico.

En células TAE se determinó la concentración intracelular de AMP cíclico luego de la incubación con la hormona durante 60 minutos. Los resultados obtenidos no difieren de los valores de las células control. Células control: $6,9 \pm 0,6$ nmoles/g. prot.; células tratadas con insulina: $6,9 \pm 1,2$ nmoles/g. prot..

V.1.5 Participación de la síntesis de proteína.

En células incubadas con insulina, la incorporación de L-leucina a proteínas es mayor que en células control, como se observa en los datos presentados en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Efecto de la preincubación con insulina sobre la síntesis de proteínas.

Agregado	Tiempo (min)	$\mu\text{moles L-[}^{14}\text{C]leu/ g. prot.}$
--	60	6,95 \pm 0,09
insulina 1,7 μM	60	9,04 \pm 0,06

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se incubaron con L-[^{14}C]leucina 2 mM, en ausencia o presencia de insulina 1,7 μM . Al tiempo indicado se tomaron alícuotas que se procesaron según los métodos A y B descritos en Materiales y Métodos. Los datos presentados corresponden al método A.

De acuerdo a los resultados descriptos: aumento de la síntesis proteica y disminución del transporte de L-leucina en células preincubadas con insulina, se decidió investigar la posible relación entre ambos efectos. La incubación simultánea de la hormona con un inhibidor de la síntesis proteica como la cicloheximida podría demostrar esa conexión. Sin embargo, el efecto *per se* del inhibidor produce un aumento del 23 por ciento de la entrada de L-leucina, como se observa en la tabla 5.3.

V.1.6 Contenido intracelular de aminoácidos.

Con el propósito de obtener más información sobre la relación entre el proceso de síntesis de proteínas y la actividad del sistema de transporte de L-leucina se determinó la concentración intracelular de aminoácidos en células control e incubadas con insulina. Los valores obtenidos se presentan en la tabla 5.4. En las células tratadas con la hormona se observa una

disminución de la concentración de los aminoácidos libres intracelulares respecto de los valores hallados en células control.

Tabla 5.3 Efecto de la preincubación con cicloheximida sobre la entrada de L-leucina.

Agregado	tiempo (min.)	Entrada μmoles L-leu/min.g.p.s.
--	60	17,69 \pm 0,08
cicloheximida 0,1 mM	60	21,8 \pm 0,7

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se preincubaron con o sin cicloheximida 0,1 mM. Al tiempo indicado se tomaron alícuotas que se incubaron con L-[14 C]leucina 2 mM, 90 s. El contenido de radiactividad de las muestras se determinó según se describió en Materiales y Métodos.

Considerando los aminoácidos que son transportados por el sistema L, los niveles de L-leucina, L-isoleucina, L-valina y L-fenilalanina, disminuyeron en 36, 28, 28 y 50 por ciento respectivamente.

V.2 Efecto del glucagón sobre la actividad de los sistemas A y L.

El efecto del glucagón sobre la actividad de los sistemas A y L se realizó con la misma metodología empleada para insulina.

Suspensión de células TAE se incubaron con distintas concentraciones de glucagón y la medida de la actividad del transporte de α -AIB y L-leucina se determinó a distintos tiempos. En la figura 5.4 se presentan los resultados obtenidos. La entrada por el sistema A y el sistema L no se modificó por la incubación con la hormona en las condiciones experimentales utilizadas.

Tabla 5.4 Efecto de la incubación con insulina sobre la concentración endógena de aminoácidos.

Aminoácido	Control (mM)	Tratadas con insulina (mM)	Relación insulina/control
L-lisina	0,48	0,23	0,48
L-histidina	0,44	0,21	0,48
L-arginina	0,07	0,04	0,49
L-ac. aspártico	1,67	2,11	1,26
L-treonina	1,45	0,81	0,56
L-serina	0,61	0,17	0,28
L-ac. glutámico	2,35	1,25	0,53
L-prolina	1,68	0,68	0,40
L-alanina	1,90	2,39	1,26
L-valina	0,32	0,23	0,72
L-isoleucina	0,12	0,09	0,72
L-leucina	0,28	0,18	0,64
L-treonina	0,26	0,16	0,62
L-fenilalanina	0,25	0,13	0,50

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, sin o con el agregado de insulina 1,7 μ M, durante 60 min., se procesaron para la determinación de la concentración endógena de aminoácidos, según se describió en Materiales y Métodos.

VI Efecto de catecolaminas sobre el transporte de aminoácidos en células TAE.

VI.1 Niveles endógenos de AMP cíclico en células incubadas con catecolaminas.

Cuesta Casado y Ramos (1981) demostraron la funcionalidad del mecanismo de síntesis y degradación del AMP cíclico en células TAE, mediante la determinación de la actividad de las enzimas adenilato ciclasa y fosfodiesterasa.

Cuando células TAE se incubaron con concentraciones crecientes de adrenalina durante 10 minutos, se produjo un incremento gradual en el contenido intracelular del AMP cíclico.

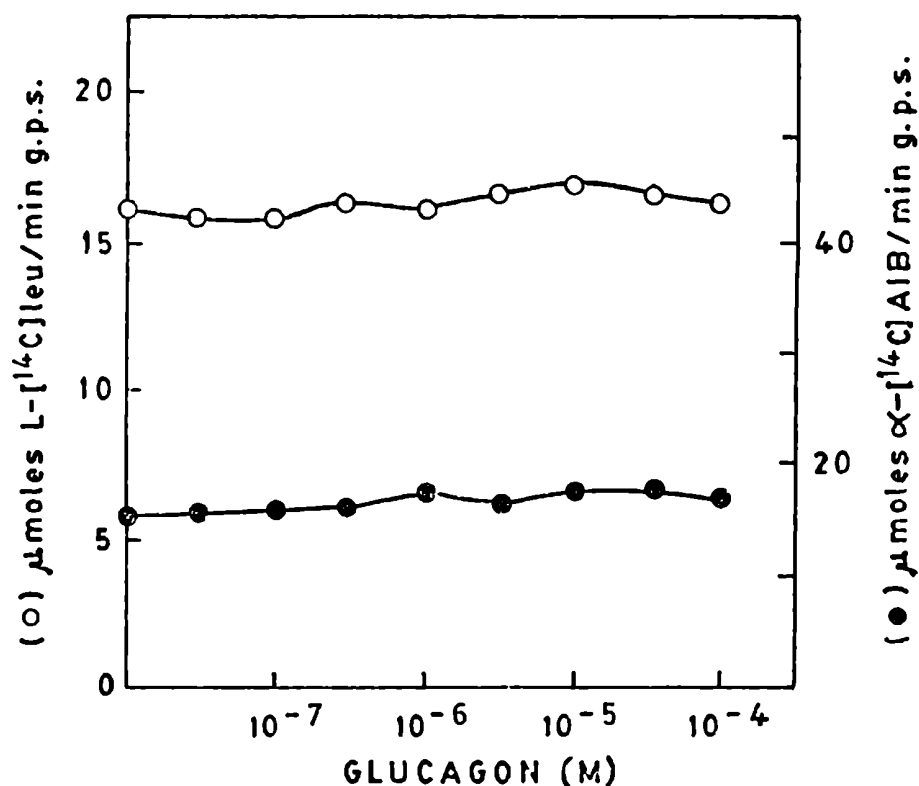


Figura 5.4 Efecto de glucagón sobre la entrada de L-leucina y α -AIB.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se preincubaron con diferentes concentraciones de glucagón, según se indica en la abscisa, durante 60 min. Luego se incubaron con L-[^{14}C] leucina, 2 mM, 90 s (O) o con α -[^{14}C]AIB 1 mM, 1 min (●). Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

La máxima estimulación se observó para una concentración de adrenalina de 10^{-6} M obteniéndose un aumento del 35 por ciento en el contenido del nucleótido cíclico en las células tratadas respecto del control (tabla 6.1).

La incubación de las células TAE con L-Isoproterenol (10^{-7} a 5×10^{-5} M)

produjo un incremento máximo de la concentración de AMP cíclico del 44 por ciento como se observa en la misma tabla.

Tabla 6.1 Concentración Intracelular de AMPcíclico en células TAE incubadas con adrenalina y L-isoproterenol.

Agregado		AMP cíclico (pmoles/mg. prot.)
--		9,1±1,5
Adrenalina	1 0 ⁻⁸ M	9,7±0,2
Adrenalina	5 x 10 ⁻⁸ M	10,1±0,6
Adrenalina	10 ⁻⁷ M	13,3±1,4
Adrenalina	5 x 10 ⁻⁷ M	13,4±1,1
Adrenalina	10 ⁻⁶ M	14,0±1,0
Adrenalina	5 x 10 ⁻⁶ M	14,0±0,7
--		8,3±0,4
L-isoproterenol	10 ⁻⁷ M	10,0±1,5
L-isoproterenol	5 x 10 ⁻⁷ M	12,3±0,6
L-isoproterenol	10 ⁻⁶ M	14,5±1,9
L-isoproterenol	5 x 10 ⁻⁶ M	14,8±0,5
L-isoproterenol	5 x 10 ⁻⁵ M	14,8±0,4

Células TAE, resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de adrenalina o L-isoproterenol. Luego de 10 min. a 37 °C se tomaron muestras que se procesaron según se describió en Materiales y Métodos para la determinación de la concentración intracelular de AMPcíclico.

VI.2 Caracterización de receptores β -adrenérgicos.

En células TAE no se ha descrito la presencia de receptores β -adrenérgicos en la membrana celular. Por lo tanto, se consideró importante la investigación de la existencia y caracterización de los mismos en esas células.

Para ello se trabajó con una suspensión de membranas, obtenidas según se describió en Materiales y Métodos. En las suspensiones de membranas se midió el ligado de dihidroalprenolol (DHA) en diferentes concentraciones

(1,47 a 35 nM) durante 10 minutos a 30°C. El ligado específico se determinó como la diferencia entre la cantidad de DHA pegada en ausencia y presencia de 10^{-5} M de propranolol.

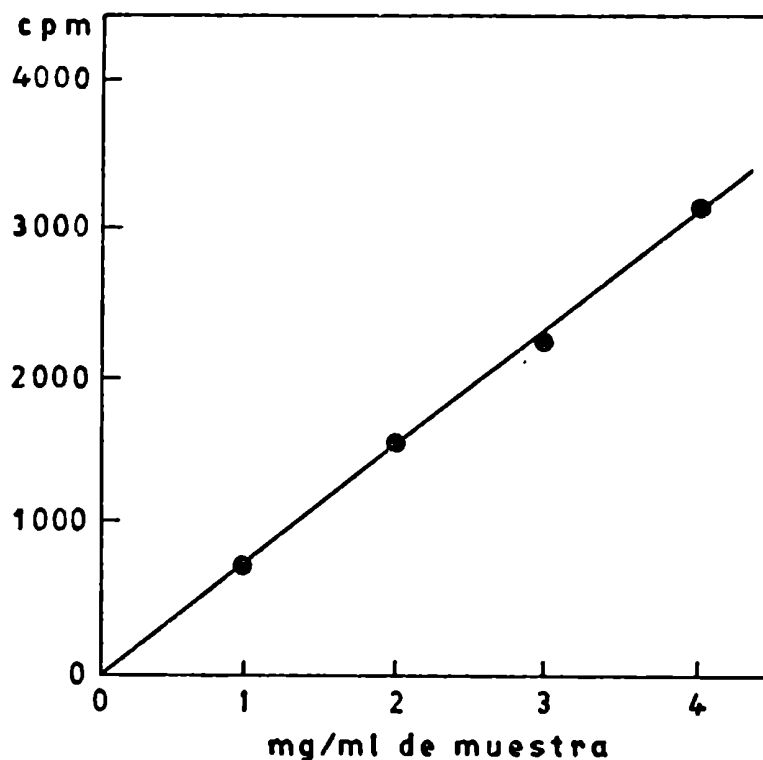


Figura 6.1 Curva de concentración de tejido para el ligado de dihidroalprenolol.

Suspensión de membranas en concentraciones según se muestra en la abscisa se incubaron con [3 H] DHA 2,9 nM, a 30°C, 10 min. Las muestras de 300 μ l se procesaron para la determinación de la radiactividad como se describe en Materiales y Métodos.

La concentración de membranas, así como el tiempo de incubación se eligieron previamente en base a los datos obtenidos y mostrados en las figuras 6.1 y 6.2 respectivamente.

Los resultados se evaluaron por medio del método de Scatchard (1949) (figura 6.3). La constante de disociación, K_d , del complejo DHA-receptor se

determinó a partir de la pendiente del gráfico anterior, obteniéndose un valor de 6,15 nM. El número de sitios de ligado es de 29,6 pmoles/g.prot..

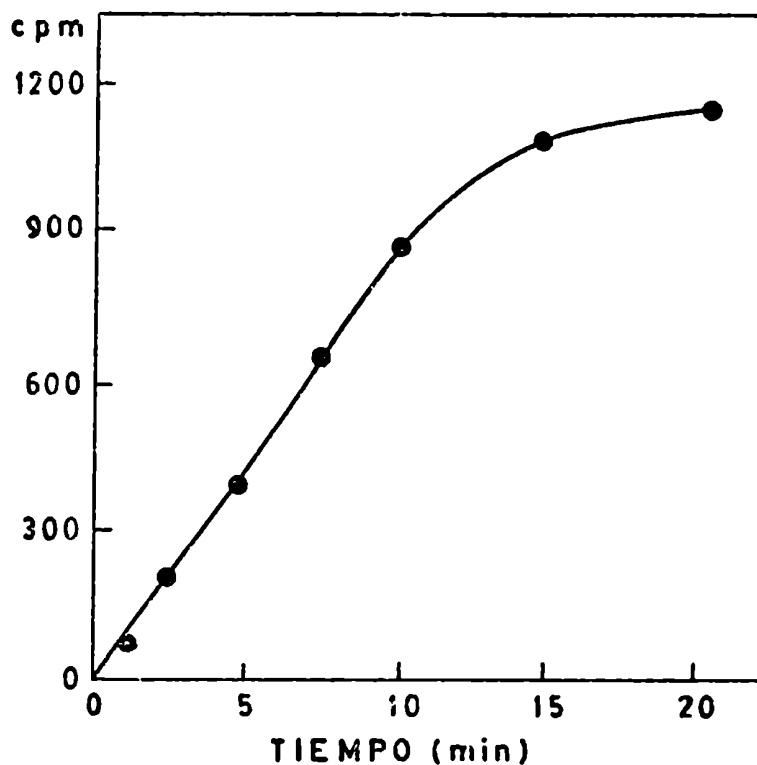


Figura 6.2 Curva de tiempo para la asociación de dihidroalprenolol a los sitios de unión en membranas de células TAE.

Una suspensión de membranas de células TAE (1,30 mg/ml) se incubó con [3 H] DHA 2,9 nM, a 30°C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, según se indica en la abscisa. Las muestras se procesaron para la determinación del contenido de radiactividad.

