

**IV CONGRESO CONO SUR  
ASOCIACION PANAMERICANA DE SOCIEDADES DE BIOQUIMICA  
(PAABS)**

**XXIX REUNION ANUAL DE LA  
SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE CHILE**

**X REUNION ANUAL DE LA  
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE**

**VIII REUNION ANUAL DE LA  
SOCIEDAD DE FARMACOLOGIA DE CHILE**

**COMUNICACIONES LIBRES**

**Pucón, Chile  
26 al 29 de noviembre de 1986**

EVIDENCIAS DE LA DEPENDENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACION-LIBERACION DE TERMINALES AMINOACIDICOS EN ESTRIADO DE RATA. (Evidence for extracellular calcium dependence on the excitation-liberation coupling in aminoacidic nerve terminals from rat striatum). Abarca, J. Lab. Farmacología-Bioquímica, P. Universidad Católica de Chile.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, hemos encontrado que el análogo de ácido L-Glutámico, el ácido [3H]-D-aspartico (D-asp) se libera rápidamente por condiciones despolarizantes y depende del calcio extracelular en menor proporción aparente que la liberación de aminas biogénicas, sugiriendo que parte del  $Ca^{+2}$  externo participa en el acoplamiento excitación-liberación de aminoácidos excitatorios. Estos resultados nos llevaron a estudiar si condiciones que alteran la movilización de  $Ca^{+2}$ , como cationes divalentes o antagonistas de calcio son capaces de modificar la liberación evocada de D-asp en estriado de rata.

Cortes estriatales, preincubados con D-asp, se superfundieron con KRF en presencia de diversos agentes y se estimularon con exceso de  $K^{+}$  o Veratridina y se determinó la radioactividad en los perfusados. El  $Ba^{+2}$  (2 mM), induce la liberación de D-asp, en mayor magnitud que la respuesta evocada por  $K^{+}$  (53 mM) o Veratridina (10  $\mu$ M). El ionóforo A-23187 evocó una liberación de D-asp significativa. El  $Mn^{+2}$  (0,5-2 mM) inhibe la liberación de D-asp y este efecto es más intenso que el descrito para la liberación de Dopamina estriatal. Los inhibidores de  $Ca^{+2}$ ; Nifedipina, Verapamil y Diltiazem (100  $\mu$ M) inhiben la liberación inducida de D-asp. Además Trifluoroperazina disminuyó la liberación evocada de D-asp.

En conclusión, nuestros datos sugieren que condiciones que promueven o decrecen la entrada de calcio, aumentan o inhiben el acoplamiento excitación-liberación de D-asp de terminales nerviosos, indicando un importante rol para el calcio extracelular en el proceso de liberación de neurotransmisores del tipo aminoácidos excitatorios.

MECANISMOS SENSORIALES DE LAS BACTERIAS QUIMIOLITOTROFICAS: QUIMIOTAXIS Y RESPUESTA AL STRESS. (Sensory mechanisms in chemolithotrophic bacteria: chemotaxis and stress response). Acuña, J., Peirano, I. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las bacterias quimiolitotróficas acidófilas tienen gran importancia en la biolixiviación de minerales. En su ambiente natural, estos microorganismos se ven enfrentados a diversos tipos de stress, tales como cambios bruscos de temperatura, cambios de pH, presencia de metales pesados, etc. En este trabajo hemos estudiado los mecanismos quimiotácticos y de respuesta al shock térmico en estas bacterias, ya que estos pueden desempeñar un importante papel durante la lixiviación bacteriana.

Empleamos cepas puras de *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, las que se marcaron radiactivamente ya sea en presencia de L-(metil<sup>3</sup>H)metionina o  $Na_2^{14}CO_3$  y se analizaron los componentes mediante electroforesis mono y bidimensional seguidos de autorradiografía. La quimiotaxis in vivo se determinó utilizando células radiactivas mediante la técnica del capilar.

Encontramos que tanto *T. ferrooxidans* como *L. ferrooxidans* responden al shock térmico como lo hacen la mayoría de los organismos vivos estudiados, es decir, inhibiendo la síntesis de la mayor parte de los componentes celulares, y sintetizando en mayor cantidad un conjunto de proteínas denominadas proteínas del shock térmico. Estas proteínas tienen pesos moleculares en los rangos de 80 a 90 K, 68 a 74 K y 18 a 30 K, confirmando la universalidad del fenómeno del shock térmico.

Por otro lado, encontramos proteínas receptoras que aparentemente hacen que las bacterias nadan hacia  $Ni^{++}$  y  $Fe^{++}$  (atrayentes) y se alejen de sustancias como aspartato (repelentes). Estos resultados demuestran que las bacterias que participan en la biominería poseen tanto mecanismos defensivos como de adaptación, los cuales es necesario conocer ya que podrían ser eventualmente manipulados para obtener cepas más eficientes en el proceso de lixiviación.

Financiado por Proyecto PNUD/ONUDI CHI/85-002-01, FONDECYT 1108-85 y Universidad de Chile, B-1972-8634.

EFFECTOS DE MORFINA AGUDA Y CRONICA EN LA NEUROTRANSMISION DE LA VEJIGA URINARIA DE RATON (Effects of acute and chronic morphine in the neurotransmission of the mouse urinary bladder). Acevedo, C.G.; Contreras, E. Departamento Ciencias Fisiológicas, Facultad Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La suspensión de un tratamiento crónico con morfina incrementa la sensibilidad de órganos o tejidos inervados por el sistema nervioso autónomo. En este trabajo se estudió la influencia de tratamientos agudos y crónicos con morfina en la sensibilidad de la vejiga urinaria a acetilcolina y ATP, dos neurotransmisores que participan en la respuesta contráctil de este órgano.

Se empleó la técnica de órgano aislado para trozos de vejiga de ratones con y sin tratamiento con morfina mantenidos en solución Tyrode. Cuando se realizó estimulación eléctrica el tejido se ubicó entre electrodos de platino y se estimuló con frecuencias de 0.1 a 50 Hz con pulsos de 0.5 msec de duración y voltaje supramáximo. Acetilcolina se ensayó en forma acumulativa y el ATP en dosis simples. Las contracciones isométricas de la vejiga se registraron en un plígrafo Grass.

La respuesta de acetilcolina fue incrementada por la administración aguda de morfina. En cambio la acción de ATP no fue modificada por la administración aguda del analgésico. El tratamiento crónico con morfina no alteró las respuestas de la vejiga a la acetilcolina o ATP. La administración de metadona o ketociclazocina disminuyó las respuestas a la estimulación eléctrica, efectos depresores que no fueron modificados por naloxona.

Los resultados sugieren la inexistencia de receptores opiáceos en la vejiga urinaria de ratón como también la ausencia de efectos directos de morfina en la unión neuroefectora.

Proyecto 20.33.13 Dirección Investigación, Universidad de Concepción.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ENDO-NUCLEASA DE RESTRICCIÓN BstV I. (General properties of the restriction endonuclease BstV I). Alejandro Adams. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. (Patrocinio: Alejandro Venegas).

Algunas propiedades de BstV I, un isosquízomero termoestable de Xho I, han sido comunicadas anteriormente. Este trabajo dice relación con una caracterización en mayor profundidad de esta proteína. La enzima BstV I es producida por *Bacillus stearothermophilus*, de donde se obtiene con un rendimiento entre  $1-2 \times 10^6$  unidades por gramo de células (peso húmedo). Tal hecho convierte a esta cepa bacteriana en el mayor sobreproductor (silvestre) de endonucleasas de restricción descrito a la fecha.

La enzima se obtuvo libre de nucleasas inespecíficas por solo dos pasos cromatográficos: DEAE-celulosa y Azul de Cibacron. Su peso molecular fue determinado por filtración en Sepharose CL-6B y corresponde a 33 kdaltons, sin embargo, por PAGE-SDS hemos logrado obtener no menos de tres bandas polipeptídicas. En este estado de pureza la enzima es liofilizable sin dificultad, lo cual hace muy fácil su manejo y almacenamiento.

Las condiciones óptimas determinadas para su ensayo son: Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; NaCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 10  $\mu$ g/ml de BSA, aún cuando esta última condición es absolutamente dispensable. El catión divalente puede ser reemplazado por  $CoCl_2$  1 mM o  $MnCl_2$  5 mM, sin afectar la especificidad de la enzima.

BstV I es resistente a varios agentes desnaturalizantes como son: Triton-X-100, 20%, BSA 5%, SDS 0.015%, formamida 0.5% y DMSO 20%. La enzima puede ser preincubada 1-2 hrs. a 75°C o 1 min a 96°C con retención de más del 70% de la actividad. Tales propiedades la convierten en un excelente candidato para uso corriente en el laboratorio, en análisis de restricción y clonamiento molecular, operación en que fragmentos de DNA producidos por digestión con BstV I pueden ser ligados en el sitio para la enzima Sal I de diferentes vectores (pBR322, pUC8, pUC9, M13mp8, etc.).

Financiado por Fondecyt 5035/85 e IFS E/834-1.

INCIDENCIA DEL FITOMEJORAMIENTO EN LA CANTIDAD Y PROPORCIÓN DE ALCALOIDES EN SEMILLA DE *Lupinus mutabilis* SWEET (Incidence of breeding in amount and proportion of alkaloids in seed of *Lupinus mutabilis* SWEET). Aguillón, J.C. y von Baer, D. Fac. de Farmacia, U. de Concepción. von Baer, E. e Ibáñez, R. CAMPEX, Temuco. (Patrocinio: R. Massone).