En la tabla 6.2 se muestran los valores de las constantes de inhibición, K_I y de CI_{50} para diferentes agonistas y antagonistas β -adrenérgicos.

VI.3 Efecto de catecolaminas sobre el transporte de aminoácidos.

Con el propósito de indagar el efecto de las catecolaminas sobre el transporte, se realizaron incubaciones por distintos tiempos para diferentes

concentraciones de adrenalina (10^{-8} a 10^{-5} M) y L-isoproterenol (10^{-7} a 10^{-3} M).

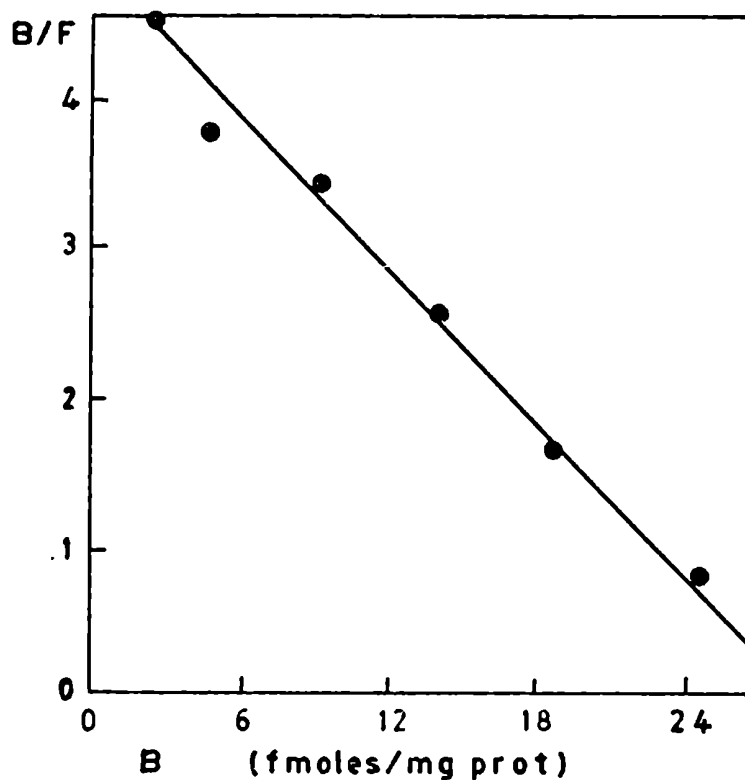


Figura 6.3 Determinación de K_d y del número máximo de sitios de ligado para dihidroalprenolol en membranas de células TAE.

Una suspensión de membranas de células TAE se incubó con concentraciones crecientes de [3 H] DHA (1,47 a 35 nM) a 30°C, 10 min. Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad. Los valores de ligado se utilizaron para la construcción del gráfico de Scatchard (K_d 6,15 nM y número máximo de sitios de unión 29,6 pmoles/g prot.)

En la figura 6.4 se observan los valores de transporte para L-leucina y α -AIB en las distintas condiciones.

Las incubaciones tanto con adrenalina y L-isoproterenol no mostró efecto sobre el transporte para el sistema A ni el sistema L, si comparamos los valores obtenidos para las células control y las tratadas.

Similares resultados se obtuvieron al realizar incubaciones con dibutiril AMP cíclico

Tabla 6.2 Determinación de las constantes de inhibición (K_i) y de las dosis inhibitorias 50 (CI 50) para los diferentes agonistas y antagonistas.

Agregado	K _i (M)	CI 50 (M)
propranolol	5,0 x 10 ⁻⁹	1,2 x 10 ⁻⁸
L-isoproterenol	6,4 x 10 ⁻⁶	1,6 x 10 ⁻⁵
adrenalina	3,7 x 10 ⁻⁵	9,0 x 10 ⁻⁵
noradrenalina	3,7 x 10 ⁻⁴	9,0 x 10 ⁻⁴
dopamina, serotonina y fenilefrina		>10 ⁻³

El ligado de [³H]DHA se determinó en suspensiones de membranas en presencia de concentraciones crecientes del agonista o antagonista, luego de la incubación por 10 min. a 30°C (propranolol: 10⁻⁸ a 10⁻⁵ M; L-isoproterenol: 10⁻⁸ a 10⁻⁴ M; adrenalina y noradrenalina: 10⁻⁸ a 10⁻⁴ M; dopamina, serotonina, fenilefrina 10⁻⁷ a 10⁻³ M).

VII Mecanismo de regulación adaptativa por ayuno de aminoácidos.

La investigación del control adaptativo se realizó en dos tipos de células: 1) en células TAE y 2) en fibroblastos en cultivo.

VII.1 Control adaptativo del transporte de aminoácidos en células TAE.

Para conocer el efecto sobre la actividad de los sistemas transportadores, en células TAE, del ayuno de aminoácidos, se incubaron durante 4 horas en un medio libre de aminoácidos.

En la determinación de la entrada de α-AIB y L-leucina a distintos tiempos (figura 7.1) no mostró diferencia significativa en los resultados obtenidos, indicando la ausencia de regulación adaptativa en esas condiciones experimentales. En algunas líneas celulares es indispensable, para observar una respuesta al ayuno de aminoácidos, la presencia de suero dializado en el

medio de incubación. Con el propósito de indagar si estas células eran también suero-dependientes, se realizó el ensayo agregando suero fetal bovino dializado, así como también fluido ascítico dializado (obtenido de los ratones utilizados para crecer las células). Como se observa en la figura 7.1 en ninguna de estas condiciones experimentales se evidencia la existencia de regulación adaptativa en células TAE.

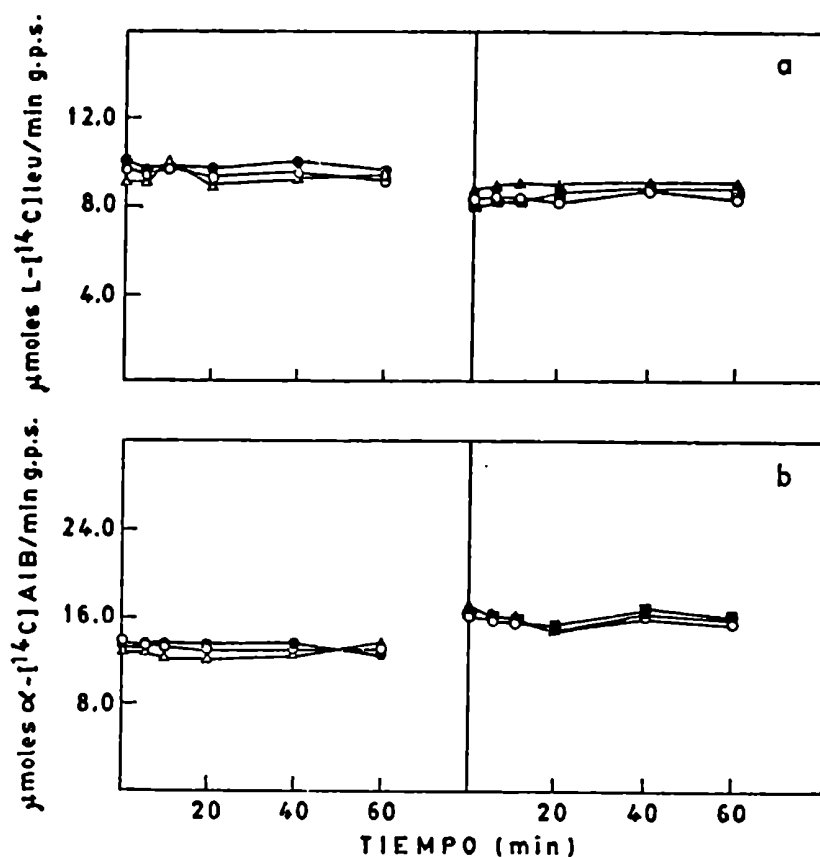


Figura 6.4 Efecto de catecolaminas sobre el transporte de L-leucina y α -AIB.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hapes, pH 7,4, se preincubaron en ausencia (○) o presencia de adrenalina (10^{-8} mM (●) a 10^{-5} mM (▲)) o L-isoproterenol (10^{-7} mM (▲) a 10^{-3} mM (□)). A distintos tiempos se tomaron alícuotas y se incubaron con (a) L-[¹⁴C] leucina, 2 mM, 90 s o con (b) α -[¹⁴C]AIB 1 mM, 1 min. Las mismas se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular. Tanto para adrenalina como para L-isoproterenol se graficaron los valores de entrada de L-leu y α -AIB para la menor y mayor concentración. Los datos para concentraciones intermedias fueron similares.

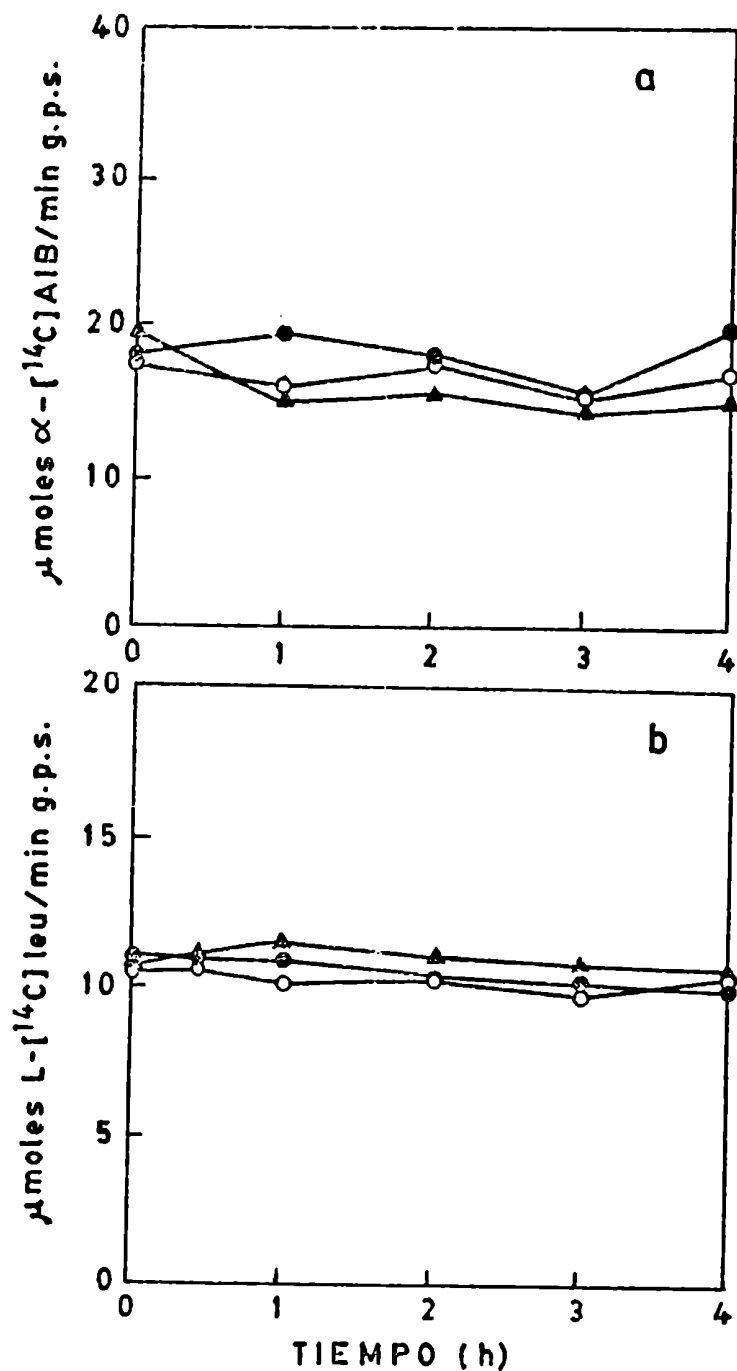


Figura 7.1 Efecto del ayuno de aminoácidos en los sistemas A y L en células TAE.

Células TAE resuspendidas en amortiguador Krebs Ringer Hepes, pH 7,4, se incubaron en ausencia (▲) o en presencia de (○) suero fetal bovino dializado 10% (v/v) o (◐) fluido ascítico dializado 10% (v/v). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se incubaron con α -[^{14}C]AIB 1 mM, 1 min (a) o con L-[^{14}C] leucina, 2 mM, 90 s (b) y luego se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

VII.2 Caracterización de los sistemas de transporte en fibroblastos normales y transformados.

Para el análisis cinético de la entrada de L-leucina y α -AIB, este último en ausencia y presencia de α -MeAIB (para discriminar entre la entrada por el sistema A y ASC como se explicó en IV.3), se utilizaron fibroblastos normales A-31 y transformados BPA-31.

En la figura 7.2, el gráfico de las inversas $1/v$ vs $1/s$, indica la existencia de un único sistema de transporte a través de membrana. Los valores calculados de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$, se presentan en la tabla 7.1.

Tabla 7.1 Parámetros cinéticos de los sistemas A, L y ASC en fibroblastos A-31 y BPA-31.

	Fibroblastos			
	A-31		BPA-31	
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ moles/min. g. prot.)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (μ moles/min. g. prot.)
Sistema A	0,52	1,61	0,50	7,35
Sistema L	0,35	18,29	0,34	21,56
Sistema ASC	2,55	16,84	2,87	17,44

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los datos de la figura 7.2.

De estos resultados se deduce que, tanto el sistema L como el sistema ASC, mantienen sus características cinéticas en las células transformadas respecto de las células normales. Sin embargo, el comportamiento es diferente para el sistema A. La afinidad del transportador por su sustrato es la misma para ambos tipos de células, pero su velocidad máxima es diferente.

Para las células transformadas BPA-31 este parámetro es aproximadamente 4,5 veces el valor del de las células normales A-31. Este resultado indica que el transportador funciona a mayor velocidad pero con igual afinidad en las células transformadas.

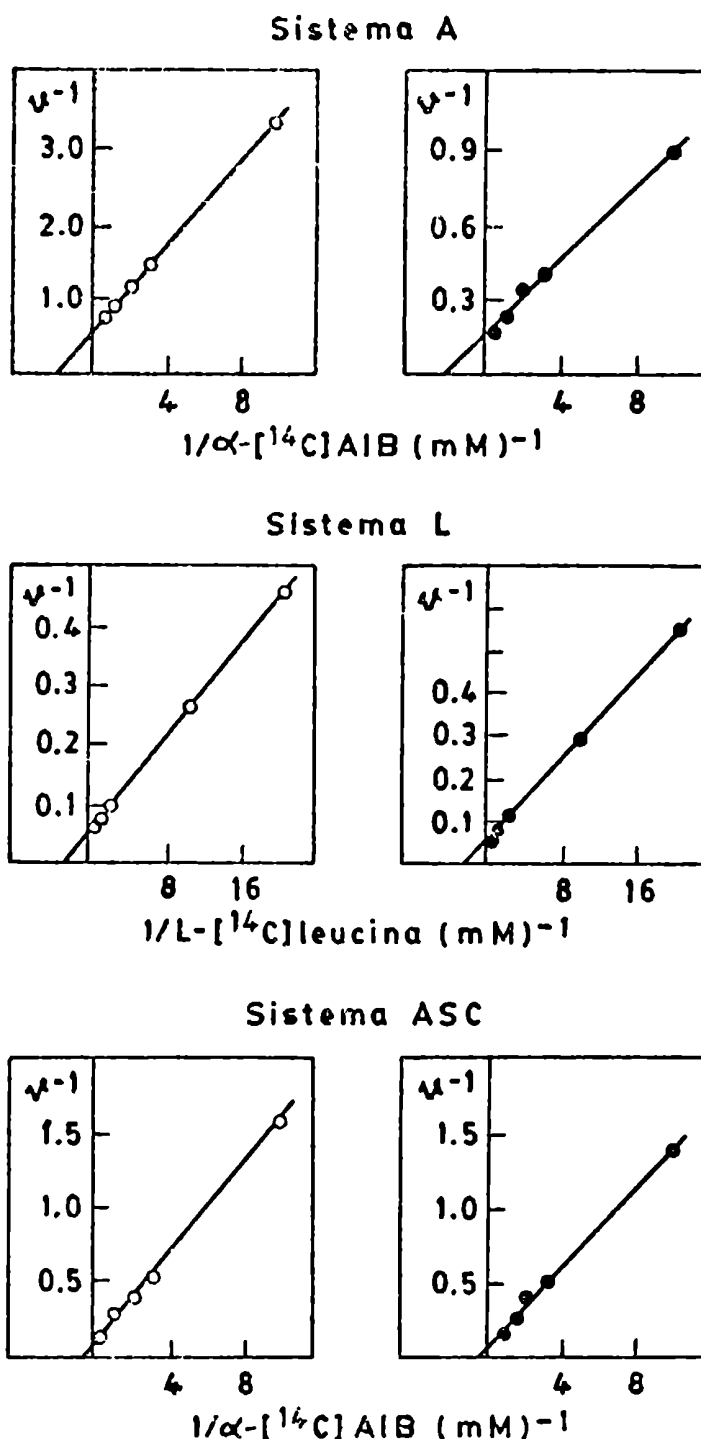


Figura 7.2 Relación entre la velocidad de entrada y la concentración de aminoácidos.

Células de fibroblastos en cultivo A-31 (O) y BPA-31 (●) se incubaron con amortiguador SSE, pH 7,4 y α - ^{14}C]AIB 1 mM en ausencia o presencia de α -MeAIB 10 mM, 1 min o L- ^{14}C] leucina, 2 mM, 90 s. Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad a partir de las cuales se calcularon las velocidades de entrada por los sistemas A, L y ASC, según se describe en Resultados (IV.3).

VII.3 Control adaptativo de la actividad de los sistemas transportadores de aminoácidos.

El efecto del ayuno de aminoácidos sobre los sistemas A, L y ASC de transporte se estudió en ambos tipos de células, A-31 y BPA-31. Para ello, las células se incubaron por 6 horas en un medio libre de aminoácidos. El suero utilizado se dializó previamente con el fin de obtenerlo libre de aminoácidos y así descartar algún efecto sobre la actividad del transporte durante la incubación. Las muestras se tomaron y procesaron como se describió en Materiales y Métodos. En la tabla 7.2 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 7.2 Efecto del ayuno sobre los valores de entrada de aminoácidos a través de los sistemas A, L y ASC de transporte.

Tiempo de incubación (horas)	Fibroblastos	
	A-31 (μ moles/min. g. prot.)	BPA-31 (μ moles/min. g. prot.)
Sistema A		
0	0,55 \pm 0,01	3,43 \pm 0,07
6	3,94 \pm 0,15	3,64 \pm 0,08
Sistema L		
0	9,62 \pm 0,10	12,08 \pm 0,20
6	2,93 \pm 0,03	6,16 \pm 0,09
Sistema ASC		
0	1,38 \pm 0,02	2,70 \pm 0,06
6	1,62 \pm 0,05	3,29 \pm 0,09

Fibroblastos normales (A-31) y transformados (BPA-31) sin incubar (0 h) o incubados (6 h) en un medio libre de aminoácidos, se utilizaron para la determinación de la entrada de aminoácidos por los sistemas A, L y ASC. La discriminación de los sistemas A y ASC se realizó según se describió en IV.3, empleando α -[14 C] AIB 1 mM, α -Me AIB 10 mM, durante 1 min. Para la determinación del sistema L, las incubaciones se realizaron con L-[14 C] leucina 2 mM, 90s.

La actividad del sistema A en células normales se incrementó aproximadamente 7 veces después de la incubación. A diferencia de este resultado, en las células transformadas no se observó modificaciones en los

valores de entrada. Para el caso del transporte de L-leucina, el transporte disminuyó significativamente tanto en células normales como en transformadas. En cambio el sistema ASC no presentó modificaciones en su actividad en las mismas condiciones experimentales. Además, puede observarse en la misma tabla que la actividad basal de cada uno de los sistemas de transporte estudiados de aminoácidos neutros para células transformadas es más alto que para las células normales, especialmente si se compara los valores correspondientes al sistema A.

VII.3.1 Parámetros cinéticos del sistema L en condiciones de ayuno.

En la figura 7.3 se presentan los resultados obtenidos para las dos líneas celulares de fibroblastos. La incubación en el medio libre de aminoácidos produjo, dentro de las dos primeras horas, una disminución entre un 20 por ciento y 55 por ciento para cada concentración de L-leucina ensayada.

Tabla 7.3 Efecto del ayuno de aminoácidos sobre los parámetros cinéticos del sistema L para los fibroblastos A-31 y BPA-31.

Línea celular	Tiempo de incubación (h)	Km (mM)	V _{máx} (μmoles L-leu/mín.g. prot.)
A-31	--	0,35	18,29
	2	0,17	5,09
	4	0,23	5,07
	6	0,30	5,47
BPA-31	--	0,34	21,56
	2	0,29	9,64
	4	0,38	10,00
	6	0,48	12,95

Fibroblastos normales y transformados no se incubaron (0h) o se incubaron por distintos tiempos (2, 4 y 6 h) en un medio libre de aminoácidos. Luego, se realizó la determinación de los parámetros cinéticos del sistema L, según se describe en la figura 7.2.

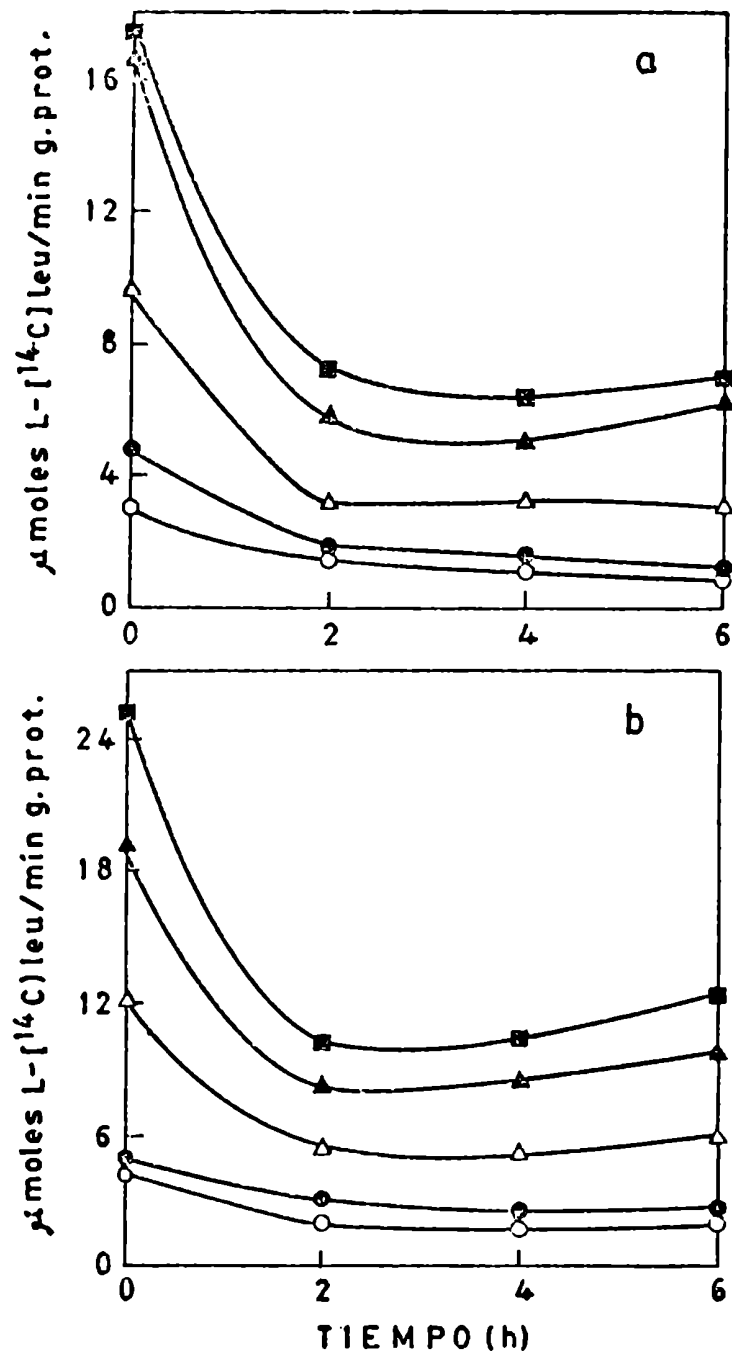


Figura 7.3 Efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad del sistema L.

Células de fibroblastos en cultivo A-31 (a) y BPA-31 (b) se ayunaron con amortiguador SSE, pH 7,4. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se incubaron con L-[¹⁴C] leucina (○) 0,05 mM, (●) 0,10 mM, (Δ) 0,50 mM, (▲) 1,0 mM y (■) 2,0 mM, 90 s y se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

El transporte de este aminoácido se mantuvo en niveles bajos, aún después de las 6 horas de incubación. Los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para L-leucina en los fibroblastos A-31 y BPA-31 se muestran en la tabla 7.3. El efecto de la disminución de la entrada durante las 2 primeras horas de ayuno se observó en la modificación de los valores de $V_{m\acute{a}x}$ determinados en ese período. La incubación posterior, hasta las 6 horas, no produjo diferencia significativa en los valores de los parámetros cinéticos en ambos tipos de fibroblastos.

VII.3.2 Parámetros cinéticos del sistema ASC en condiciones de ayuno.

La determinación de la actividad del sistema ASC se realizó mediante la incubación de las células con α -AIB en presencia de un exceso de α -MeAIB. La figura 7.4 muestra los valores de la entrada de α -AIB obtenidos para diferentes tiempos de incubación en condiciones de ayuno, para las células A-31. Similares resultados se obtuvieron para los fibroblastos BPA-31. En ambas líneas celulares no se observó efecto de la incubación en un medio libre de aminoácidos sobre la actividad del sistema ASC.

VII.3.3 Parámetros cinéticos del sistema A en condiciones de ayuno.

En la figura 7.5a se observan los valores obtenidos de la entrada de α -AIB en fibroblastos A-31 en un medio libre de aminoácidos. La estimulación del transporte se hace evidente a partir de las 2 horas de incubación y aumenta a medida que transcurre el tiempo de exposición de las células en ese medio. Este efecto puede observarse para concentraciones externas de α -AIB comprendidas entre 0,10 a 2,0 mM.

En incubaciones usando fibroblastos transformados, en las mismas condiciones experimentales, no se observó efecto sobre la actividad del sistema A (figura 7.5b).

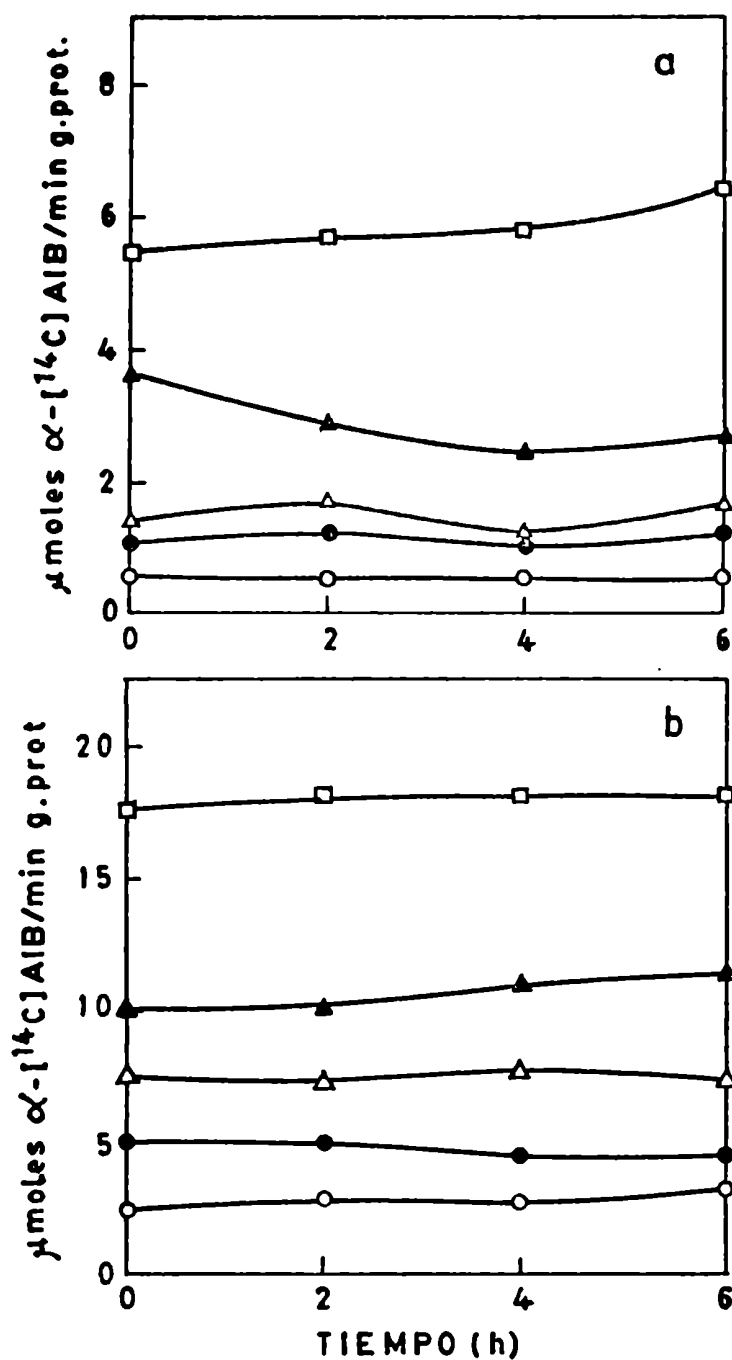


Figura 7.4 Efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad del sistema ASC.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 7.3 excepto que las células se incubaron con α -[^{14}C]AIB (\circ) 0,10 mM, (\bullet) 0,30 mM, (Δ) 0,50 mM, (\blacktriangle) 1,0 mM y (\square) 2,0 mM, 1 min, en presencia de α -MeAIB 10 mM. (a) fibroblastos A-31; (b) fibroblastos BPA-31.