*Lupinus mutabilis*, especie originaria del Altiplano Andino, destaca por el alto contenido de proteínas (> 45%) y de aceite (hasta 20%) en su semilla. Los alcaloides quinolizidínicos, amargos y tóxicos, en concentraciones mayores de 0.02% limitan la utilización directa de la semilla. En el presente trabajo se evalúa la incidencia de la selección de formas de muy bajo contenido de alcaloides llamadas "dulces", en el contenido de alcaloides totales y en la proporción de cada uno de ellos. La cuantificación de alcaloides se efectúa por cromatografía de gas con detector TSD (selectivo para N y P). De las líneas analizadas, sometidas a fitomejoramiento, la más baja en alcaloides tiene un contenido residual de sólo 0.0025%, en cambio en muestras del material original no sometido a selección los alcaloides totales llegan a 3.66%. Ello implica que mediante selección genética se ha logrado reducir sobre 1000 veces el nivel de alcaloides en semilla de *L. mutabilis*. En las 29 muestras analizadas el alcaloide presente en mayor proporción es Lupanina, mientras los otros (Esparteína, Hidroxilupaninas Tetrahidrorombifolina) están presentes en proporciones menores y variables. Se discute además, en base a las respectivas vías metabólicas involucradas, los fundamentos de la correlación negativa observada entre contenido de proteínas y de alcaloides en semilla de líneas de selección de *L. mutabilis* bajas en alcaloides.

Proyecto 20.71.05 Dirección de Investigación  
Universidad de Concepción.

INHIBIDOR ENDOGENO DE LA CMP-AcSIALICO: CER-LAC-SIALIL TRANSFERASA (HEMATOSIDO SINTETASA) DE CEREBRO DE RATA. (Endogenous inhibitor of the CMP-NeuNAc: Lac Cer-N-acetylneuraminyl transferase of rat brain). Albarracín, I., Lassaga, F.E. y Caputto, R. Dto. Química Biológica, CIQUIBIC, Fac. C. Químicas, Univ. Nacional de Córdoba, Argentina.

El sobrenadante de 100.000 x g de cerebro de rata inhibe la actividad de hematosido sintetasa de cerebro de rata. El inhibidor fue purificado por los procedimientos siguientes: calentamiento, cromatografía de filtración molecular y cromatografía de intercambio iónico. El material purificado, con una actividad específica de 170 veces mayor que el sobrenadante de 100.000 x g, presenta una sola banda proteica por electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS; cuando se corrió por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se desdobló en dos bandas proteicas que migran con un peso molecular aparente de 15 y 22 Kd. Pierde parte de su actividad inhibitoria por acción de enzimas proteolíticas (tripsina y quimotripsina). Presenta predominio de aminoácidos ácidos sobre aminoácidos básicos cuantificados por cromatografía líquida de alta presión. El material purificado presenta una inhibición de tipo no competitiva respecto a los sustratos dador (CMP-ácido siálico) y aceptor (ceramida-lactosa).

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE UNA FITOHEMOAGLUTININA AISLADA DE "MURTILLA" *Ugni molinae* (MIRTACEA CHILENA) (Electrophoretic analysis of a phytohaemagglutinin isolated from "murtilla" *Ugni molinae* a Chilean Mirtacea). Alay, F., Gavilán, J.F., González, R., Cabello, J. y Almonacid, H. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción. Proyecto DIC N° 20.31.07.

La presencia de compuestos químicos capaces de aglutinar glóbulos rojos de vertebrados ha sido informada por numerosos autores. Entre las aplicaciones de estos compuestos es notoria su utilidad en la identificación de grupos sanguíneos humanos ABO, MN y H, dado que se unen a determinantes antígenicos presentes en la superficie de los eritrocitos, razón por la cual las fitohemoaglutininas de tipo específico pueden ser utilizadas como marcadores genéticos.

Comunicaciones previas de nuestro laboratorio han establecido el procedimiento de extracción para aislar una fitohemoaglutinina de *U. molinae*. También se ha descrito la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos, de ratón (*A. swiss*) y de otras especies, encontrándose que las 3 fracciones cromatográficas analizadas (I, II y III) reaccionan positivamente frente a las muestras de glóbulos rojos. Esto parece indicar la existencia de una panaglutinina.

El presente trabajo comunica una nueva etapa en la purificación del compuesto mediante electroforesis de los extractos crudos colectados durante 8 meses (Marzo a Octubre de 1985) y de las fracciones I, II y III obtenidas de cada uno de los mismos. La electroforesis se hizo en geles de poliacrilamida al 5%, pH 8,3; aplicando 3m A/tubo, teñidos con Amido Black. Los geles muestran la presencia de 1 banda en las fracciones I, II y III, y de 2 bandas en los extractos crudos. Estos resultados se discuten y se relacionan con los establecidos para los meses de mayor actividad aglutinante de la fitohemoaglutinina.

TRYPANOSOMA CRUZI: EFECTO DE LA GLUCOSA, EL OXÍGENO Y DROGAS SOBRE SU CRECIMIENTO EN CULTIVO. (Effects of glucose, oxygen and drugs on the culture growth). Jorge Aldunate, Luis Muñoz, Igor Lipchenca, Ximena Vásquez y Yolanda Repetto. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Casilla 70086 Santiago - 7 Chile.

El *T. cruzi*, protozoo causante de la enfermedad de Chagas es posible de cultivar en su forma epimastigote en medios líquidos libres de células. En nuestro laboratorio se cultiva en medio Diamond's, que es pobre en hidratos de carbono. Fue nuestro interés estudiar el efecto de glucosa sobre los cultivos tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Además se adicionó drogas tripanosomicidas como nifurtimox y benznidazol y sustancias antioxidantes como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT), que son usados en forma habitual como aditivos de alimentos.

El crecimiento de los cultivos aumentó en un 400% al adicionarle glucosa al 0.25%. Este incremento es dependiente de oxígeno, pues no se manifiesta en condiciones anaeróbicas.

Las drogas tripanosomicidas inhibieron el crecimiento de los cultivos a concentraciones superiores a 10 µM. El efecto de BHA y BHT también fue inhibitorio a concentraciones superiores a 100 µM, al mantener los cultivos en presencia de oxígeno. En cambio, al agregar estos antioxidantes en condiciones anaeróbicas no se manifiesta el efecto inhibitorio del crecimiento. Tal hecho corrobora nuestros resultados previos que BHA y BHT actúan inhibiendo la cadena respiratoria del *T. cruzi* en el segmento NADH-citocromo b.

Financiado por UNDP/WHO/TDR, por CONICYT-CHILE y por la Universidad de Chile grant B-1854.

EFFECTO DE EXTRACTOS HIPOTALAMICOS EN RATONES TIMECTOMIZADOS. (Effect of hypothalamic extracts on thymectomized mice). Alfaro, L., Mena, M. y Esquivel, P. Inst. de Medicina Experimental, Universidad Austral de Chile.

El efecto de extractos hipotalámicos solubles sobre la respuesta inmune a tiroglobulina (Tg) ha sido recientemente comunicado. Debido a que hay evidencias que en este sistema existiría un eje de regulación en que el órgano target sería el timo, se propuso analizar el rol que estos extractos tienen en un modelo en que el timo ha sido tempranamente removido. Ratones RK fueron timectomizados a las 6 semanas de edad y a diferentes tiempos post timectomía recibieron un extracto de hipotálamo singéneo. Posteriormente fueron inmunizados con el método standard de inyección de Tg + LPS. La respuesta inmune contra Tg se determinó en las semanas siguientes. Los resultados demuestran que a las 5 semanas post-timectomía el extracto hipotalámico induce una buena recuperación de la respuesta, reducida por la timectomía. Sin embargo, a las 24 semanas post timectomía el animal timectomizado recupera espontáneamente su nivel de respuesta normal anti Tg, la cual es drásticamente suprimida al inyectar el extracto hipotalámico. Situación similar aunque con diferencias de título mucho más significativas se observa a las 38 semanas post-timectomía. Los resultados presentados pueden interpretarse en el sentido de tener en el extracto hipotalámico factores estimuladores o supresores dependiendo su expresión de la presencia o ausencia de células tíficas.

(Parcialmente financiado por Proyectos FONDECYT 1070/85 y DID-UACH S-84-08).

EXPRESION DE LA SUBUNIDAD 200K DEL NEUROFILAMENTO DURANTE LA MADURACION NEURONAL (Expression of the 200K neurofilament subunit during neuronal maturation). Allende, M., Cross, D. y Krauss, R. Grupo de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago. (Patrocinio: G. Ruiz).

Los neurofilamentos (NF) son elementos fibrilares de la neurona los cuales son transportados por flujo axonal y están constituidos por 3 subunidades (68-160-200K). De éstas, la mayor, presenta un interés especial debido a que su localización es exclusivamente axonal. Por lo tanto, hemos decidido usar la como marcador de la diferenciación neuronal.

Para estudiar el NF hemos preparado un anticuerpo anti-subunidad 200K el cual fue generado usando como inmunógeno, la subunidad respectiva purificada por electroforesis preparativa, a partir de médula de bovino. El suero obtenido que fue caracterizado por ELISA y Western blotting presenta un título de  $2^{10}$  para la subunidad de 200K y de  $2^0$  para la de 160K. Para cuantificar pequeñas cantidades de NF (20-40 ng) a partir de homogenizados de tejido neural, se desarrolló un "dot-blot immunobinding assay". Con este método más el Western blotting, se ha establecido: (1) la abundancia relativa de NF en distintas regiones del cerebro de rata y (2) la biosíntesis del NF axonal, en oocitos de Xenopus inyectados con mRNA cerebral obtenido de ratas adultas.

En trabajos futuros se analizará la aparición del NF y de su mRNA durante el desarrollo postnatal de rata en condiciones normales y en animales que presentan alteraciones de maduración neuronal.

Financiado por proyectos Stiftung Volkswagenwerk y DIUC (87/85) a los Drs. J. Alvarez y N.C. Inestrosa

DISOCIACION DE LAS RESPUESTAS DE PROLIFERACION Y CRECIMIENTO HIPERTROFICO EN GLANDULA PAROTIDA DE RATON. (Dissociation of proliferation and hypertrophic growth responses in mouse parotid gland). Allende, C. y Diaz Bórquez, H. Depto. Biología Celular y Genética Div. Norte y Depto. Cs. Med. Biol. y Básicas Div. Sur Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La administración intraperitoneal de una dosis farmacológica de isoproterenol a ratones provoca simultáneamente proliferación celular y crecimiento hipertrófico en parótidas de ratón. El análisis de los eventos moleculares diferencialmente asociados a estas dos respuestas precisa de su disociación experimental. Este trabajo tuvo como objeto abordar esta disociación mediante la evaluación de a) umbrales de respuesta, b) desfase en el cese de ambas respuestas y c) reinducción diferencial en glándulas hipertrofiadas en regresión. La respuesta de crecimiento celular y glandular fue medida por métodos gravimétricos y por estereometría de células acinares. La respuesta proliferativa fue medida por incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina y valoración de los índices de marcación y mitótico. La diferencia de umbrales observada, el cese diferido de ambas respuestas y el efecto diferencial provocado por la reestimulación de glándulas hipertróficas en regresión, indican que proliferación y crecimiento son fenómenos disociables en las glándulas parótidas estimuladas por isoproterenol.

(Proyectos B-2366/8613 Universidad de Chile y Proyecto FONDECYT).

PERDIDA DE POTASIO ASOCIADA A CAMBIO DE FORMA CELULAR EN ERITROCITOS HUMANOS. (Potassium loss associated to cell shape change in human erythrocytes). Alvarado, V., Sánchez, V. y Behn, C. Depto. Fisiología Normal y Patológica, Fac. Med., Universidad de Valparaíso y Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Med., Universidad de Chile.

Eritrocitos periperfundidos con solución salina (pH 7,4 pCa 8,6) responden al antibiótico clorotetraciclina (CTC) adoptando una forma estomatocítica (videomicroscopía) y perdiendo K (fotometría de llama). Se examina la relación entre ambos efectos influenciándolos separadamente.

La salida de K por efecto de CTC (0,1, 0,5 y 1,0 mM) en pCa 3,2 y pCa 8,6 fue 0,02 y 0,02  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , 0,03 y 0,12  $\mu\text{mol}/\text{min}$  y 0,04 y 0,16  $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivamente (n=6 en cada condición). En pCa 3,2 la falta de salida de K en respuesta a CTC coincide con un efecto equinocitogénico del antibiótico en estas condiciones. El tratamiento previo de los eritrocitos con glutaraldehído (0,02% v/v, 120 min) previene la estomatocitosis y la pérdida de K inducidas por CTC (0,5 mM) en pCa 8,6. Ambos efectos de CTC también ocurren en respuesta al análogo demetilclorotetraciclina (0,5 mM). Tetraciclina, en cambio, no tiene efecto alguno.

A23187 (0,01 mM) provoca una salida de K que es mayor en pCa 3,2 que en pCa 8,6. Quinina (0,01 mM) no impide la salida de K ni la estomatocitosis inducida por CTC (0,5 mM). A 17, 27 y 37°C la salida de K inducida por CTC (0,5 mM) en pCa 8,6 fue 0,03, 0,08 y 0,12  $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivamente.

La salida de K inducida por CTC no corresponde a un efecto Gárdos. Su bloqueo mediante diferentes procedimientos que impiden la estomatocitosis implica un rol causal de ésta. DICT, DIB.

CALIBRES Y MICROTUBULOS DE AXONES PERIFERICOS EN LA RATA DESNUTRIDA DURANTE EL DESARROLLO. (Calibers and microtubules of peripheral axons of the developing rat). Alvarez, J. y Cordero M.E. Lab. Neurocitología, P. Universidad Católica y Dep. Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

El empacamiento de los microtúbulos (MTs) axonales se correlaciona inversamente con el calibre de la fibra nerviosa. Esta correlación no se afecta por el desarrollo, regeneración, diabetes, etc. Estudiamos el efecto de la desnutrición durante el desarrollo sobre el calibre y los MTs en la fibra periférica. Las ratas tuvieron una restricción alimentaria que se prolongó hasta el sacrificio, a los dos meses. El peso (106 g) era menos del 50% del control. Los axones mielínicos del nervio sural tenían un espectro de calibres semejante al de los controles. La densidad de MTs fue de 23.6 MT/ $\mu\text{m}^2$  en axones de 3  $\mu\text{m}$ , la que no difería estadísticamente del valor control (26.9). En axones amielínicos, el área (0.34  $\mu\text{m}^2$ ) fue menor ( $p < 0.01$ ) que en las ratas controles (0.47  $\mu\text{m}^2$ ). Había un desplazamiento simple, hacia la izquierda, del espectro de calibres de la rata desnutrida. Sin embargo, la correlación calibre vs densidad de MTs era comparable a la del axón normal.

Concluimos que la desnutrición durante el desarrollo afecta los calibres de axones amielínicos pero no afecta aparentemente la organización interna del axoplasma. Los axones mielínicos no estarían afectados.

GRUPOS SULFHIDRILOS EN LA DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA DE HIGADO DE POLLO. (Sulphydryl groups in mevalonate diphosphate decarboxylase of avian liver). Alvear, M., Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Se sabe que la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo no requiere de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad o estabilidad. Sin embargo, experimentos realizados con reactivos específicos para grupos sulfhidrilos (reactivos de Ellman (DTNB) y metilmetanotiosulfonato (MMTS)) indican que la enzima es inactivada por bajas concentraciones de estos reactivos, lo que hace interesante su estudio.

MMTS inactiva a la enzima siguiendo una cinética de pseudo-primer orden en el rango de concentraciones ensayadas, indicando una reacción irreversible entre la enzima y 2 moléculas de modificador. Tanto ATP como MVAPP protegen de la inactivación y en ambos casos se observa que la protección ejercida por la presencia combinada de sustrato y  $\text{Mg}^{++}$  es menor. La enzima parcialmente modificada no presenta variación en las  $K_m$  aparentes para los dos sustratos. Se determinó la constante de disociación para el complejo enzima-ATP ( $1,81 \times 10^{-4}$  M) y el  $pK_a$  de los grupos reactivos (7,3).

Experimentos preliminares con reactivos específicos para ditiolos vecinales indican que la enzima es inactivada por éstos.

Estos resultados sugieren la presencia de al menos 2 grupos sulfhidrilos en o cerca del sitio de unión de los sustratos a la enzima, los que podrían corresponder a un ditiol vecinal.

Financiado por USACH y Fondo Nacional de Ciencia.

ACTIVACION DE DROGAS HIPOLIPIDEMICAS A ACIL-COENZIMO A TIOESTERES (Activation of hypolipidemic drugs to acyl-coenzyme A thioesters) Amisó, L., Bronfman, M. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La mayoría de las drogas hipolipidémicas que inducen proliferación peroxisomal son ácidos carboxílicos o contienen grupos que, en la célula son transformados a ácidos carboxílicos. Con el fin de estudiar la posibilidad que estas drogas sean activadas a derivados acil-CoA, microsomas de hígado de rata se incubaron con Ciprofibrato, Nafenoín o ácido Clofibrato en la presencia de ATP y CoASH, y los productos de la reacción se separaron por HPLC. Para las tres drogas empleadas, y solo con la mezcla de reacción completa, se formaron compuestos con las características de un tioéster de CoASH. El orden de reactividad de las drogas usadas fue: Ciprofibrato:Nafenoín:ácido Clofibrato=75:12:1. La actividad de la acil-CoA sintetasa microsomal con respecto a Ciprofibrato fue alta (0.1-0.2 unidades/sr hígado). El espectro UV del derivado formado y de sus productos de hidrólisis alcalina, indican que el compuesto es un derivado acil-CoA tioéster de la droga.

En base a estos datos, se propone la siguiente hipótesis sobre el modo de acción de estas drogas: los derivados acil-CoA de compuestos hipolipidémicos son sus especies farmacológicamente activas y, como análogos de los sustratos naturales, pueden interferir con las diversas reacciones que, en la célula usan acil-CoAs, ya sea como sustrato o como modulador.

(Financiado por Proyecto DIUC 82/86)

ALBUMINA SERICA DE CARPA: PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD Y CARACTERIZACION. (Carp serum albumin: Affinity chromatography purification and characterization). R. Anthauer, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. (Patrocinio de M. Krauskopf.).

En el pez *Cyprinus carpio* se ha encontrado que la albúmina sérica decrece significativamente en invierno. Estudios en hepatocitos aislados de carpa demuestran que tanto la cantidad como el tipo de proteínas que se sintetizan varían estacionalmente. Estos antecedentes nos han llevado a seleccionar a albúmina como un posible marcador de expresión génica durante aclimatación. Para contar con herramientas que nos permitan estudiar su gen y expresión hemos aislado y caracterizado esta proteína.

Para purificar la albúmina a partir de plasma de carpa hemos optimizado una técnica cromatográfica de afinidad en *Cibacron blue-sepharose*, con una elución por afinidad utilizando ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico. Mediante esta metodología, se logra purificar en una sola etapa la proteína con un alto rendimiento y grado de pureza. El peso molecular determinado por electroforesis en condiciones nativas resultó de 166.000. En geles de poliacrilamida-SDS muestra dos cadenas polipeptídicas de pesos moleculares 24.500 y 11.000 respectivamente. En ambas cadenas, purificadas por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS y posterior electroelución, sus grupos N terminales se encuentran bloqueados. La composición aminoacídica determinada después de hidrólisis en HCl 6 N, revela que tanto la proteína nativa como sus cadenas son ricas en ácido glutámico, lisina y leucina. Cisteína no pudo ser detectada aún cuando la proteína fue oxidada con ácido per fórmico previo a la hidrólisis.