La figura 7.6 compara los resultados obtenidos para las células A-31 y BPA-31 durante la incubación en condiciones de ayuno. Los valores de entrada para las células transformadas difieren a las 2 y 4 horas, pero son del orden de los obtenidos para las normales sólo después de 6 horas en un medio libre de aminoácidos.

Tabla 7.4 Efecto del ayuno de aminoácidos sobre los parámetros cinéticos del sistema A para los fibroblastos A-31 y BPA-31.

Línea celular	Tiempo de incubación (h)	K _m (mM)	V _{máx} (μmoles L-leu/min g prot.)
A-31	--	0,52	1,61
	2	0,48	3,01
	6	0,45	7,69
BPA-31	--	0,50	7,34
	2	0,54	11,15
	4	0,57	11,35
	6	0,38	7,29

Fibroblastos normales y transformados no se incubaron (0h) o se incubaron por distintos tiempos (2,4 y 6 h) en un medio libre de aminoácidos. Luego, se realizó la determinación de los parámetros cinéticos del sistema A, según se describe en la figura 7.2.

La tabla 7.4 muestra los parámetros cinéticos para ambas líneas celulares. La variación de los valores de K_m a lo largo de la incubación no es significativa. Con respecto a la V_{máx} en células normales, aumentó progresivamente, obteniéndose un aumento relativo de 5 veces, comparando el valor inicial al obtenido a las 6 horas de incubación. En las células transformadas sin embargo, este efecto no se observó, manteniéndose el valor constante a lo largo de la incubación, corroborando así los resultados mencionados anteriormente.

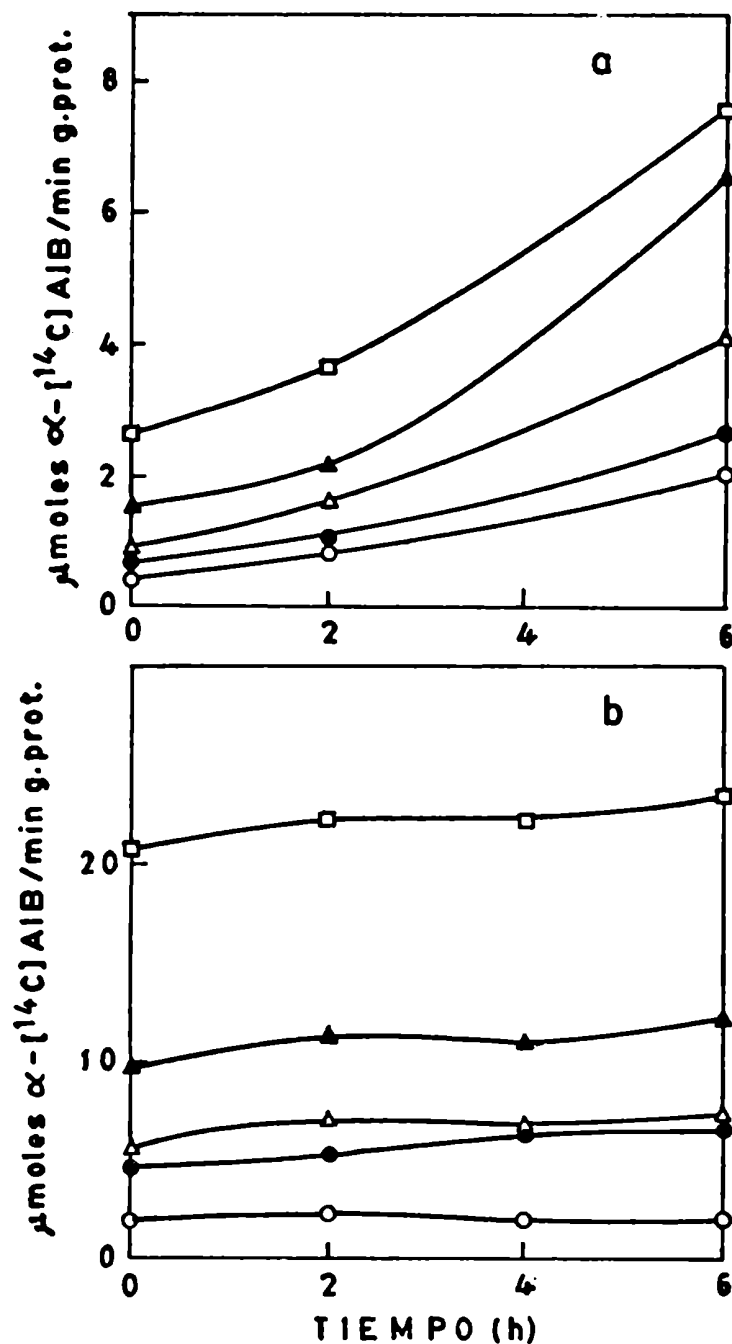


Figura 7.5 Efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad del sistema A.

Se siguieron las indicaciones descritas en la figura 7.3 excepto que las células se incubaron con α -[^{14}C]AIB (○) 0,10 mM, (●) 0,30 mM, (△) 0,50 mM, (▲) 1,0 mM y (□) 2,0 mM, 1 min, en ausencia o presencia de α -MeAIB 10 mM. La actividad del sistema A se calculó según se describió en Resultados (IV.3). (a) fibroblastos A-31; (b) fibroblastos BPA-31.

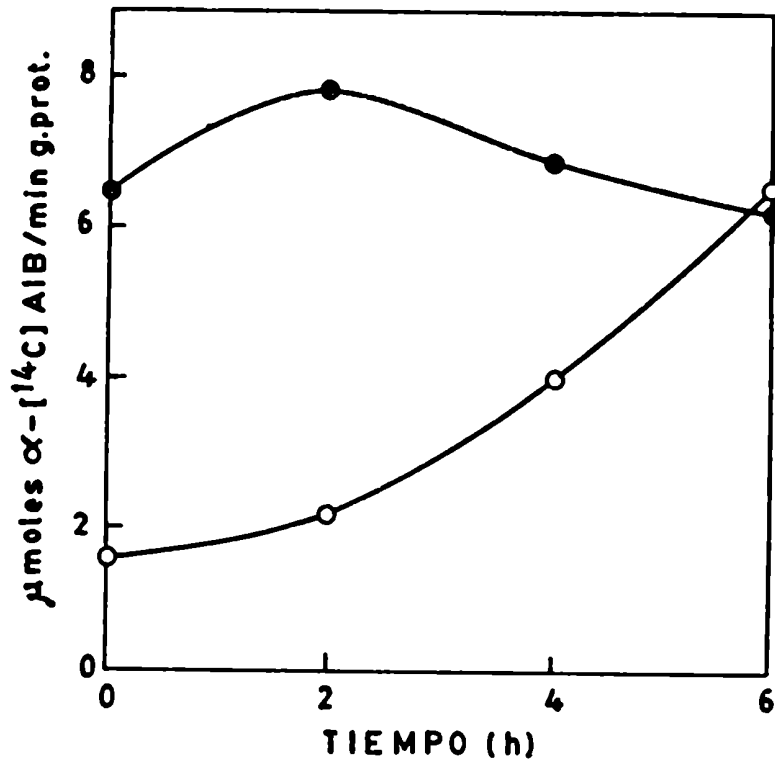


Figura 7.6 Comparación del efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad del sistema A en fibroblastos A-31 y BPA-31.

Células de fibroblastos en cultivo A-31 (○) y BPA-31 (●) se ayunaron en amortiguador SSE, pH 7,4. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se incubaron con α -[^{14}C]AIB 1,0 mM, 1 min, en ausencia o presencia de α -MeAIB 10 mM. La actividad del sistema A se calculó según se describió en Resultados (IV.3).

VII.3.3.1 Efecto de inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas sobre el transporte por el sistema A en fibroblastos normales.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, sólo el sistema A en los fibroblastos A-31 mostró un aumento en la actividad de transporte luego de incubarlos en un medio libre de aminoácidos. Por tal motivo se investigó el requerimiento de la síntesis de macromoléculas de esta respuesta adaptativa usando inhibidores.

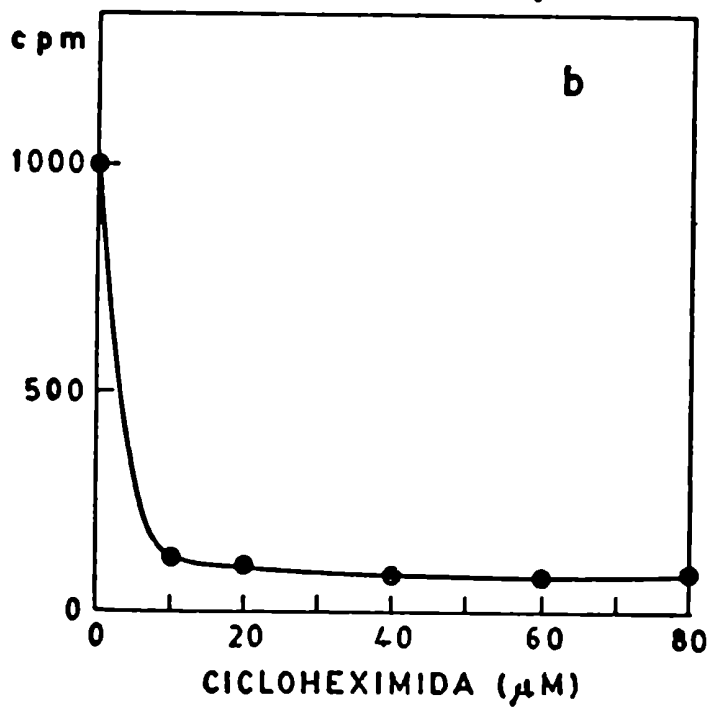
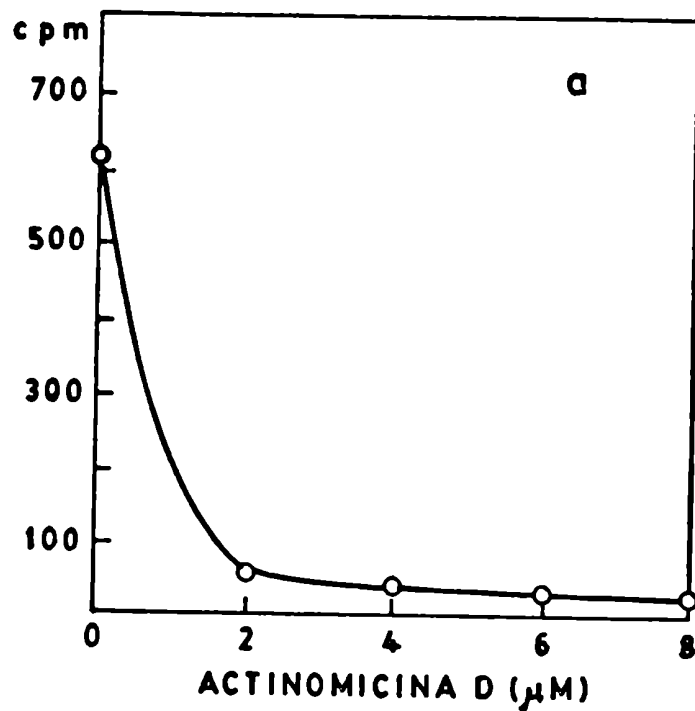


Figura 7.7 Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre la síntesis de ARN y proteínas.

Células de fibroblastos en cultivo A-31 se incubaron con diferentes concentraciones de actinomicina D (○) o cicloheximida (●) según se indica en la abscisa, en presencia de (a) $[^3\text{H}]$ uridina 20 nM o (b) L- $[^{14}\text{C}]$ leucina 1 mM. Las muestras se procesaron para la determinación de la radiactividad incorporada a ARN y proteínas respectivamente.

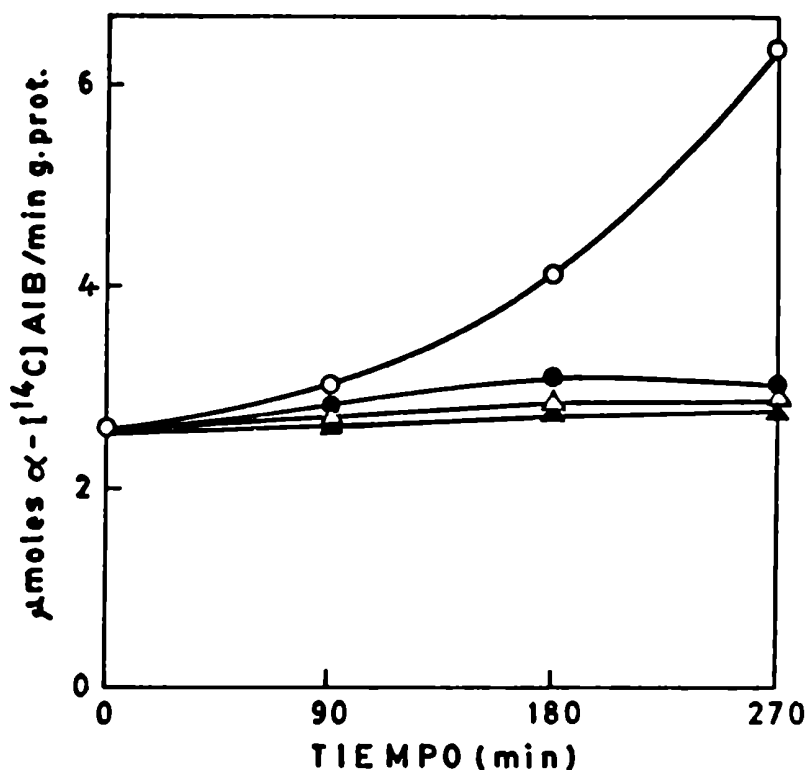


Figura 7.8 Modificación de la respuesta adaptativa por acción de inhibidores y aminoácidos.

Células de fibroblastos A-31 se ayunaron con amortiguador SSE, pH 7,4, en presencia de (○) sin agregado, (●) actinomicina D 2 μ M (Δ) cicloheximida 20 μ M o (\blacktriangle) L- alanina 5 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas que se incubaron con α -[14 C]AIB 1,0 mM, 1 min y se procesaron para la determinación de la radiactividad intracelular.

Para la elección de la concentración de actinomicina D (inhibidor de la síntesis de ARN) y de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) se incubaron las células A-31 durante 1 hora con diferentes concentraciones, midiéndose incorporación de uridina y leucina en ARN y proteínas respectivamente. La figura 7.7 muestra los resultados obtenidos.