La proteína aislada, se diferencia de todas las albúminas descritas en el número de cadenas polipeptídicas, elevado peso molecular y ausencia de cisteína. Proyectos RS-83-52 DIUACH, 1042/85 FONDECYT y DEA.)

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SITIOS DE UNION DE L-T<sub>3</sub> DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS DE RATA.**  
(Isolation and characterization of L-T<sub>3</sub> binding sites on membranes from rat erythrocytes). Angel, R., Botta, J., Moreno, R.D., y Farias, R.N.

Departamento Bioquímica Nutricional. INSIBIO (CONICET-UNT). Instituto de Química Biológica. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. U.N.T. Chacabuco 461 -4000 San Miguel de Tucumán.

Comunicaciones previas de nuestro laboratorio mostraron la presencia de sitios de unión para L-T<sub>3</sub> en membranas de eritrocitos de ratas, que se comportaban como proteínas integrales de membrana. En el presente trabajo tales sitios de unión fueron solubilizados por detergentes, purificados por cromatografía de afinidad y su peso molecular determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida y columnas de filtración molecular.

Sitios de unión para L-T<sub>3</sub> de membranas de eritrocitos de ratas obtenidas por el método de Dodge, lavadas con EDTA 2 mM pH 11, fueron solubilizados con lauril sarcosina o CHAPS con una concentración final de 8 y 5 mM respectivamente. Las preparaciones fueron centrifugadas 80.000 xg durante 1 h a 4°C y los sobrenadantes se pasaron por una columna de afinidad de CH-Sepharosa 4B - T<sub>3</sub>. Los sitios de unión se eluyeron con L-T<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M. Las fracciones activas se dializaron contra buffer fosfato 10 mM pH 7.6 a 4°C y luego se liofilizaron. Aproximadamente 1 mg de proteína fue obtenida de 1 g de proteína de membrana de glóbulos rojos.

El material activo purificado eluyó por una columna de Sephadex G-200 como una proteína globular con peso molecular aparente de 60.000. Análisis de electroforesis en placas de geles de poliacrilamida en SDS revelaron la presencia de dos bandas mayoritarias de proteínas de peso moleculares 55.000 y 66.000.

**DISTRIBUCION ESPACIAL Y ESTRUCTURA DE LOS SISTEMAS DE GALERIAS DE CTENOMYS MAULINUS BRUNNEUS (RODENTIA, CTE-NOMYDAE).** (Spatial distribution and burrow system structure of *Ctenomys maulinus brunneus* (Rodentia, Ctenomyidae). Anrique, J.A y Gallardo, M.H. Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Los roedores subterráneos mantienen sistemas de galerías discretas que facilitan el estudio de sus ambientes de hogar y distribución.

El presente estudio se realizó en Lonquimay, entre Enero y Marzo de 1986, confeccionándose para ello un retículo de 50x70 m<sup>2</sup>. La distribución de los animales se analizó por el método de distancia al vecino más próximo. La arquitectura y configuración de las cuevas se examinó por excavación a mano de los sistemas de galerías de cuatro machos y dos hembras.

Se encontró que en los 23 animales capturados ( $d=0.0062/m^2$ ) la relación de sexos es 1:1 y que la mayoría de la muestra está compuesta por animales adultos. El tamaño de la camada es de 2.85. Las galerías son de trayectoria longitudinal, con muchas ramificaciones laterales. Se capturaron machos y hembras en una misma boca. Las excavaciones evidenciaron mayor número de animales que de nidos.

Los análisis de distribución muestran desviación del azar ( $P < 0.05$ ), con tendencia al espaciamiento. Los animales son agresivos y solitarios, sin embargo, en la época reproductiva practicarían monogamia seriada que se infiere por el hallazgo de nidos compartidos. Las colonias no son densas, probablemente debido a que la vegetación es el factor limitante.

(Financiado por Proyecto S-85-17, D.I.D., U.A.Ch.)

**VACIAMIENTO GASTRICO EN PERROS, RELACION CON LA PRESION INTRAGASTRICA.** (Gastric emptying in dogs relationship to intragastric pressure). Angelo S., Solari J., Defilippi C. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El vaciamiento gástrico (VG) es un fenómeno complejo que involucra distintos mecanismos tanto para líquidos como para sólidos. La velocidad de (VG) de los líquidos es modificada por la osmolaridad y la acidez de las soluciones. Los mecanismos que intervienen en este fenómeno no están bien establecidos; se postula que serían de importancia: la presión intragástrica (PIG) proximal y la resistencia a nivel antro pilórico y duodenal.

En 6 perros con cánula gástrica y duodenal se estudió el (VG) de 350 ml, de HCl 80 mM, glucosa 850 mM comparado con NaCl 154 mM. El (VG) se estima midiendo el volumen remanente en el estómago a los 10 minutos. Simultáneamente se registró la (PIG) proximal mediante un balón de polietileno y la presión intraduodenal mediante un sistema de catéteres perfundidos.

El volumen remanente de NaCl 154 mM fue significativamente menor que el de las otras soluciones. Con NaCl 154 mM se observa una relación lineal inversa entre la PIG proximal y el volumen remanente, fenómeno que no se observa con las otras soluciones.

Se concluye que el (VG) de NaCl isotónico está regulado por la (PIG) proximal y que soluciones ácidas e hiperosmóticas reducen la velocidad de (VG) por un mecanismo independiente de la (PIG) proximal.

Financiado por Proyecto M 1353-865 F, D.I.B. Universidad de Chile.

**EFFECTO DE FOSFOLIPIDOS Y POLILISINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE X. laevis.** (Effect of phospholipids and polylysine on the activity of membrane-bound adenylate cyclase of amphibian oocytes.) Antonelli, M. y Allende, J.E. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Univ. de Chile.

La inducción de la maduración meiótica de oocitos de anfibio por progesterona involucra la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) de la membrana de estas células por la progesterona. Esta inhibición, además de ser novedosa por representar el primer ejemplo de una acción de una hormona esteroide sobre el sistema del cAMP, es también de interés pues no está mediada por la subunidad reguladora N<sub>i</sub> que participa en todas las otras inhibiciones hormonales de adenilato ciclasa. Hemos probado el efecto de asolectina, una combinación de fosfolípidos de frijol de soya, sobre la actividad de la adenilato ciclasa. La asolectina (0,5 mg/ml) produce una leve pero reproducible estimulación de la actividad de la AC medida en presencia de Gpp(NH)p. Sin embargo, el efecto más importante de este fosfolípido es una reducción muy significativa de la inhibición de la AC por progesterona. Esta reducción no se debe a un secuestro de la progesterona por el fosfolípido, pues una concentración similar de asolectina no impide que progesterona gatille la maduración de los oocitos. Se postula que la asolectina facilita la activación de la subunidad catalítica por N<sub>2</sub>. Polilisina afecta a varias enzimas presentes en la membrana de oocitos: proteínas quinasas, fosfatidilinositol quinasas y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. También afecta a la adenilato ciclasa. Concentraciones de 10 uM - 50 uM de polilisina activan a la adenilato ciclasa medida en presencia de 10 mM F<sup>-</sup>, pero concentraciones mayores son inhibitorias. Al usar Gpp(NH)p se obtiene un efecto similar. La polilisina no afecta la inhibición de AC causada por progesterona.

Este trabajo recibió apoyo del DIB de la Universidad de Chile y de la OEA.

**DETECCION DE CANCERIGENOS QUIMICOS MEDIANTE CULTIVO DE CELULAS DE LIQUIDO AMNIOTICO.** (Detection of chemical carcinogens in human amniotic fluid cells). Aranda, M., Aguirre, S. y Salas, C. Departamento de Ciencias Basicas, Escuela Tecnologica y Departamento de Quimica y Bioquimica, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Diversas estrategias se han desarrollado para identificar sustancias potencialmente cancerigenas. Los metodos mas comunes van de la deteccion de revertantes en procariotes, induccion de bacteriofagos, transformacion de celulas eucariotes in vitro a inoculacion en animales. La mayoria de estos analisis se realizan en celulas no humanas, limitando la validez de los resultados. Hemos iniciado un estudio con celulas fetales humanas como alternativa para la deteccion de sustancias con poder transformante. Celulas de liquido amniotico humano de cariotipo normal, fueron morfologicamente transformadas con compuestos quimicos cancerigenos de referencia (acetamidofluoreno, benzo-a-pireno, 2-hidroxi benzo-a-pireno) la estimacion de la transformacion se evaluo en agar semisolido. El efecto citotoxico, LC50 del cancerigeno, se determino mediante la eficiencia de formacion de colonias en medio Ham mas suero fetal al 20 %. En este estudio se comparo la tasa de crecimiento y formacion de colonias en un medio con 5 y 20 % de suero, la densidad de saturacion, el cariotipo y la actividad  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa en celulas tratadas con cancerigenos quimicos y celulas controles.

Financiado por DICYT, proyecto 10-85-74AL

**CAMBIOS CONFORMACIONALES EN PREALBUMINA INDUCIDOS POR TIROXINA.** (Thyroxine-induced conformational changes in prealbumin). Araya, R., Paladini, A.\* y González, G. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso, Chile e INGEPI, Buenos Aires, Argentina.\*

La hormona tiroxina es transportada en la sangre por la proteína plasmática prealbúmina de peso molecular 55.000 y compuesta por cuatro subunidades iguales. La proteína tiene dos sitios de unión de tiroxina con constantes de asociación de  $1,05 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  y  $9,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Aunque los dos sitios son estructuralmente idénticos la diferencia en las constantes de unión parece implicar una cooperatividad negativa entre ellos, que resultaría en un cambio conformacional en la proteína al unirse la tiroxina al sitio de mayor afinidad, transformando al otro sitio en menos accesible. Experimentos efectuados con prealbúmina marcada con el fluoróforo N-iodoacetil-N-(5-sulfo-1-naftil) etilendiamina (AEDANS) mostraron que la unión del primer mol de tiroxina produce un cambio conformacional detectado por una disminución del rendimiento cuántico y por un corrimiento hacia el rojo en la emisión del fluoróforo. Este cambio también se detectó por un apagamiento en la emisión del fluoróforo en presencia de acrilamida. Los experimentos de polarización de fluorescencia en función de la viscosidad del medio mostraron que la unión de la tiroxina produce una disminución en el volumen de la proteína. Los resultados de esta investigación sugieren un cambio conformacional en la prealbúmina al unirse a ella el ligando tiroxina.

**CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE RECEPTORES PARA AMINOACIDOS EXCITATORIOS EN SUBSTANCIA NIGRA DE CEREBRO DE RATA.** (Pharmacological characteristics of receptors for excitatory aminoacids in the rat brain substantia nigra). Araneda, R.A. y Bustos, G. Laboratorio de Farmacología Bioquímica, P. Universidad Católica de Chile.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han indicado la existencia de terminales nerviosos que captan y liberan aminoácidos excitatorios a nivel de la sustancia nigra (SN). En base a esto, hemos decidido estudiar la existencia de receptores para estos aminoácidos y su posible interacción con neuronas dopaminérgicas nigrales.

Cortes de SN se incubaron con  $^3\text{H}$ -Dopamina (DA) y se superfundieron con solución Krebs-Ringer-Fosfato. Sólo en condiciones de superfusión en las que se omitió el ión  $\text{Mg}^{2+}$  del medio, agonistas como el L-Glutámico y N-metil-D-aspartico (NMDA) a una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , estimularon marcadamente la liberación de DA. El efecto producido por NMDA fue dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y antagonizado por 2-amino-5-fosfonovalérico (APV) y por tetrodotoxina. Esto último sugiere la participación de una interneurona, al respecto, glicina estimuló la liberación de DA, tanto en ausencia como en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y este efecto fue antagonizado por estriocina y APV.

Estos resultados sugieren la existencia de receptores del tipo NMDA a nivel de la SN. La activación de estos receptores resulta en un aumento en la liberación de DA desde las dendritas de las neuronas dopaminérgicas nigrales. Parte de este efecto sería mediado por una interneurona de tipo glicinérgico.

Financiado por Grant 1182/85 Fondecyt

**ESTUDIO CONFORMACIONAL DE PROTEINAS NO CRISTALIZABLES. EL CASO DE CLUPEINA YII.** (Conformational study of non-crystallizable proteins. The case of Clupein YII). Arellano A., Beratto V., Canales M., Llerena A. Lab. de Proteínas, Facultad de Ciencias, U. de Concepción. Brunet J.E., Jullian C., Instituto de Química, U. Católica de Valparaíso.

La estructura de las protaminas -proteínas básicas de bajo peso molecular que se encuentran asociadas con el DNA en el núcleo del espermatozoide- no está dilucidada debido a que no han podido ser cristalizada hasta ahora.

Basados en trabajos de predicción de estructura secundaria, hemos descrito que la molécula de Clupeina YII posee 4  $\beta$ -turns intercaladas en zonas al azar. Estas estructuras deben conferir a la molécula una conformación globular. Estudios de depolarización de fluorescencia con Clupeina YII marcada con FITC, han demostrado que la molécula efectivamente posee estructura esférica, con diámetro de 23 Å.

Experimentos de condensación de Clupeina YII vía carbodiimida han demostrado, además, que el extremo N-terminal y el extremo C-terminal están muy próximos.

Basados en estas evidencias teóricas y experimentales, hemos construido un modelo de Kendrew, en el cual hemos medido coordenadas atómicas e iniciado con ellas un estudio computacional de minimización de energía basado en la contribución electrostática, de van der Waals y de enlaces hidrógeno; de modo de poder evaluar la configuración de la cadena polipeptídica en torno a las  $\beta$ -turns predichas.

Proyecto (20.13.41) Dirección de Investigación, U. de Concepción y Proyecto FONDECYT 5041/85.

CLONADO MOLECULAR Y SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DEL GEN DE STREPTAVIDINA. (Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene) Argaraña, C.E., Kuntz, L.D., Birken, S., Axel, R. y Cantor, C.R. Department of Genetics and Development, College of Physicians and Surgeons, Columbia University. New York, Estados Unidos.

Streptavidina (STV) es una proteína secretada por "Streptomyces avidinii" (SA) cuya principal propiedad es la de unir biotina con alta afinidad ( $K_d \approx 10^{-15}$  M).

Se determinó la secuencia de 40 a.a. de la región N-terminal de STV utilizando un secuenciador automático. Con la finalidad de obtener un "probe" específico para clonar el gen de STV se sintetizó una mezcla de oligonucleótidos (STV14) que representó todas las combinaciones posibles de codones que codifican una pequeña porción de la secuencia de a.a. de la proteína.

Se construyó un banco de clones a partir de DNA de SA utilizando como "vector" bacteriófago Charon 30.

La mezcla de oligonucleótidos fue marcada con  $^{32}P$  y utilizada para localizar, mediante hibridación, el gen de STV en el banco de clones.

Se aisló DNA de clones supuestamente positivos y la presencia del gen de STV fue confirmada mediante "Southern blot" utilizando como "probes" STV14 y una segunda mezcla de oligonucleótidos derivada de otra región de la secuencia de a.a. Ambos "probes" detectaron un fragmento de  $\approx$  2Kb. Dicho fragmento fue subclonado en el bacteriófago M13 y se determinó la secuencia de nucleótidos mediante el método de Sanger. El análisis de la secuencia indicó la presencia del gen que codifica para STV como así también una región que codifica para el "péptido señal" de la proteína.

Se presentará, además, un estudio sobre la homología de las estructuras primarias y secundarias entre STV y una proteína de eucariotas denominada avidina con propiedades físico-químicas similares a STV.

CARACTERIZACION ULTRAESTRUCTURAL DEL TUMOR VENEREO TRANSMISIBLE (TVT) CANINO. (Ultrastructural characterization of canine TVT). Arias, J.L., Vivanco, E., Grudsky, R., Rivas, V. Lab. Biología Celular, Depto. Ciencias Biológicas Animales, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Una característica peculiar de las células neoplásicas del tumor venéreo transmisible (TVT) canino es su relativa facilidad de crecer cuando son transplantadas desde un tumor espontáneo o experimental a un huésped genéticamente homólogo. Como un paso previo al trasplante se realizó una caracterización ultraestructural de las células provenientes de un TVT espontáneo y de células de TVT cultivadas in vitro.

La particular forma del núcleo, la distribución de la cromatina, la apariencia de los organelos citoplasmáticos, la presencia de complejos laminares, la forma celular, y los modos de asociación intercelulares, entre otras características, son discutidas comparativamente a la luz de los antecedentes actuales acerca de la naturaleza, propiedades y conducta biológica de este tipo de tumores.

Financiado por Proyecto A-2423, D.I.B., Universidad de Chile

SITIOS DE RECONOCIMIENTO EN FOSFOLIPASAS A<sub>2</sub> DE VENENOS DE SERPIENTES CON ACTIVIDADES NEUROTOXICA Y MIOTOXICA. (Recognition sites in snake venom phospholipases A<sub>2</sub> with neurotoxic and myotoxic activities). Arriagada, E. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

La gran similitud en estructura primaria entre las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PA<sub>2</sub>) de mamíferos y aquellas obtenidas de venenos de serpientes no permiten explicar las enormes diferencias funcionales. Además, se ha establecido que la presencia de residuos básicos en estas últimas está relacionada con su mayor o menor toxicidad.

A fin de establecer la ubicación del o los sitios de reconocimiento responsables de la acción tóxica y de aclarar la relación entre actividades tóxicas y fosfolipásica, se realizó la predicción de las estructuras secundarias de PA<sub>2</sub> básicas, ácidas y neutras de venenos de serpientes y de la PA<sub>2</sub> básica de páncreas de bovino, la cual se usa como un estándar de comparación. La predicción se hizo por el método de los perfiles de hidrofobicidad.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que la zona de los residuos de aminoácidos 53-61 constituiría un "sitio neurotóxico" en las PA<sub>2</sub> básicas de venenos de serpientes. Dicha región por su proximidad a His-48 podría estar ligada a la actividad enzimática. De igual manera se propone que en la acción miotóxica de la toxinas mionecróticas de venenos de serpientes participaría un "sitio miotóxico" ubicado en la región de los residuos de aminoácidos 76-86.

Proyecto N° 20.31.12 de la Dirección de Investigación Universidad de Concepción.

CONDUCTA LOCOMOTORA DE LARVAS YELLOW EN Drosophila. (Locomotor behavior of yellow larvae in Drosophila). Arriagada, J.R., Sunkel, C. y Godoy-Herrera, R. Grupo de Neurobiología Molecular, Univ. Católica de Chile y Dep. Biol. Cel. y Genética, Univ. de Chile.

En este trabajo se estudió la conducta locomotora en larvas de Drosophila Oregon R-C y en mutantes yellow ("y"). Estos resultados se correlacionan con estudios de la cutícula y del sistema nervioso de la mosca.

Para estudiar la conducta locomotora se utilizaron cajas de acrílico de 16cm<sup>2</sup> llenas con agar. Larvas "y" y Oregon R-C de diferentes estados de desarrollo fueron estudiadas. La estructura de la cutícula se analizó por microscopía óptica y de Scanning y las proyecciones sensoriales se estudiaron usando HRP como trazador intraaxonal. La actividad de Acetilcolinesterasa (AChE) junto a la separación electroforética de isoenzimas sirvió para evaluar el sistema colinérgico. Los resultados muestran claros cambios en la conducta locomotora de las larvas "y". Al estudiar las estructuras cuticulares se observan cambios en las bandas de espículas ventrales de los segmentos abdominales de la larva. No se observan diferencias en las proyecciones sensoriales y finalmente se estableció un aumento de la actividad de la AChE como también la aparición de una nueva isoenzima en las larvas "y".

Se discutirán los posibles mecanismos que expliquen el cambio en la conducta locomotora de las larvas "y" a la luz de los cambios observados en la cutícula y en el sistema nervioso.

Se agradece la colaboración del Dr. Jorge GARRIDO.

Financiado por proyecto de la Fundación Gildemeister al Dr. N.C. Inestrosa.

**SINTESIS DE BETA-LACTAMASAS POR BACILLUS CEREBUS INMOVILIZADO EN AGAR.** (Synthesis of beta-lactamases by *Bacillus cereus* immobilized in agar). Arrieta A, Jilberto C (\*) y Sepulveda M (+). (\*) Laboratorio de Microbiología. Departamento de Química y Biología. Facultad de Ciencia. USACH (+) Lab. Control Int. Instituto de Salud Pública. (Patrocinio : G. Zuniga)

Se estudia la actividad catalítica de las beta-lactamasas sintetizadas por *Bacillus cereus* NRRL 569 inmovilizado en geles esféricos de agar usando como sustrato penicilina G sodica. Para esto, se determinaron los parámetros óptimos de cultivo usando medios con diferentes disponibilidades aminoácidas, además de ácido fenilacético, posible inductor de la síntesis de penicilinas. Luego, se hicieron ensayos de inmovilización de esta bacteria, usándose una suspensión del bacilo en agar al 1,5 % gelificada por goteo en un líquido no miscible refrigerado. Los resultados obtenidos indican que la calidad y cantidad de aminoácidos presentes en el medio inciden en la síntesis de biomasa pero no en la producción de las enzimas estudiadas. La concentración de agar utilizada permitió la difusión de las penicilinas al medio hasta una concentración máxima y constante de 40.000 U.I./ml al cabo de 96 hrs. Al renovar repetidamente el medio, los microorganismos produjeron la misma concentración de enzima en un lapso de 24 hrs demostrándose una inhibición por los niveles de síntesis alcanzados. El sistema de inmovilización permite la reutilización de los microorganismos sin disminución de su actividad. Se discute aplicabilidad.

Financiado por DICYT, proyecto 16-08-83-32AE y por el Instituto de Salud Pública.

**INFLUENCIA DEL SEXO EN LA REGULACION DE IgE.** (Influence of the sex in the IgE regulation). Astorquiza, M.I., Cisternas, C., Leal, X. y Maldonado, E. Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

En trabajos previos hemos podido demostrar que es posible modular la respuesta IgE mediante la administración de fitohemaglutinina (PHA) uno o dos días antes del antígeno. El presente trabajo analiza la influencia del sexo del animal en dicha modulación.

Se utilizaron ratones RF adultos (2-3 meses) de ambos sexos, normales y castrados. Se inyectaron 80 ul de PHA vía i.p., uno o dos días antes de inmunizar con 100 ug OA en 20 mg Al(OH)<sub>3</sub> gel vía s.c. Los animales se sangraron cada 7 días y se determinó el título de IgE por PCA en rata y por ensayo inmunoensayo, y el título de IgM y/o IgG por hemaglutinación pasiva.

Los resultados indican que existe una modulación opuesta de la respuesta IgE de acuerdo al sexo del animal. La administración de PHA el día -1 induce supresión en la hembra y estimulación en el macho, en cambio PHA el día -2 lleva a un efecto opuesto. Cuando los animales son castrados se pierde este efecto modulador isotipo específico.

Se discute la participación de factores solubles IgE específicos que intervendrían en el proceso.

(Proyecto Inv. RS-83-7, Univ. Austral de Chile)

**SOBRE EL EFECTO "IN VITRO" DE PROGESTERONA EN UTERO** (Upon the "in vitro" effect of Progesterone in mouse uterus). H. Asencio, L. Padilla, M.A. Cruz, M.I. Rudolph. Depto. Ciencias Fisiológicas, Fac. Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Si se estudia el efecto "in vitro" de concentraciones micromolares de Progesterona (P) sobre cuernos uterinos, se observa que esta hormona puede aumentar o inhibir las contracciones uterinas de acuerdo al período del ciclo estral y/o preñez del animal. Numerosos investigadores han analizado este fenómeno suponiendo una acción directa de P sobre la fibra muscular lisa del útero, sin encontrar una explicación razonable para este fenómeno. En el presente trabajo se analizan estos resultados correlacionando la influencia que ejerce P tanto sobre la actividad contráctil, como sobre la liberación de 3H-Noradrenalina (3H-NA).

**Actividad contráctil:** El mayor efecto inhibitorio de P (5 µM) se ejerce en úteros de ratonas tratadas previamente con estradiol (0.5 mg/Kg, 48 hrs.) y fue de 48.95 ± 5.78% (X ± e.s., n=7). Este efecto es parcialmente antagonizado por propranolol 1 µM (37.08 ± 7.81%; X ± e.s., n=6) y es revertido en útero de ratonas tratadas previamente con reserpina (5 mg/Kg i.p. 24 hrs) observándose un aumento de 147,45 ± 19.85% (X ± e.s., n=6).

**Liberación de 3H-NA:** El mayor aumento de la liberación basal de 3H-NA por efecto de P (10 µM) se observa en úteros de ratonas tratadas previamente con estradiol (0.5 mg/Kg, 48 hrs), fue de 20.36 ± 3.71 (X ± e.s., n=3), efecto que tiene una duración superior a los 10 min..

Se postula que los efectos "in vitro" de P se deberían a una acción de esta hormona sobre las terminaciones nerviosas adrenérgicas, favoreciendo la liberación de NA que ejerce un fuerte control inhibitorio sobre la contracción uterina y cuya actividad a su vez es regulada "in vivo" por las hormonas sexuales.

Proyecto 20.33.28 Dirección de Investigación.

**ESTIMULACION β-ADRENERGICA Y EVENTOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN CAPACITACION Y/O REACCION ACROSOMICA DE ESPERMATOZOIDE DE MAMIFERO.** (β-Adrenergic stimulation and molecular events involved in mammalian sperm capacitation and/or the acrosome reaction). Avendaño, C. y Llanos, M. Opto. de Ciencias Básicas y Unidad de Biología de la Reproducción. Fac. de Medicina-Sur e INTA. U. de Chile.

La probabilidad de fecundación por parte del espermatozoide, desde un punto de vista molecular, puede estar relacionado con la función de agonistas α y β adrenérgicos en el medio circundante al proceso. Este estudio pretende dilucidar la posible función y asociación entre estimulación β adrenérgica, transmetilación de fosfolípidos y activación de la adenil ciclasa (AC) durante la capacitación (CAP) y/o reacción acrosómica (RA) de espermatozoides de hamster incubados in vitro. Espermatozoides epididimarios lavados y separados en columna de perlas de vidrio se incubaron a 37°C. bajo atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire, en presencia de agonistas β adrenérgicos, inhibidores de reacciones de transmetilación, análogos de AMPc, como así mismo de estimuladores del sistema adenil ciclasa. A diferentes períodos de incubación, se evaluó motilidad, hiperactivación y RA. Cuando los espermatozoides se incubaron con isoproterenol, las RA aumentaron significativamente en relación a los controles. A su vez, los inhibidores de transmetilación (3-Deazaadenosina y Homocisteína-tiolactona) inhibieron la ocurrencia de RA en un 40-60% en presencia o ausencia del agonista, siendo dicha inhibición superada al incluir 8-Br o Bt2 AMPc en el medio de incubación. Activadores selectivos de la AC, Forskolin y toxina del cólera, indujeron RA en valores sobre los controles. Los resultados sugieren que los procesos de CAP y/o RA estarían modulados por una cascada de sucesos dependientes de un aumento del AMPc intraespermático. Dicho aumento se debería a una secuencia de eventos de membrana que incluirían: estimulación β-adrenérgica-transmetilación de fosfolípidos - activación de la AC.

Financia: DIB. B-2396-8613 y Grant 83010 OMS.

MICROPROPAGACION DE Gomortega keule (MOL.) BAILLON. (Micropropagation in Gomortega keule (Mol.) Baillon). Baeza, P.C., Barrales, P.H.L. y Mancinelli, S.P., Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas y de Cursos Naturales, Universidad de Concepción.

G. keule es una especie endémica considerada, junto con otras 10, como en estado de conservación crítico y clasificándola por lo tanto en la categoría "EN PELIGRO" con prioridad 4 (CONAF, 1985). Su distribución geográfica está restringida a las VII y VIII Regiones.

No se dispone de antecedentes confiables sobre su capacidad de reproducción, ya sea bajo condiciones naturales o de laboratorio. Tampoco se tiene información sobre porcentaje de germinación, viabilidad de las semillas, latencia, etc. Por los antecedentes anteriores se ha estimado que la técnica de cultivo de tejidos podría ser aplicada para dilucidar algunas de estas interrogantes. Como primera aproximación se intentó el cultivo in vitro de ápices caulinares y axilares.

Yemas apicales y axilares se desinfectaron superficialmente con  $HgCl_2$  al 0.05%, se lavaron repetidamente con agua estéril y se incubaron en medio White con bencil amino purina (BAP), gliberelina ( $GA_3$ ) y ácido naftalén acético (ANA), en concentraciones de 1.5, 1.0 y 0.1 mg  $l^{-1}$ , respectivamente.

Después de 30 días los explantes se repicaron a medio Anderson, con el mismo tratamiento hormonal anteriormente mencionado. Todas las experiencias se realizaron bajo régimen lumínico de 16:8 hrs., a una intensidad de  $54 \mu Ecm^{-2} seg^{-1}$  y a una temperatura de 23°C.