La cicloheximida se usó a una concentración de 50 μ M, la cual inhibió la síntesis proteica en más del 90 por ciento y actinomicina D a una

concentración de 2 μM , inhibiendo la síntesis de ARN por más del 93 por ciento. En la figura 7.8 se presentan los resultados de la incubación con los inhibidores sobre la entrada de α -AIB. La cicloheximida y la actinomicina D bloquearon completamente el incremento de la actividad del sistema A como consecuencia del ayuno, cuando son agregados desde el comienzo de la incubación.

Además puede observarse en la misma figura que la incubación con L-alanina no marcada también produjo una eliminación de la respuesta adaptativa.

DISCUSION

El estudio de los mecanismos de regulación de un proceso directamente involucrado en el crecimiento y metabolismo en células de tumor ascítico Ehrlich (TAE), como lo es el transporte de aminoácidos, ha sido el objetivo general de la presente tesis. Como se describió en Introducción, las células TAE provienen de un tumor mamario sólido espontáneo de ratón, que ha adquirido la capacidad de desarrollarse intraperitonealmente. La extracción del ascitis permite disponer de una suspensión celular homogénea. La posibilidad de tener suspensiones de células tumorales ha permitido su estudio por distintos grupos de investigación.

Numerosas características de las células tumorales son compartidas por las células TAE. Entre ellas, podemos mencionar la importancia del proceso glucolítico para la provisión de energía. Las células TAE consumen glucosa a una velocidad muy elevada; para mantener su rápido crecimiento es esencial que posean un sistema de transporte de glucosa altamente eficiente que le permita su activa captación de la sangre del huésped. Es así que en ratones con valores de glucemia de 136 mg%, la inoculación de las células tumorales y su desarrollo durante 7 días produce una disminución significativa de la concentración de glucosa en sangre a 61 mg% (Resultados III).

Los valores obtenidos resultan coincidentes con los publicados por Fung y col. (1985), quienes sostienen que la capacidad de las células TAE para obtener glucosa del suero de ratón, se incrementa progresivamente durante el desarrollo intraperitoneal del tumor. Simultáneamente con el aumento de la capacidad de transporte, hay un número mayor de transportadores de glucosa sobre la superficie de la membrana celular. Además, los mismos autores sugieren que la mayor actividad de transporte es el resultado de una adaptación celular, por la continua disminución de los niveles sanguíneos de glucosa durante el crecimiento del tumor (Fung y col., 1986).

El alto consumo de glucosa produce elevadas concentraciones de piruvato, el cual es transformado en lactato en lugar de ser oxidado en la mitocondria. Más aún, un factor que puede ser responsable de la dependencia de las células tumorales de las vías metabólicas citoplasmáticas para la obtención de energía, es que en ellas el número de mitocondrias es menor que en las células normales. Esta consideración se halla reforzada por los resultados del estudio de seis deshidrogenasas intramitocondriales, las

cuales muestran una disminución muy importante en su actividad respecto de los controles en células normales (Lazo, 1981).

El lactato producido en el citosol sale al espacio extracelular. Este hecho concuerda con experimentos realizados *in vitro*, en los cuales la incubación de células TAE con glucosa, provoca una acidificación del medio externo. Una concentración inicial de glucosa de 5mM se reduce a la mitad a los 30 minutos de incubación, con una disminución del pH extracelular de 7,4 a 6,1 (Tabla 3.1).

Por otro lado, la incubación con 2-desoxiglucosa, un análogo de D-glucosa no metabolizable, no modifica el pH externo. Poole y col., (1972) ya habían observado un aumento progresivo de la concentración de lactato en el medio de incubación, que se correlacionaba con una disminución de la concentración de glucosa y del pH externo. Posteriormente, Heinz y col., (1981) sugirieron la activación por glucosa de una bomba electrogénica para la salida de H⁺, la cual opera independientemente del sistema transportador de lactato.

El transporte de los distintos nutrientes a través de la membrana citoplasmática, generalmente no era considerado como parte integrante de las diferentes vías del metabolismo intermedio. Sin embargo, actualmente se reconoce que es el primer paso y el más importante, si se toma en cuenta que de él dependerá la presencia de una determinada sustancia en el citoplasma, previo a su metabolismo. Por ejemplo, en el metabolismo hepático de aminoácidos, resultados presentados por distintos autores señalan que el transporte de L-alanina en el hepatocito es el paso limitante para su metabolismo, cuando se realizan ensayos con concentraciones fisiológicas del aminoácido (Mc Givan y col., 1981; Fafournoux y col., 1983). J. H. Exton propuso el concepto del control metabólico por translocación de los nutrientes a través de la membrana celular en 1970. Además, postuló que la disponibilidad del sustrato era un factor clave en la regulación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos.

Resultados presentados por Kilberg y col., (1986), indicaron que la utilización hepática de varios aminoácidos para la síntesis *de novo* de glucosa, puede estar limitada por su disponibilidad en el citosol. La velocidad gluconeogénica para glicina, L-cisteína, L-alanina, L-serina, L-treonina y

L-prolina es de tres a ocho veces mayor que las velocidades de transporte de esos aminoácidos. Además, debe considerarse que la actividad de transporte de cada aminoácido *in vivo* es menor, como consecuencia de la inhibición competitiva y no competitiva de ese proceso, por los otros aminoácidos presentes en el plasma. Este es un claro ejemplo de la importancia del estudio del transporte de aminoácidos y su regulación.

El proceso de transporte de aminoácidos en las células eucariotas involucra: 1) el reconocimiento del aminoácido del medio externo por un componente de la membrana citoplasmática; 2) la translocación del aminoácido a través de la membrana y 3) la liberación al interior de la célula. El mencionado proceso está mediado por sistemas transportadores, los cuales difieren en la afinidad por sus sustratos, reactividad a iones e inhibidores, como se describió en Introducción.

La incorporación de aminoácidos en las células TAE, al igual que la glucosa, debe ser muy eficiente ya que la alta velocidad de división de las células tumorales requiere una activa síntesis proteica. La determinación de las concentraciones de aminoácidos en las células TAE y en el fluido ascítico (Tabla 3.2) demuestra la existencia de un proceso de acumulación intracelular de aminoácidos, cuya magnitud depende de las características estructurales, las cuales están a su vez relacionadas con los sistemas de transporte utilizados por las células para su incorporación.

En el estudio de los mecanismos de regulación de los sistemas de transporte de aminoácidos es conveniente conocer la funcionalidad y operabilidad de los sistemas, como paso previo a la realización de cualquier investigación, en donde pueden o no estar involucradas modificaciones sobre ellos. Esto implica caracterizar y definir cinéticamente cada uno de los sistemas. De acuerdo con lo expuesto, en la primera parte de esta tesis, se estudiaron las propiedades generales de los sistemas de transporte L, A y ASC en células de tumor ascítico Ehrlich.

El estudio de la actividad del sistema L se realizó utilizando L-leucina como sustrato. Los resultados obtenidos indican que la incorporación del aminoácido a las células presenta las características de un proceso concentrativo (figura 4.1). Su incorporación a proteínas sólo es significativa a partir de los 10 minutos de incubación con el aminoácido radiactivo

(figura 4.2). Esta observación está de acuerdo con los resultados presentados por Lazo (1981). El autor demostró, además, que la L-leucina es utilizada por las células para la síntesis de lípidos. Ambos procesos de síntesis, de proteínas y lípidos ocurren a una velocidad mayor que en las células normales. La velocidad de oxidación de L-leucina es similar a la de las células normales y es lo suficientemente lenta como para permitir que el aminoácido permanezca como tal, en el reservorio intracelular, por períodos cortos de tiempo.

A este respecto, en el presente estudio (Resultados IV.1.2) se analizaron extractos celulares provenientes de incubaciones por distintos tiempos con el aminoácido radiactivo mediante cromatografías en papel. Se observó que, hasta 20 minutos de incubación, sólo puede detectarse un único compuesto radiactivo correspondiente a L-leucina.

La determinación de los parámetros cinéticos de la entrada de L-leucina, calculados en muestras incubadas con el aminoácido por 90 segundos, período en que no se detecta salida del aminoácido al medio, demuestra la existencia de un proceso saturable (figura 4.3) y son consistentes con un transporte de L-leucina mediado por un solo sistema, caracterizado por un K_m de 0,56 mM y una $V_{m\acute{a}x}$ de 14,0 $\mu\text{moles}/\text{min.g.p.s.}$ (figura 4.4). El proceso de entrada de L-leucina en ausencia de Na^+ (figura 4.11) demuestra que el transporte de este aminoácido es mediado principalmente por el sistema L.

La representación de la cinética de incorporación en función del tiempo para los aminoácidos L-alanina, α -AIB y α -MeAIB (figuras 4.5a, 4.6a, 4.7 y Tabla 4.1) mediados por el sistema A indica un proceso de transporte concentrativo. Los valores de transporte para cada uno de ellos alcanzan un estado estacionario, es decir, la salida del aminoácido al medio extracelular deja de ser un proceso de baja actividad. En ensayos realizados con el fin de determinar la incorporación de cada uno de los aminoácidos a proteínas, sólo la L-alanina puede detectarse a tiempos mayores a 20 minutos de incubación (figura 4.8). El α -AIB y el α -MeAIB no son incorporados a proteínas ya que son compuestos no metabolizables (figura 4.8).

La L-alanina es metabolizada rápidamente una vez incorporada a la célula. El tiempo empleado para la medición de la entrada, 60 segundos, es lo suficientemente corto como para que no se detecte metabolitos solubles

mediante el análisis de los extractos celulares por cromatografía en papel. Sin embargo, para asegurarse que el proceso estudiado es el de entrada, son utilizados los análogos de L-alanina no metabolizables el α -AIB y el α -MeAIB.

La determinación de las constantes cinéticas (figura 4.9 y Tabla 4.2) señala el funcionamiento de un único sistema transportador saturable, con diferente afinidad y velocidad para cada sustrato utilizado. La L-alanina y el α -AIB, en ausencia de Na^+ (figuras 4.5b y 4.6b) son transportados, además por el sistema L, principal sistema Na^+ independiente. El agregado de α -MeAIB al medio libre de Na^+ permite distinguir la participación del sistema ASC. En ensayos realizados a tal fin, el 10 por ciento de la entrada total de L-alanina corresponde al transporte por el sistema ASC, mientras que el α -AIB no utiliza este sistema para entrar a las células (figura 4.11). En todos los ensayos en que se mide la actividad del sistema A, los experimentos se realizaron como se describió en IV.3.

El α -MeAIB utiliza únicamente el sistema A de transporte, por poseer un metilo en el grupo α -amino que le confiere mayor especificidad.

Los resultados obtenidos en la caracterización de los sistemas L y A son coincidentes con los observados por otros autores en las células de tumor ascítico Ehrlich (Oxender y Christensen, 1963; Neville y col., 1980).

Respecto al sistema ASC, en estas células es mucho menos activo que el sistema A, ambos Na^+ -dependientes (Christensen y col., 1967). En otras células y tejidos, como reticulocitos de conejo, hepatocitos de rata y en células CHO (Shotwell y col., 1983), la operación del sistema A es muy reducida siendo el sistema ASC, el sistema de transporte Na^+ -dependiente más importante.

Resulta interesante mencionar que los valores de incorporación de L-leucina, L-alanina, α -AIB y α -MeAIB (figuras 4.1, 4.5, 4.6 y 4.7) extrapolados a tiempo cero, dan intercepciones positivas. La propuesta más simple para justificar estos datos experimentales es considerar la existencia de dos etapas en el proceso de entrada, ya mencionado anteriormente. Una inicial, involucrada en el reconocimiento, ligado o unión del sustrato a entidades de membrana que median el transporte y una etapa posterior: la de su translocación a través de la membrana celular. En general, en este trabajo,

cuando se hace referencia a entrada o transporte de aminoácidos, está incluido el reconocimiento y la translocación de los mismos a través de la membrana plasmática.

De los mecanismos de regulación del proceso de transporte de aminoácidos, dos son los investigados en el presente trabajo: el mecanismo de regulación hormonal y el de regulación adaptativa. El primero de ellos involucra a las hormonas cuya acción está relacionada directa o indirectamente con el AMPcíclico. Por un lado, el glucagón y las catecolaminas, las cuales actúan a través de la interacción receptor-proteína G-adenilato ciclase y por otro, la insulina, con su conocida acción sobre la actividad de la enzima fosfodiesterasa.

La importancia del estudio de las hormonas relacionadas con el AMPcíclico, radica en que el nucleótido cíclico es considerado el mediador de la respuesta pleiotípica, como fue propuesto por el grupo de Tomkins (Hershko y col., 1971). Se considera que la rápida velocidad de crecimiento de las células tumorales es debido a la pérdida de la regulación de los parámetros metabólicos bajo control pleiotípico, ya que como consecuencia de la transformación se produce una disminución del contenido endógeno de AMPcíclico. Las observaciones de Sellar y Benson (1973) sobre la regresión del tumor Ehrlich por AMPcíclico, en experimentos *in vivo* sustentan esta idea.

El segundo, el mecanismo de regulación adaptativa, se refiere a la propiedad de las células a adaptarse a modificaciones en el medio extracelular. En particular, para el transporte de aminoácidos, es importante estudiar la relación entre el ayuno por ausencia de aminoácidos y los cambios en la actividad de los sistemas.

Es un conocimiento generalmente aceptado, que la insulina actúa desencadenando un tipo de efecto en cascada en el metabolismo celular, respecto de nutrientes e iones. Esto involucra modificaciones de la actividad de los sistemas de transporte, localizados en la membrana celular y modulación de la actividad de las enzimas intracelulares que controlan el flujo de los pasos metabólicos más importantes. El efecto de esta hormona sobre la actividad de los sistemas de transporte de aminoácidos, ha sido estudiado por diferentes grupos de investigación, en las últimas dos décadas.

Los resultados obtenidos en el estudio de este tema en la presente tesis, indican que cuando se incuban células TAE con insulina se observa una inhibición parcial de la entrada de L-leucina, aminoácido transportado por el sistema L. El efecto sobre la entrada es dosis y tiempo-dependiente (figuras 5.1 y 5.2a). De acuerdo a estos resultados, para los siguientes experimentos se elige una concentración de insulina de $1,7 \mu\text{M}$, valor aproximado a los comunmente usados en sistemas de cultivo de tejidos y órganos, así como en estudios de transporte de aminoácidos (Shotwell y col., 1983).

Un efecto inhibitorio del 32 por ciento se observa después de 30 minutos de incubación de las células con la hormona; su acción es completa después de 60 minutos de incubación. Una inhibición de la entrada de L-leucina, cuando fibroblastos humanos en cultivo se incubaron con insulina, fue también observado por Longo y col. (1985). Por el contrario, Mohri y col. (1974) en útero inmaduro de rata y Anderson y Rillema (1976) en explantos de glándula mamaria, no encontraron modificación del sistema L.