Se observó actividad de las yemas a los 15 días, estimada por la apertura de las brácteas. Después de 4 meses los explantes expandieron 2 a 4 pares de hojas alcanzando un tamaño de 10 a 30 mm de alto.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL RECEPTOR PARA LAMININA DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA DE S.AUREUS. (Isolation and characterization of the laminin receptor from a S. aureus genomic library) Barardi, C.R.M.\*, Santos, C.L.S. y Brentani, R.R. Ludwig Institute for Cancer Research, Sao Paulo Branch - Brasil.

Laminin, a major glycoprotein of basement membranes, binds to a specific receptor on the surface of neoplastic and non-neoplastic cells. Laminin binding proteins were also found in Staphylococcus aureus, but not in Staphylococcus epidermidis (Lopes, J.D. et al. Science 229:275,1985). These specific molecules may apparently be involved in bacterial adhesion.

High molecular weight DNA was isolated from S. aureus, partially digested with EcoRI and fractionated through a 10-40% sucrose density gradient. Fragments of 4-6 kb in length were pooled and ligated to an expression vector  $\lambda$ gt11, digested with EcoRI. After infection of E.coli Y1090 with these molecules, the genomic library obtained was assayed through an immunological screening. The viral plaques were transferred to nitrocellulose filters and incubated with laminin P1 fragment followed by rabbit anti-laminin antibody (affinity purified in a Sepharose-laminin column) and then anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate. The positive signals were isolated and were used to infect E. coli Y1089, a lysogenic host. The proteins were analysed in PAGE-SDS gel and Western blotting and revealed a non-fusion protein in the same immunological assay. The molecular weight of this protein was 50kd, similar to that report of the same receptor. The DNA of this clone was isolated and after digestion with EcoRI we observed a 5.0kb insert. Sequences of this clone are underway.

\* C.R.M.Barardi is a fellow of FAPESP.

ADHERENCIA SELECTIVA DE SALMONELLA TYPHIMURIUM LT2 AL EPITELIO INTESTINAL DE RATON. (Selective adherence of Salmonella typhimurium LT2 to mouse intestinal epithelium). Bao, L.; Garrido, J. Laboratorio de Histología, Dpto. Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, sugieren que S. typhimurium LT2, se adhiere selectivamente al epitelio intestinal de ratón, dependiendo de las condiciones de cultivo. Las bacterias provenientes de cultivo estático, se adhieren a las placas de Peyer, no así las bacterias provenientes de cultivo agitado; además, esta capacidad de adhesión puede ser correlacionada con el patrón de proteínas de la membrana externa de S. typhimurium LT2.

Hemos infectado, con S. typhimurium LT2- $^{32}P$ , ratones Swiss. A distintos tiempos se extrajo el intestino delgado y se determinó, por centelleo líquido, la radiactividad asociada a regiones que incluyen placas de Peyer (PP) y a regiones entre placas de Peyer (NPP).

Hemos definido, el concepto operacional, "actividad patógena" en función del índice promedio PP/NPP (PP/NPP- 1,3 equivale al 100% de actividad patógena). Este da cuenta del daño que produce, S. typhimurium LT2, sobre su huésped. Las bacterias provenientes de un cultivo agitado exhiben un 70% de actividad patógena, independientemente, del estado nutricional de los ratones y del tiempo de infección; mientras que las bacterias que provienen de un cultivo estático alcanzan un 100% de actividad patógena 24 hrs. (ratones no ayunados) ó 16 hrs. (ratones ayunados), después de iniciada la infección.

Las bases moleculares del fenómeno observado se han investigado mediante estudios de inhibición de la adhesión por moléculas extraídas de la superficie bacteriana.

EXISTEN DOS TIPOS DE RECEPTORES AL L-GLUTAMATO EN FIBRAS MUSCULARES DE LARVAS DE Drosophila? (Do muscle fibers from Drosophila larvae posses two types of L-glutamate receptors?). Baria, R. Depto. Biol. Cel. Fac.Cs.Biológicas Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: P. Labarca).

Los músculos de la larva de Drosophila son un buen modelo para estudiar receptores de L-glutamato con técnicas electrofisiológicas. El conocimiento de este receptor reviste gran interés en Neurobiología porque ha sido identificado en sinapsis excitatorias en SNC de mamíferos. He estudiado las variaciones del potencial de membrana ( $E_m$ ) como función de la concentración de agonistas aplicados en el baño. Observé los siguientes resultados: L-gluta y quisqualato producen a concentraciones en el rango 1-10 $\mu$ M depolarización de la membrana ( $\Delta E_m < 15$  mV). A concentraciones > 100 $\mu$ M tal efecto se revierte para alcanzar una depolarización de solo 4 mV. En ausencia de iones cloro en la solución estos agonistas solo inducen de polarización proporcional a sus concentraciones. Por otra parte el ac. kainico solo induce una leve hiperpolarización que no se observa en ausencia de iones  $Cl^-$ .

Al tratar las fibras musculares durante 15 min. con 50 $\mu$ M de concanavalina-A, L-gluta y quisqualato solo provocan una depolarización. Esto sugiere que Con-A impide la desensibilización de los receptores excitatorios como se ha descrito en músculo de otros invertebrados.

Nuestros resultados indican la existencia de dos tipos de receptores: uno excitatorio y otro inhibitorio que son farmacológicamente diferentes.

CARACTERIZACION DE ANTIGENOS ESPERMATICOS HUMANOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES MURINOS (Characterization of Human Sperm Antigens by Murine Monoclonal Antibodies) Raúl Barnier y Elcira Pérez, Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Lisette Leyton)

Con el propósito de identificar y caracterizar antígenos espermáticos que se encuentran involucrados en el proceso de fecundación, hemos utilizado la metodología de anticuerpos monoclonales murinos, la cual permite disectar la composición antigénica del espermatozoide y estudiar la función de cada antígeno en particular.

En este trabajo se inmunizaron ratones de las cepas Balb/c y CBlOFl, con espermatozoides humanos completos o extractos de estos. Los hibridomas obtenidos por fusión de los linfocitos esplénicos de los animales inmunizados con la línea mielóide NS02, fueron seleccionados por ELISA, usando como antígeno el mismo inmunógeno. Posteriormente, se determinó la localización del antígeno por inmunofluorescencia indirecta y su peso molecular por *western blotting*.

Se seleccionaron dos anticuerpos para estudiar su efecto en la interacción de gametos *in vitro*. El anticuerpo EET-1A11 que reconoce un antígeno intrínseco y presenta, sólo en espermatozoides capacitados, un patrón ecuatorial; es capaz de inhibir la penetración de ovocitos de hamster sin zona pelúcida por espermatozoides humanos. Por otra parte el monoclonal HS-2H3, dirigido contra un antígeno presente en el líquido seminal, tiene un patrón de fluorescencia post-acrosomal y cola, inhibe la unión de los espermatozoides humanos a la membrana de ovocitos de hamster.

Estos estudios indican que tanto antígenos intrínsecos como extrínsecos del espermatozoide pueden estar implicados en el proceso de fecundación.

Financiado por Grant IDRC 3-P-83-1006-01

COMPROBACION DE UN MODELO ESTRUCTURAL DE LAS  $\beta$ -LACTAMASAS. ROL DEL DOMINIO II EN LA ACTIVIDAD CATALITICA. (A test for a model structure for  $\beta$ -lactamases. The role of domain II in the catalytic activity). L. Barros y J. Martínez, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Estudios de predicción de estructura secundaria han permitido postular un modelo estructural para estas enzimas, consistente en dos dominios, con la actividad catalítica localizada en el dominio N-terminal (Dominio I).

Estudios de hidrólisis de la enzima con BrCN en condiciones no denaturantes, y con quimotripsina, han demostrado la presencia de un péptido asimilable al Dominio I que conserva actividad enzimática.

Para determinar la posible participación del Dominio II en el proceso catalítico, se han determinado las constantes cinéticas  $K_1$ ,  $K_2$ , número de recambio y energía de activación de la  $\beta$ -lactamasa de B. cereus nativa, y del dominio I, en presencia de sustratos e inhibidores, utilizando métodos espectrofotométricos.

Con el objeto de establecer si las diferencias encontradas son atribuibles al proceso de separación del dominio I por hidrólisis con BrCN, se hacen también estudios con el dominio I obtenido por hidrólisis enzimática con quimotripsina.

Proyecto de Investigación 20.31.12, D. Inv. Universidad de Concepción.

Proyecto de Investigación 1085 de FONDECYT

ESTADO DE TIROSINACION DE LA TUBULINA EN OVOCITOS, EMBRIONES Y CEREBRO DE SAPO. (State of tyrosination of tubulin in oocytes, embryos and brain of toad). Barrá, H.S., Arce, C.A. y Modesti, N.M. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.

El terminal COOH de la tubulina  $\alpha$  puede ser modificado mediante la incorporación o liberación postraducción de tirosina por acción de tubulina:tirosina ligasa o tubulina carboxipeptidasa, respectivamente. La fracción de tubulina que es capaz de incorporar tirosina se denomina tubulina tirosinable y comprende a la tubulina tirosinada y no-tirosinada. Se ha determinado que en cerebro de aves y mamíferos, parte de la tubulina es no-tirosinable y que las distintas especies de tubulina cambian con el desarrollo.

En el presente trabajo se determinaron las proporciones de cada una de las especies de tubulina en ovocitos, embriones y cerebro de Bufo arenarum. En extractos de ovocitos la tubulina soluble está compuesta principalmente (95%) de tubulina no-tirosinable. La fracción restante (5%) está compuesta por tubulina tirosinada, no habiéndose encontrado tubulina no-tirosinada. Resultados similares fueron obtenidos con embriones de 2 y 22 hs posfertilización. En cerebro hay una alta proporción (16%) de tubulina tirosinable cuya composición es diferente de la encontrada en ovocitos o embriones; la mayor proporción (70%) está constituida por tubulina no-tirosinada.