Además, cuando la hormona está presente en el medio externo durante sólo 15 minutos, se observa una modificación de la actividad de transporte, similar a la obtenida si la insulina está durante todo el tiempo de incubación del ensayo (figura 5.2a). Este dato es concordante con el presentado por Fehlmann y col. (1979) quienes observaron que la incubación de hepatocitos de rata por tiempos cortos con insulina o glucagón, producen efectos estimulatorios posteriores sobre la entrada de $\alpha\text{-AIB}$. Los autores sugieren que el mantenimiento del efecto de las hormonas después de su remoción del medio de incubación, se debe a que, con posterioridad a la formación del complejo hormona-receptor en la superficie de los hepatocitos, mecanismos celulares tales como la modificación del transporte de aminoácidos, son independientes de la presencia continua de la hormona en el medio extracelular. Asimismo, la descripción y caracterización de receptores de insulina en membranas de células TAE (Böhmer y col., 1983) apoyan esta propuesta.

La medida de los valores de la entrada de $\alpha\text{-AIB}$ en presencia de insulina permite investigar la posible regulación de la actividad del sistema A, Na^+ dependiente. La hormona no modifica la entrada por este sistema, en las

condiciones experimentales ensayadas (figura 5.2b). Es importante mencionar que tanto Friedberg y col. (1970) con explantos de glándula mamaria de ratones vírgenes o adultos, así como Hissin y Hilf (1978) con células del adenocarcinoma mamario R3230AC, no obtuvieron modificación de la actividad de transporte del α -AIB en experimentos *in vitro*. Sin embargo, explantos de glándula mamaria provenientes de ratones preñados son sensibles a la presencia de insulina, observándose un aumento de los valores de entrada de α -AIB en esas células (Friedberg y col., 1970). Estos resultados sugieren que la respuesta del tejido mamario a la incubación con insulina, en lo que se refiere al transporte de aminoácidos, depende de las condiciones fisiológicas del tejido.

Resulta interesante comentar que en la mayoría de las células y tejidos estudiados, la incubación con insulina produce un aumento en la actividad del sistema A (Shotwell, 1983).

Una investigación de los procesos bioquímicos involucrados en el efecto de inhibición de la entrada de L-leucina en células incubadas durante 60 minutos con insulina, descrito anteriormente, permitieron establecer que la disminución de la actividad del sistema L no se justifica por modificaciones en los parámetros cinéticos en ambas condiciones experimentales. Es decir que no hay cambios en la afinidad y cantidad de los transportadores que median el proceso de entrada (Tabla 5.1). Por otro lado, no hay diferencia entre los valores de la salida de L-leucina en células control y las tratadas con insulina, lo cual descarta la posible participación de este proceso en la disminución de los valores de entrada de L-leucina (figura 5.3). El mismo efecto puede producirse como consecuencia de una estimulación del metabolismo del aminoácido así como de un incremento en la síntesis proteica, esto último confirmado por el aumento de L-leucina incorporada a proteínas (Tabla 5.2). Los dos procesos conducirían a una disminución del contenido de aminoácidos intracelulares del reservorio soluble. Efectivamente, en la determinación del contenido endógeno de aminoácidos en células TAE, incubadas con insulina (Tabla 5.4) se observa una baja concentración de L-leucina, L-isoleucina, L-valina y L-fenilalanina. Estos aminoácidos son transportados por el sistema L y en consecuencia, su reducido contenido intracelular no permite la operación del mecanismo de

trans-estimulación característico de este sistema (Introducción). Un efecto similar fue hallado por Rannels y col. (1975) en células incubadas con insulina, quienes observaron una disminución de la concentración intracelular de nueve aminoácidos, entre ellos L-valina, L-isoleucina y L-fenilalanina.

Con el propósito de averiguar la posible participación de la síntesis proteica en la inhibición parcial de la entrada de L-leucina en las células tratadas con insulina, se investigó el efecto de la cicloheximida, un inhibidor de ese proceso. Los resultados obtenidos muestran un incremento de la incorporación de L-leucina en las células tratadas con el inhibidor respecto de las control (Tabla 5.3). En estos experimentos, el efecto *per se* sobre los valores basales del transporte puede atribuirse a un incremento en la concentración intracelular de aminoácidos libres. Dicha observación es coincidente con las de otros autores (Shotwell y col., 1983) quienes, además, enfatizan la importancia de considerar este hecho al interpretar los resultados cuando son utilizados para el estudio de regulación del transporte, ya que algunos de los sistemas transportadores pueden modificar su actividad como consecuencia de una variación en la concentración endógena de aminoácidos.

Es un conocimiento establecido que en tejido adiposo y en hígado, la insulina disminuye la concentración de AMPcíclico (Incubación previa con otra hormona que aumenta el AMPcíclico) debido a la activación de la fosfodiesterasa y la inhibición de la adenilato ciclasa. El primer efecto parece ser cuantitativamente más importante, ya que la disminución de la actividad de la fosfodiesterasa es menor cuando se realiza una incubación previa con metilxantinas (Delton, 1986). Algunos grupos de investigación han observado un efecto inhibitorio sobre la actividad de adenilato ciclasa en preparaciones de membranas (Torres y col., 1978; Heyworth y Houslay, 1983). El efecto no es muy significativo y parece ocurrir sólo bajo condiciones específicas. El aumento de la actividad fosfodiesterásica, luego de la exposición de hepatocitos y adipocitos a insulina, fue descrito por diferentes investigadores (Loten y Sneyd, 1970; Makino y Kono, 1980).

Con el fin de investigar la posible participación del AMPcíclico en la inhibición de la entrada de L-leucina por insulina, las células TAE se incubaron en presencia y ausencia de la hormona y se determinaron los niveles

intracelulares del nucleótido cíclico. Concentraciones similares se hallaron en ambas condiciones experimentales (Resultados V.1.4), valores similares a los presentados por Goldfine y Sherline (1972) en timocitos aislados de rata.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la indagación del efecto de la insulina sobre la entrada de L-leucina se puede concluir que se trata de un efecto indirecto, consecuencia de la disminución de las concentraciones intracelulares de aminoácidos transportados por el sistema L (L-valina, L-leucina, L-isoleucina y L-fenilalanina) atribuible principalmente al aumento de la síntesis proteica. Las concentraciones disminuidas de los aminoácidos conducen, a su vez, a una baja eficiencia del mecanismo de *trans*-estimulación lo cual origina una inhibición parcial de la entrada por el sistema L.

Resulta interesante mencionar que Crane y col. (1957) y Fung y col. (1985) no han podido demostrar efecto de insulina sobre la entrada y afinidad y el número de transportadores respectivamente, para glucosa en células TAE.

El glucagón, una hormona hiperglucemiante y cuyo mecanismo de transducción de señal a través de la membrana ha sido establecido, produce un aumento en la actividad de transporte por el sistema A, principalmente del tejido hepático. Con respecto a células TAE, Cuesta Casado (Tesis) observó un incremento en la concentración intracelular de AMPcíclico, cuando esas células se incubaron con glucagón. Una investigación del efecto sobre el transporte de aminoácidos de la incubación de células TAE con diferentes concentraciones de glucagón, durante distintos tiempos no mostró modificación de los valores de la entrada de α -AIB por el sistema A y de L-leucina por el sistema L (figura 5.4).

El AMPcíclico es también el segundo mensajero en la acción de otras hormonas, como las catecolaminas. La incubación de las células TAE con adrenalina y L-isoproterenol, un agonista β -adrenérgico (Tabla 6.1), produce un incremento del 35 y 44 por ciento, respectivamente, en la concentración intracelular de AMPcíclico. Los resultados obtenidos indican el funcionamiento del sistema de la adenilato ciclasa, coincidiendo con los datos presentados por Cuesta Casado y Ramos (1981), quienes demostraron la funcionalidad del mecanismo de síntesis y degradación de AMPcíclico en estas

células, mediante la determinación de las actividades de adenilato ciclasa y fosfodiesterasa.

Más aún, Kurokawa y col. (1979) observaron un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa, cuando homogenatos de células TAE se incubaron con adrenalina o noradrenalina. Los datos presentados sugieren la presencia de receptores para catecolaminas en la membrana de estas células. Posteriormente, Kurokawa y col. (1980) estudiando la participación de los microfilamentos en la desensibilización de la adenilato ciclasa en células TAE expuestas a catecolaminas, determinaron el ligado de (-)dihidro-alprenolol para determinar modificaciones en el número de sitios receptores. Sin embargo, los receptores no fueron caracterizados.

Mediante estudios farmacológicos se determinó en distintas células y tejidos la presencia de diferentes receptores para catecolaminas, definidos en base a la potencia con que varios agonistas o antagonistas, estimulan o inhiben respectivamente, la respuesta mediada por ellos.

Las dos principales clases de receptores son denominados receptores α y β adrenérgicos. Cada uno de ellos comprende dos subclases: α_1 , α_2 y β_1 , β_2 . Los receptores β_1 y β_2 estimulan el sistema de la adenilato ciclasa, catalizando la formación del segundo mensajero AMPcíclico. Los α_2 inhiben a la enzima a través de la participación de la proteína G inhibitoria, mientras α_1 , no produce cambios en la actividad de la adenilato ciclasa, sino, más bien, estaría relacionado con los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Lefkowitz y col., 1983; Lefkowitz y Caron, 1988).

La caracterización de los receptores adrenérgicos con (-)dihidro-alprenolol (antagonista β) en membranas de células TAE, permitió determinar la presencia de receptores. El requerimiento de concentraciones elevadas de fenilefrina, un agonista β ($>10^{-3}\text{M}$), dopamina ($>10^{-3}\text{M}$) y serotonina ($>10^{-3}\text{M}$) (Tabla 6.2) indica la especificidad de unión del agonista al receptor.

Los valores de K_d 6,15 nM y el número máximo de sitios de unión en la membrana 29,6 pmoles/g.prot.(figura 6.3) son similares a los observados en células de linfoma S49 de ratón y células de glioma C6 (Hoebeke y col., 1984).

Los resultados mencionados respecto de un aumento en la concentración intracelular de AMPcíclico cuando las células TAE se incubaron con adrenalina o con L-Isoproterenol y la existencia de receptores β sugirieron el estudio del

efecto de las catecolaminas y del agonista β sobre el transporte de aminoácidos en células TAE.

La incubación de las células con adrenalina y L-isoproterenol no modificó la actividad de transporte por el sistema L (figura 6.4a) resultado similar al observado en muchas células y tejidos (Shotwell y col., 1983). Por otro lado, el tratamiento con las mismas sustancias no produjo modificación sobre la actividad del sistema A, en las condiciones experimentales utilizadas (figura 6.4b). En general, el efecto de las catecolaminas sobre la actividad del sistema A puede ser estimulatorio, como en hepatocitos en cultivo, cortes de hígado, mucosa del yeyuno de rata y en células de osteosarcoma de rata o inhibitorio, como en adipocitos de ratón, células de diafragma y en cortes de glándula parótida de rata (Guidotti y col., 1978; Baun y Shteyer, 1987).

Por otro lado, los datos obtenidos coinciden con otro resultado experimental: en la incubación con dibutirilAMPcíclico, no se observó modificación de las actividades de los sistemas L y A (Resultados, VI.3).

En los primeros estudios realizados con tejido hepático, se observó que el AMPcíclico media la inducción del transporte de aminoácidos por el glucagón, basado en parte por el incremento simultáneo del nucleótido cíclico y la entrada de aminoácidos. Más recientemente los resultados indican que el aumento del AMPcíclico puede no ser necesario para la estimulación del transporte por glucagón o catecolaminas (Pariza y col., 1976). Así, la incubación de hepatocitos de rata con 3-isobutil-1-metilxantina, un inhibidor de la actividad fosfodiesterásica, incrementó los niveles de AMPcíclico pero no modificó el transporte de aminoácidos.

Pariza y col. (1977) observaron que, mientras adrenalina e isoproterenol aumentaban el contenido endógeno de AMPcíclico, sólo la adrenalina incrementaba el transporte de α -AIB. Además, la relación entre los cambios en el nivel intracelular de AMPcíclico y cambios en el transporte de aminoácidos, por el tratamiento con hormonas en diferentes líneas de hepatomas, también sugiere que el aumento en el nucleótido cíclico puede no ser necesario ni suficiente para observar regulación hormonal del transporte (Shotwell y col., 1983).

Estos resultados son concordantes con los observados en células TAE, en los cuales cuando éstas se incuban con glucagón, adrenalina, L-isoproterenol o dibutirilAMPcíclico, se observa un aumento en el contenido intracelular del nucleótido cíclico, sin modificación de la actividad de transporte.

Desde los primeros experimentos que se llevaron a cabo en células eucariotas para investigar el efecto de la carencia de aminoácidos en el medio de cultivo, sobre la actividad de los sistemas transportadores se sugirió la posibilidad de que las modificaciones observadas fueran la consecuencia de un mecanismo de regulación del proceso de entrada. Existen suficientes evidencias experimentales que indican que el sistema A pero no el L modifica su actividad cuando las células o tejidos se incuban en un medio libre de aminoácidos. Cuando las células TAE se incuban en condiciones de ayuno, no se modifican los valores de entrada de L-leucina por el sistema L (figura 7.1) resultado que está de acuerdo con lo observado en otros tejidos y células (Guidotti y col., 1978; Shotwell y col., 1983). Por otro lado, la entrada de α -AIB por el sistema A no es afectada por la incubación en un medio libre de aminoácidos (figura 7.1).

Guidotti y col. (1975) observaron que células de hepatoma de Yoshida, una línea celular neoplásica, también de origen epitelial, no regulan su actividad de transporte por cambios en la concentración externa de nutrientes. Además, estos autores, sugieren que la ausencia de regulación adaptativa podría ser una característica de las células tumorales. Sin embargo, en diferentes líneas de hepatomas en cultivo se observó un incremento en la actividad de transporte por el sistema A, indicando que la pérdida de respuesta adaptativa, no es necesariamente, una característica de transformación maligna *in vivo* (Heaton y Gelehrter, 1977; Kelly y Potter, 1979; White y Christensen, 1983; Kilberg y col., 1985)

Con el fin de comparar la operación del mecanismo de regulación adaptativa en células transformadas *in vivo* (células TAE) e *in vitro*, se comenzó el estudio en dos líneas de fibroblastos en cultivo: fibroblastos A-31 provenientes de embriones de ratón y fibroblastos BPA-31, derivados de los anteriores por transformación con un agente químico: el benzopireno.

El proceso de transformación *in vivo*, en general, conduce a un aumento de la incorporación de nutrientes por parte de las células neoplásicas

respecto de las células normales. Esta característica le confiere una ventaja selectiva al tumor sobre el tejido normal que lo rodea.

En el caso de las células transformadas *in vitro*, por agentes químicos o virus, la transformación puede o no estar asociada con un incremento en el transporte de aminoácidos.

Previo al estudio de la regulación adaptativa se caracterizaron los sistemas de transporte de aminoácidos. En ambas líneas celulares, A-31 y BPA 31 (figura 7.2) el transporte de aminoácidos neutros es mediado por los sistemas A, L y ASC. La afinidad (K_m) y número de transportadores ($V_{m\acute{a}x}$) para los sistemas L y ASC es similar en los fibroblastos normales y transformados (Tabla 7.1). En cambio, para el sistema A, si bien los valores de K_m no difieren, la $V_{m\acute{a}x}$ es mayor en los fibroblastos BPA-31 que en los normales (Tabla 7.1). Además, la actividad basal de transporte de los sistemas A, L y ASC es mayor en las células transformadas. El aumento en el sistema A es el más importante: 6 veces respecto de las células normales (Tabla 7.2). Estos datos son coincidentes con los presentados por Boerner y Saier (1982); células MDCK luego de la transformación por nitrosoguanidina, presentaron una actividad de transporte por el sistema A, 3 a 7 veces más elevada. Por otro lado, los resultados obtenidos con células transformadas por virus muestran que la actividad basal de transporte puede estar aumentada, como en el caso de células transformadas por el virus SV40 (Borghetti y col., 1980; Dubrow y col., 1978) o no presentan modificación, como en células transformadas por el virus del sarcoma de Rous (Nakamura y Weber, 1979; Inui y col., 1980).

De los tres sistemas de transporte estudiados, sólo en el sistema A, en fibroblastos normales, opera el mecanismo de regulación adaptativa (Tabla 7.2). La entrada aumentó 7 veces luego de 6 horas de incubación en un medio libre de aminoácidos.

La disminución de la actividad del sistema L, en ambas líneas celulares, por el ayuno de aminoácidos (Tabla 7.2 y figura 7.3) se caracteriza por una menor $V_{m\acute{a}x}$ sin modificación de los valores de K_m (Tabla 7.3). Similares resultados fueron observados en células de hepatoma en cultivo (Kelley y Potter, 1970; Heaton y Gelehrter, 1977; Kilberg y col., 1985) y en fibroblastos humanos en cultivo (Gazzola y col., 1980). A este respecto, Gazzola y col.,

explican esos resultados como consecuencia del bajo contenido intracelular de aminoácidos transportados por el sistema L por el ayuno, disminuyendo así la eficiencia del mecanismo de *trans*-estimulación característico de ese sistema.

La determinación de la entrada de aminoácidos por el sistema ASC (figura 7.4) muestra que su actividad no es modificada por la incubación en un medio libre de aminoácidos, datos concordantes a los presentados por otros autores (Gazzola y col., 1981; Kilberg y col., 1985).

En un estudio más detallado de la modificación de la entrada de α -AIB en células A-31, se observó que un efecto del ayuno de aminoácidos se observa por cada una de las concentraciones externas del aminoácido ensayadas (figura 7.5). Hay un aumento de la entrada y un incremento progresivo del valor de $V_{m\acute{a}x}$ (Tabla 7.4) sin modificación de la afinidad del transportador (K_m). Esto indica que como consecuencia del ayuno se aumenta la síntesis y por lo tanto el número de proteínas transportadoras. Esto explica que la incubación con actinomicina D o con cicloheximida, eliminan dicho efecto (figura 7.8). Por otro lado, sólo la presencia de un aminoácido como L-alanina (transportado por el sistema A) en el medio de incubación es suficiente para evitar un aumento en el transporte de α -AIB, indicando el funcionamiento de un mecanismo de represión o de *trans*-inhibición o de ambos.

Estos resultados son consistentes con el modelo propuesto por Englesberg y col. (1986) para explicar el mecanismo de regulación adaptativa en células CHO-K1 (Introducción figura 3.b).


La comparación del efecto del ayuno de aminoácidos sobre la actividad de transporte y los parámetros cinéticos de α -AIB en células A-31 y BPA-31 (figura 7.6 y Tabla 7.4) muestra en las células normales un valor de entrada similar al observado en las células transformadas luego de 6 horas de incubación. Asumiendo que el modelo de Englesberg y col. es aplicable a estas células, las evidencias señalan que el sistema A en las células normales, está reprimido por la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo en el cual crecen. La incubación posterior en un medio libre de aminoácidos desreprime el sistema, permitiendo así la síntesis de nuevos transportadores cuya consecuencia es el aumento de la actividad de transporte.

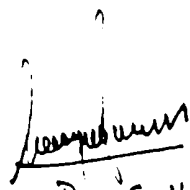
Por otro lado, las células transformadas estarían totalmente desreprimidas y por lo tanto, la incubación en condición de ayuno no modifica su actividad. A este respecto hay evidencias para suponer que la falta de regulación adaptativa en las células TAE, también se debe a que el sistema A está desreprimido. Una de ellas, es la baja concentración de nutrientes en el fluido ascítico, (Resultados III) especialmente aminoácidos y glucosa, lo que conduciría a una desrepresión del sistema A *in vivo*; la incubación posterior sin aminoácidos no modifica su actividad. Además Neville y col. (1980) en buena concordancia con la idea propuesta, demuestran que las células TAE incorporan unas 10 veces más α -AIB que las células de glándula mamaria de ratones hembras preñadas o en el período de lactancia (Gazzola y col., 1985).

CONCLUSIONES

1. Las células de tumor ascítico Ehrlich presentan una alta velocidad de consumo de glucosa *in vitro*, con una disminución del pH externo por la liberación de lactato. Estos datos son consistentes con lo observado *in vivo*: la glucemia del ratón inoculado con las células disminuye significativamente y el fluido ascítico intraperitoneal adquiere un pH ácido. La determinación de la concentración de los aminoácidos libres intracelulares y en el fluido ascítico, señala la existencia de un proceso de acumulación de aminoácidos, cuya magnitud está relacionada con la estructura y con el sistema de transporte utilizado para su incorporación.
2. En las células TAE, la entrada de aminoácidos neutros es mediada por tres sistemas de transporte: los sistemas A, L y ASC. El análisis cinético de la actividad del sistema A demuestra la operación de una población homogénea de proteínas transportadoras, capaces de llevar a cabo un transporte concentrativo, mediante un proceso saturable. El análogo de L-alanina, α -AIB, utilizado para el estudio de este sistema no es metabolizable, no se incorpora a proteínas y al tiempo elegido para la medición de la entrada, el proceso de salida del aminoácido hacia el medio externo no es detectable. Similares resultados se observaron para el sistema L, Na^+ -independiente, cuando el aminoácido L-leucina se utilizó para su estudio. El sistema ASC es de baja actividad en estas células.
3. Cuando las células TAE se incuban con insulina no se observa modificación de la actividad del sistema A. Por otro lado, la incubación con la hormona produce una inhibición parcial de la entrada de L-leucina. Las evidencias experimentales indican un efecto indirecto de la hormona sobre la actividad del sistema L. El aumento de la síntesis proteica por la incubación con insulina, conduce a una disminución de las concentraciones intracelulares de aminoácidos que son transportados por este sistema. Como consecuencia, el mecanismo de *trans*-estimulación opera con baja eficiencia, lo cual origina una inhibición parcial de la entrada de L-leucina.
4. No se observa modificación sobre las actividades de los sistemas A y L, en células TAE incubadas con glucagón.

5. En las condiciones experimentales elegidas para la medida de la concentración intracelular de AMPcíclico y de la actividad de los sistemas A y L, en células incubadas con adrenalina y L-isoproterenol, se observa un aumento de la concentración del nucleótido cíclico, sin modificación de la entrada por los dos sistemas. Resultados similares se observan cuando las células se incuban con dibutirilAMPcíclico.
6. En suspensiones de membrana citoplasmática de células TAE se caracterizaron receptores β -adrenérgicos, los cuales presentan una constante de disociación (K_d) de 6,15 nM y un número máximo de sitios de unión de 29,6 pmoles/g. prot..
7. En la incubación en un medio libre de aminoácidos, para el estudio de la respuesta en condiciones de ayuno, no hay modificación en los valores de entrada por los sistemas A y L en células TAE, células transformadas espontáneamente *in vivo*
8. En el estudio de la regulación adaptativa en una línea de fibroblastos de ratón BPA-31, células transformadas *in vitro* la incubación en condiciones de ayuno no altera la actividad de los sistemas A, L y ASC, mientras que en fibroblastos normales, A-31, se observa una desrepresión del sistema A, sin variación en la actividad de los sistemas L y ASC. La actividad del sistema A luego del ayuno, es similar al de las células transformadas sin ayunar. El análisis cinético del sistema A en las células A-31, revela un incremento en el valor de $V_{m\acute{a}x}$, sin modificación del K_m , indicando un aumento en el número de proteínas transportadoras, confirmado por la participación de la síntesis de ARN y proteínas. De los resultados expuestos en 7 y 8, se puede inferir que el sistema A, en las dos líneas celulares transformadas *in vivo* e *in vitro* están desreprimidas por lo que una incubación en condiciones de ayuno no modifica la actividad del sistema A.


SUSANA SALCEDA


Dr. E.H. Ramos

REFERENCIAS

- Alvarado, F. (1966) *Science* 151, 1010-1017.
- Bannai, S., Christensen, H. N., Vadgama, J. V., Ellory, J. C., Englesberg, E., Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., Kilberg, M. S., Lajtha, A., Sacktor, B., Sepulveda, F. V., Young, J. D., Yudilevich, D. y Mann, G. (1984) *Nature* 311, 308.
- Barber, E. F., Handlogten, M. E. y Kilberg, M. S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11851-11855.
- Baserga, R. (1965) *Cancer Res.* 25, 581-595.
- Bass, R., Hedegaard, H. B., Dillehay, L., Moffett, J. y Englesberg, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10259-10266.
- Bassler, R. y De Parmentier, F. (1977) *Eur. J. Cancer* 13, 589-592.
- Baum, B. J. y Shteyer, A. (1987) *Exp. Cell Res.* 169, 453-457.
- Boerner, P. y Saler Jr., M. H. (1982) *J. Cell Physiol.* 113, 240-246.
- Boerner, P. y Saler Jr., M. H. (1985) *J. Cell. Physiol.* 122, 308-315.
- Bohmer, F. D., Kurtskhallia, T. V., Grosse, R. y Girshovich, A. S. (1983) *Biomed. Biochim. Acta* 42, 471-477.
- Borguetti, A. F., Piedemonte, G., Tramacere, M., Severini, A., Ghiringhelli, P. y Guidotti, G. G. (1980) *J. Cell. Physiol.* 105, 39-49.
- Bracy, D. S., Handlogten, M. E., Barber, E. F., Han, H. P. y Kilberg, M. S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1514-1520.
- Bracy, D. S., Schenerman, M. A. y Kilberg, M. S. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 899, 51-58.
- Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
- Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P. y Sgherzi, A. M. (1971) *Biochem. J.* 121, 561-562.
- Butcher, F. R., Scott, D. F., Potter, V. R. y Morris, H. P. (1972) *Cancer Res.* 32, 2135- 2140.

- Canivet, B., Fehlmann, M. y Freychet, P. (1980) *Mol. Cell. Endocrinol.* 19, 253-261.
- Cecchini, G., Payne, G. S. y Oxender, D. L. (1977) *J. Supramol. Struct.* 7, 481-487.
- Christensen, H. N. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3584-3589.
- Christensen, H. N. (1969) *Adv. Enzimol.* 32, 1-20.
- Christensen, H. N. (1973) *Fed. Proc.* 32, 19-28.
- Christensen, H. N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 779, 255-269.
- Christensen, H. N. (1985) *J. Membrane Biol.* 84, 97-103.
- Christensen, H. N. y Clifford, J. B. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 1743-1745.
- Christensen, H. N. y Handlogten, M. E. (1977) *J. Membrane Biol.* 37, 193-211.
- Christensen, H. N. y Handlogten, M. E. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 102-107.
- Christensen, H. N., de Cespedes, C., Handlogten, M. E. y Ronquist, G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 300, 487-522.
- Christensen, H. N., de Cespedes, C., Handlogten, M. E. y Ronquist, G. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 227, 355-379.
- Christensen, H. N., Handlogten, M. E., Lam, I., Tager, H. S. y Zand, R. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1510-1520.
- Christensen, H. N., Oxender, D. L., Liang, M. y Vatz, K. A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3609-3616.
- Christensen, H. N., Streicher, J. A. y Elbinger, R. L. (1948) *J. Biol. Chem.* 172, 515-521.
- Christensen, H. N., Liang, M. y Archer, E. G. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5237-5246.
- Christopher, C. W., Nishino, H., Schiller, R. M. M., Isselbacher, K. J. y Kalckar, H. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 1878-1881.

- _ Cornell, J. S. y Melster, A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 420-422.
- _ Crane, R. K., Field, R. A. y Cori, C. F. (1957) J. Biol. Chem. 224, 649-662.
- _ Crettaz, M., Kahn, C. R. y Fehlmann, M. (1983) J. Cell. Physiol. 115, 186-190.
- _ Cuesta Casado, M. C. Tesis doctoral. En redacción.
- _ Cuesta Casado, M. C. y Ramos, E. H. (1981) Cell. Mol. Biol. 27, 635-645.
- _ Dall'Asta, V., Gazzola, G. C. y Guidotti, G. G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 507, 165-174.
- _ Dall'Asta, V., Gazzola, G. C., Franchi-Gazzola, R., Bussolati, O., Longo, N. y Guidotti, G. G. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6371-6379.
- _ Davis, B. D. (1956) H. Ford Hospital Intern. Symps. (O.H. Gaebler editor) Acad. Press N.Y.
- _ DeBlasi, A., Maisel, A. S., Feldman, R. D., Ziegler, M. G., Fratelli, M., DiLallo, M., Smith, D. A., Lai, C.-Y. C. y Motulsky, H. J. (1986) J. Clin. Endocrinol. Metab. 63, 847-853.
- _ Defendi, V. y Manson, L. A. (1963) Nature 198, 359-361.
- _ Denton, R. M. (1986) en Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research, Vol. 20, editado por P. Greengard y G. A. Robinson, 293-341, Raven Press, New York.
- _ Derr, J. T. y Smith, G. L. (1980) J. Cell. Physiol. 102, 55-62.
- _ Doudoroff, M. (1951) en Phosphorous Metabolism (Mc. Elroy, W. D. y Glass, B. editores) The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1-42.
- _ Dubrow, R., Pardee, A. B. y Pollack, R. (1978) J. Cell. Physiol. 95, 203-212.
- _ Eavenson, E. y Christensen, H. N. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5388-5396.
- _ Edmondson, J. W. y Lumeng, L. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 61-68.
- _ Edmondson, J. W., Lumeng, L. y Li, T. K. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1653-1658.

- Ehrlich, P. (1907) Ztschr. F. Krebsforsch 5, 59-81.
- Ehrlich, P. y Apolant, H. (1905) Berliner Klinische Wochenschrift 42, 871-874.
- El-Gewely, M. R. y Oxender, D. L. (1985) Ann. N. Y. Acad. Sci. 456, 417-419.
- Ellory, J. C., Jones, S. E. M., Preston, R. L. y Young, J. D. (1981) J. Physiol. (Londres) 320, 79-81.
- Englesberg, E. y Moffett, J. (1986) J. Membrane Biol. 91, 199-213.
- Englesberg, E., Moffett, J. y Pérler, F. (1986) Fed. Proc. 45, 2441-2443.
- Fafournoux, P., Remesy, C. y Demigne, C. (1983) Biochem. J. 210, 645-652.
- Fehlmann, M., Le Cam, A. y Freychet, P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10431-10437.
- Fehlmann, M., LeCam, A., Kitabgi, P., Rey, J. F. y Freychet, P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 401-407.
- Fincham, D. A., Mason, D. K. y Young, J. D. (1982) Biochem. Soc. Trans. 11, 776-777.
- Finkelstein, M. C., Slayman, C. W. y Adelberg, E. A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 4549-4551.
- Franchi-Gazzola, R., Gazzola, G. C., Dall'Asta, V. y Guidotti, G. G. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9582-9587.
- Franchi-Gazzola, R., Gazzola, G. C., Ronchi, P., Saibene, V. y Guidotti, G. G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 545-556.
- Friedberg, S. H., Oka, T. y Topper, Y. J. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1493-1500.
- Fung, K. P., Chan, T. W. y Choy, Y. M. (1985) Cancer Letters 28, 273-280.
- Fung, K. P., Choy, Y. M., Chan, T. W., Lam, W. P. y Lee, C. Y. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 1231-1237.

- Gazzola, G. C., Dall'Asta, V. y Guidotti, G. G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 929-936.
- Gazzola, G. C., Dall'Asta, V. y Guidotti, G. G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3191-3198.
- Gazzola, G. C., Dall'Asta, V., Bussolati, O., Makowske, M. y Christensen, H. N. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 6054-6059.
- Gazzola, G. C., Dall'Asta, V., Franchi-Gazzola, R. y White, M. F. (1981) *Anal. Biochem.* 115, 368-374.
- Gazzola, G. C., Dall'Asta, V., Franchi-Gazzola, R., Bussolati, O., Longo, N. y Guidotti, G. G. (1985). En Galeotti T. et al (ed). *Cell membranes and cancer*. Amsterdam Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division). 169-174.
- Gazzola, G. C., Franchi, R., Salbene, V., Ronchi, P. y Guidotti, G. G. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266, 407-421.
- Gazzola, G. C., Franchi-Gazzola, R., Ronchi, P. y Guidotti, G. G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 311, 292-301.
- Goldberg, L., Klein, E. y Klein, G. (1950) *Exp. Cell Res.* 1, 543-570.
- Goldfine, I. D. y Sherline, P. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6927-6931.
- Goldie, H. y Felix, M. D. (1951) *Cancer Res.* 11, 73-80.
- Guidotti, G. G., Borghetti, A. F. y Gazzola, G. C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 329-366.
- Guidotti, G. G., Gazzola, G. C., Borghetti, A. F. y Franchi-Gazzola, R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 406, 264-279.
- Hacking, C. y Eddy, A. A. (1981) *Biochem. J.* 194, 415-426.
- Handlogten, M. E., Kilberg, M. S. y Christensen, H. N. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 345-348.
- Haouschka, T. S. y Levan, A. (1953) *Exp. Cell Res.* 4, 457-467.

- Hayes, M. R. y McGivan, J. D. (1982) *Biochem. J.* 204, 365-368.
- Heaton, J. H. y Gelehrter, T.D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2900-2907.
- Heinz, A., Sachs, G. y Schafer, J. A. (1981) *J. Membrane Biol.* 61, 143-153.
- Hershko, A., Mamont, P., Shields, R. y Tomkins, G. M. (1971) *Nature, New Biol.* 232, 206-211.
- Heyworth, C. M. y Houslay, M. D. (1983) *Biochem. J.* 214, 547-552.
- Higashi, T., Tateishi, N., Naruse, A. y Sakamoto, Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 1280-1286.
- Hissin, P. J. y Hilf, R. (1978) *Cancer Res.* 38, 3646-3655.
- Hoebeke, J., Durieu, O., Delavier, C., Schmutz, A. y Strosberg, A. D. (1984) en *Advances in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*, Vol. 17, editado por P. Greengard y col., 73-80, Raven Press, New York.
- Hopfer, V. (1977) *Am. J. Physiol.* 233, E 445-449.
- Horak, J. (1986) *Biochim Biophys. Acta* 864, 223-256.
- Hume, S. P. y Lamb, J. F. (1976) *J. Physiol. (Londres)* 259, 83-101.
- Hume, S. P., Lamb, J. F. y Weingart, R. (1975) *Nature* 255, 73-74.
- Inoue, M., Horuchi, S. y Morino, J. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1104-1110.
- Inui, K. I., Tillotson, L. G. e Isselbacher, K. J. (1980) *Biochim. Biophys Acta* 598, 616-627.
- Jacquez, J. A. (1975) *J. Gen. Physiol.* 65, 57-83.
- Kanematsu, S. (1953) *Cancer Res.* 13, 431-441.
- Kelley, D. S. y Potter, V. R. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 9009-9017.
- Kelley, D. S. y Potter, V. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6691-6697.
- Kilberg, M. S. (1982) *J. Membrane Biol.* 69, 1-12.

- _ Kilberg, M. S. (1986)a *Fed. Proc.* 45, 2438-2454.
- _ Kilberg, M. S. (1986)b *Trends Biochem. Sci.* 11, 183-186.
- _ Kilberg, M. S., Bracy, D. S. y Handlogten, M. E. (1986) *Federation Proc.* 45, 2438-2440.
- _ Kilberg, M. S., Han, H. P., Barber, E. F. y Chiles, T. C. (1985) *J. Cell. Physiol.* 122, 290-298.
- _ Kilberg, M. S., Handlogten, M. E. y Christensen, H. N. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4011-4019.
- _ Kilberg, M. S., Handlogten, M. E. y Christensen, H. N. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3304-3312.
- _ Kinzle, J. L., Grimme, N. L. y Alpers, D. H. (1976) *Biochem. Pharmacol.* 25, 2727-2731.
- _ Klein, E. (1954) *Cancer Res.* 14, 482-485.
- _ Klein, E. (1955)a *Exp. Cell Res.* 8, 188-212.
- _ Klein, E. (1955)b *Exp. Cell Res.* 8, 213-225.
- _ Klein, E., Kurnich, N. B. y Klein, G. (1950) *Exp. Cell Res.* 1, 127-134.
- _ Klein, G. (1951) *Exp. Cell Res.* 2, 518-573.
- _ Klein, G. y Klein, E. (1951) *Cancer Res.* 11, 466-469.
- _ Klein, G. y Klein, E. (1956) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63, 640-661.
- _ Klip, A., Gangalang, E. y Logan, W. J. (1983) *FEBS Lett.* 152, 171-174.
- _ Kostyo, J. L. y Rillema, J. A. (1971) *Endocrinology* 88, 1054-1062.
- _ Kurokawa, T., Kurokawa, M. y Ishibashi, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 583, 467-473.
- _ Kurokawa, T., Kurumada, H., Yokota, M., Yoshida, M. y Ishibashi, S. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 632, 138-140.
- _ Lazo, P. A. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 19-25.

- LeCam, A y Freychet, P. (1978) *Endocrinology* 102, 379-385.
- Lefkowitz, R. J. y Caron, M. G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4993-4996.
- Lefkowitz, R. J., Stadel, J. M. y Caron, M. G. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 159-186.
- Lever, J. E., Kennedy, B. G. y Vasan, R. (1984) *Arch. Biochem. Biophys* 234, 330-340.
- Loewenthal, H. y Jahn, G. (1932) *Z. Krebsforsch* 37, 439-447.
- Logan, W. J., Klip, A. y Gangalang, E. (1982) *J. Cell. Physiol.* 112, 229-236.
- Longo, N., Franchi-Gazzola, R., Bussolati, O., Dall'Asta, V., Foà, P. P., Guidotti, G. G. y Gazzola G. C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 844, 216-223.
- Loten, E. G. y Sneyd, J. G. T. (1970) *Biochem. J.* 120, 187-193.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lucas, M. y Bockaert, J. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13, 314-329.
- Lynch, A. M. y McGivan, J. D. (1987) *Biochem. J.* 244, 503-508.
- Makino, H. y Kono, T. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7850-7854.
- Makowske, M. y Christensen, H. N. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14635-14638.
- Markewell, M. A. K., Haas, S. M., Bleber, L. L. y Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
- Matthews, R. M. y Zand, R. (1977) *Biochemistry* 16, 3820-3824.
- McCormick, J. I. y Johnstone, R. M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8111-8119.
- McGivan, J. D., Bradford, N. M. y Mendes-Mourão, J. (1977) *FEBS. Lett.* 80, 380-384.
- McGivan, J. D., Ramsell, J. y Lacey, J. H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 644, 295-304.
- Meister, A. (1973) *Science, N. Y.* 180, 33-39.

- Moffett, J. y Englesberg, E. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4, 799-808.
- Moffett, J. y Englesberg, E. (1986) *J. Cell. Physiol.* 126, 421-429.
- Moffett, J., Jones, M. y Englesberg, E. (1987) *Biochemistry* 26, 2487-2494.
- Moffett, J., Pérler, F., Jones, M. y Englesberg, E. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8040-8043.
- Mohri, T., Kitagawa, H. y Riggs, T. H. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 363, 249-260.
- Moore, P. A., Jayme, D. W. y Oxender, D. L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7427-7430.
- Moreno, A., Lobatón, C. D. y Oxender, D. L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 819, 271-274.
- Moule, S. K., Bradford, N. M. y Mc Givan, J. D. (1987) *Biochem. J.* 241, 737-743.
- Nakamura, K. D. y Weber, M. J. (1979) *J. Cell Physiol.* 99, 15-22.
- Neville, M. C., Lobitz, C. J., Ripoll, E. A. y Tinney, C. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7311-7316.
- Newey, H. y Smyth, D. N. (1964) *Nature* 202, 400-404.
- Oxender, D. L. (1972) *Annu. Rev. Biochem.* 41, 777-814.
- Oxender, D. L. y Christensen, H. N. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3686-3699.
- Oxender, D. L., Collarini, E. J., Shotwell, M. A., Lobaton, C. D., Moreno, A. y Campbell, G. S. (1985) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456, 404-416.
- Pariza, M. W., Butcher, F. R., Becker, J. E. y Potter, V. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 234-237.
- Pariza, M. W., Butcher, F. R., Kletzlen, R. F., Becker, J. E. y Potter, V. R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4511-4515.
- Patt, H. M. y Blackford, M. E. (1954) *Cancer Res.* 14, 391-396.

- Patt, H. M. y Straube, R. L. (1956) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63, 728-736.
- Peck, W. A., Rockwell, L. H. y Lichtman, M. A. (1976) *J. Cell. Physiol.* 89, 417-428.
- Petersen, O. H. (1974) *J. Physiol. (Londres)* 232, 647-654.
- Poole, D. T., Butler, T. C. y Williams, M. E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266, 463-470.
- Randerath, K. (1970) *Anal. Biochem.* 34, 188-205.
- Rannels, D. E., Kao, R. y Morgan, H. E. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1694-1701.
- Reynolds, R. A. y Segal, S. (1976) *Science* 184, 68-69.
- Reynolds, R., Rea, C. y Segal, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 426, 513-525.
- Riggs, T. R. y Pan, M. W. (1972) *Biochem. J.* 128, 19-27.
- Rosenberg, R., Young, J. D. y Ellory, J. C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 598, 374-384.
- Saler, M. H., Daniels, G. A., Boerner, P. y Lin, J. (1988) *J. Membrane Biol.* 104, 1-20.
- Sanders, R. B. y Jacob, W. H. (1970) *Fed. Proc.* 29, 924, abs.
- Santora, A. C. III, Wheeler, F. B., DeHaan, R. L. y Elsas, L. J. (1979) *Endocrinology*, 104, 1059-1068.
- Saunders, S. J. e Isselbacher, K. J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 102, 397-401.
- Schenerman, M. A. y Kilberg, M. S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 856, 428-436.
- Scott, D. F., Butcher, F. R., Potter, V. R. y Morris, H. P. (1972) *Cancer Res.* 32, 2127- 2134.
- Segel, G. B., Woodlock, T. J., Murant, F. G. y Lichtman, M. A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 16399-16402.

- Selby, C. C., Biesele, J. J. y Grey, C. E. (1956) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 63, 748-767.
- Sellar, M. J. y Benson, P. F. (1973) *Eur. J. Cancer* 9, 525-526.
- Shotwell, M. A. y Oxender, D. L. (1983) *Trends Biochem. Sci.* 8, 314-316.
- Shotwell, M. A., Jayme, D. W., Kilberg, M. S. y Oxender, D. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5244-5247.
- Shotwell, M. A., Jayme, D. W., Kilberg, M. S. y Oxender, D. L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 5422-5427.
- Shotwell, M. A., Kilberg, M. S. y Oxender, D. L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 737, 267-284.
- Shotwell, M. A., Mattes, P. M., Jayme, D. W. y Oxender, D. L. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2974-2980.
- Smith, C. H., Adcock, E. W. III, Teasdale, F., Meschia, G. y Battaglia, F. C. (1973) *Am. J. Physiol.* 224, 558-564.
- Steiner, A. L., Parker, C. W. y Kipnis, D. M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1106-1113.
- Torres, H. N., Flawlá, M. M., Hernaez, L. y Cuatrecasas, P. (1978) *J. Membrane Biol.* 43, 1-18.
- Touabi, M. y Jeanrenaud, B. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 173, 128-140.
- Tramacere, M., Borghetti, A. F. y Guidotti, G. G. (1977) *J. Cell. Physiol.* 93, 425-434.
- Trinder, P. (1969) *Ann. Clin. Biochem.* 6/24.
- Vadgama, J. V. y Christensen, H. N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2912-2921.
- Van Slyke, D. D. y Meyer, G. M. (1913) *J. Biol. Chem.* 16, 197-212.
- Van Winkle (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 173-208.
- Weissbach, L., Handlogten, M. E., Christensen, H. N. y Kilberg, M. S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 12006-12011.

- _ White, M. F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822, 355-374.
- _ White, M. F. y Christensen, H. N. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 8028-8038.
- _ Winter, C. G. y Christensen, H. N. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 3594-3600.
- _ Wise, W. C. (1976) *J. Cell. Physiol.* 87, 199-212.
- _ Young, J. D., Ellory, J. C. y Tucker, E. M. (1975) *Nature* 254, 156-157.