La ligasa fue detectada en todos los tipos de extractos estudiados. En cambio, la carboxipeptidasa se encontró solamente en extractos de cerebro.

La variación en las proporciones entre tubulina tirosinada y no-tirosinada debe interpretarse como la resultante de las actividades relativas de las dos enzimas. En cambio, la variación entre tubulina tirosinable y no-tirosinable podría deberse tanto a una modificación postraducción como a la expresión de genes diferentes.

BIOQUIMICA DEL VENENO DE LA ARAÑA L. laeta Y SU IMPORTANCIA BIOTECNOLOGICA. (Biochemistry of L. laeta spider venom and its Biotechnological importance). Boscur, L., Medina, J.N. y Yevenes, I. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Varios autores han descrito los dañinos efectos del aracnismo en Chile, y han enfocado el problema de que no se dispone actualmente de una terapia adecuada. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar el mecanismo bioquímico del veneno de la araña de los rincones Loxosceles laeta.

En este trabajo se presentan los resultados del efecto que produce en el riñón de conejo, el veneno de la L. laeta inyectado por vía intradérmica. El daño renal fue evaluado midiendo las actividades enzimáticas de la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, transaminasa glutámica oxaloacética (GOT) y transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) en la orina de conejos recolectada en 24 hrs, y el experimento duró 6 días.

En los resultados obtenidos se observó que post-inyección del veneno, las 4 enzimas estudiadas comenzaron a aumentar sus actividades enzimáticas hasta alcanzar un máximo a las 72 hrs. y luego comenzaron a disminuir lentamente a las 96 hrs. y 120 hrs.

La conclusión nuestra, es que el riñón de conejo fue dañado por efecto del tóxico veneno de la L. laeta. Algunos autores han demostrado que la mordedura de araña o de abeja produce un síndrome nefrítico y destrucción de las células tubulares. Pensamos que la destrucción del tejido renal es lo que ha producido la liberación a la orina de las 2 transaminasas. Asimismo, el tóxico efecto del veneno causó el aumento de la actividad de las fosfatasas alcalina y ácida. La importancia que nuestras investigaciones puedan tener para la Biotecnología es que un conocimiento profundo de la estructura del veneno nos permitirá preparar el antisuero específico para el veneno y sintetizar alguna droga que pueda contrarrestar el efecto venenoso.

ALTERACIONES CROMOSOMICAS INDUCIDAS POR LINDANO EN MÉRISTEMAS RADICULARES DE *Chlorophytum comosum*. (Chromosomal modifications induced by Lindane in radical meristems of *Chlorophytum comosum*). Bastías, J., Guerrero, C. Laboratorio de Citogenética, Departamento de Ciencias Básicas, Instituto Profesional de Chillán. (Patrocinio: R. Godoy Herrera).

El Lindano es un insecticida organoclorado cuyo potencial genotóxico se conoce parcialmente. A pesar de ello, este compuesto es utilizado ampliamente en medicina para el tratamiento de la sarna y pediculosis en general. Esto nos motivó a indagar sobre la mutagenicidad del agente en cuestión utilizando a *C. comosum* una especie de centinela vegetal.

Para ello se indujo el crecimiento radicular de 20 plántulas colectadas de una misma planta madre en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas (luz, temperatura y oxigenación). Una vez que las raíces tenían 2 cm. de longitud se separaron en 3 grupos: a) Controles, b) Tratadas con  $1 \times 10^{-4}$  gr/ml de Lindano por 2 horas para luego pasarlas a medio limpio por 3, 6, 12 y 24 horas posterior al pulso y c) Tratadas con  $1 \times 10^{-4}$  gr/ml de Lindano en forma continua por 3, 6, 12 y 24 horas.

Transcurrido el tiempo de tratamiento de los 3 grupos, se colocaron en colchicina al 0,1% por 3 horas, siendo cortadas las raíces y fijadas en metanol-ácido 3:1. Las preparaciones se confeccionaron siguiendo la metodología del aplastado, siendo las placas metafásicas analizadas y fotografiadas en un microscopio Leitz, modelo Dialux-20.

Nuestro hallazgo revela que el Lindano induce: 1) Quebres de cromátidas; 2) Quebres de cromosomas; 3) Gaps y 4) Descondensación cromosómica. Los resultados encontrados se contrastan estadísticamente y se discuten considerando el mecanismo de acción del agente.

S-ADENOSIL-L-METIONINA Y PORFIRIA CUTANEA TARDIA-TRATAMIENTO EXITOSO EN DOS NIÑOS. (S-Adenosyl-L-methionine and Porphyria Cutanea Tarda-Successful treatment in two children). Batlle, A.M.del C.; Stella, A.M.\*; Melitto, V.\*; Guzman Mariano, H.\*\*; Kaminsky, A.R.\*\*; Kaminsky, C.\*\*  
\*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias -CIPYP- (FCEN, UBA y CONICET). \*\*Hospital Militar Central "Dr. C. Argerich" \*\*\*Hospital Zubizarreta.

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se manifiesta generalmente después de los 40 años, aunque se han descrito casos aislados y raros de PCT infantil.

Se presentan dos nuevos casos de PCT infantil en los cuales se ha aplicado con éxito una nueva terapia combinada de S-adenosil-L-metionina (SAM) y cloroquina.

En un niño de 12 años y una niña de 7, en base a los típicos signos clínicos de fotosensibilización e hipertricosis, se confirmó el diagnóstico de PCT hereditaria con los estudios bioquímicos, característico patrón de excreción urinaria, disminución de la actividad de la Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) eritrocitaria y elevado índice de Porfirinas Plasmáticas (IPP) con máximo de emisión a 617-618 nm.

El tratamiento que se propone como otra alternativa terapéutica consiste en la administración inicial y simultánea de SAM oral (comprimidos-12mg/kg diarios) durante 3 semanas y de bajas dosis de cloroquina oral (2x100 mg-semanal) durante aproximadamente 120-150 días o hasta completa normalización y estabilización del cuadro clínico y bioquímico.

En estos niños se logró una total recuperación clínica y bioquímica dentro de los 3 meses, sin recidivas luego de 8 meses. No se observaron reacciones oftalmológicas ni otros efectos colaterales indeseados.

En conclusión, el tratamiento propuesto es seguro, simple y confortable para los pacientes. Se consigue una remisión completa y estable en corto tiempo y aunque la PCT infantil es excepcional, esta terapia sería la más indicada para niños y aquellos pacientes que no pueden tolerar flebotomías repetidas.

Se postula un mecanismo de acción en el cual el efecto del SAM se atribuye a que este compuesto incrementa la disponibilidad del glutatión hepático, facilitando así la movilización y rápida excreción biliar del hierro libre tóxico, además de contribuir al estado de óxido-reducción intracelular necesario para una óptima funcionalidad de la URO-D.

S-ADENOSIL-L-METIONINA E INTOXICACION POR PLOMO. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA VIA DE ADMINISTRACION. (S-Adenosyl-L-Methionine and lead intoxication. Comparative study of the route of administration.)

Batlle, A.M. del C.; Paredes, S.R.; Fukuda H.; Kozicki P.A. y Rossetti, M.V.  
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- FCEyN-UBA-CONICET.

La  $\delta$ -aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) es uno de los más sensibles parámetros de la intoxicación por plomo. El efecto inhibitorio del metal sobre esta enzima puede revertirse con GSH que se encuentra también disminuido en el saturnismo. La S-Adenosil-L-Metionina (SAM) es un excelente precursor del GSH, restaurando el nivel del tiol en hígado. Una importante vía de eliminación de los metales es la biliar; el GSH participa en este proceso así como en la detoxificación general de xenobióticos a través de la formación de aductos.

En base a estas consideraciones, se estudió comparativamente la acción del SAM administrado en forma oral, s.c. o i.v. en la intoxicación por plomo.

Se administró SAM diariamente s.c. (20 mg/kg) y oral (80 mg/kg) a ratones intoxicados por plomo en forma aguda durante 20 días. Pacientes intoxicados crónicamente por plomo recibieron SAM diariamente en forma i.v. (12 mg/kg) y oral (25-30 mg/kg).

En todos los casos después del SAM, aumentó la concentración de GSH, que se encontraba inicialmente reducido correspondientemente disminuyó en forma rápida el contenido de plomo y se recuperaron los niveles de ALA-D.

La mayor parte del plomo movilizado se eliminó por heces, mostrando un pico dentro de las 24-48 hrs. en los animales tratados con SAM. La excreción urinaria fue muy baja.

Los niveles de ALA, PBG y porfirinas, aumentados en algunos casos de intoxicación por plomo, alcanzaron cifras normales luego de la terapia.

Se observó una buena correlación entre la recuperación del GSH, la actividad del ALA-D y la disminución del contenido de plomo, apoyando nuestra hipótesis de que, como consecuencia de la administración de SAM se incrementa la disponibilidad de GSH, facilitándose el proceso de detoxificación y rápida eliminación del plomo de los diferentes compartimientos y, consecuentemente, revertiéndose la inactivación de la enzima por el metal.

El hígado jugaría un papel importante en la captación y transporte del plomo como un conjugado con el GSH, hacia la bilis, dando como resultado una mayor excreción biliar del metal.

INTERCAMBIO ORTOFOSFATO-PIROFOSFATO CATALIZADO POR LA PIROFOSFATASA SOLUBLE Y DE MEMBRANA. ROL DEL GRADIENTE DE  $H^+$ . (Orthophosphate-pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound pyrophosphatases. Role of  $H^+$  gradient). Behrens, M.I., de Meis, L., Celis, H., Romero, I., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A.  
Dept. Bloq. Univ. Federal Río Janeiro y Centro Invest. Fisiol. Cel. Univ. Autónoma de México.

La pirofosfatasa de membrana de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* cataliza un intercambio ortofosfato-pirofosfato ( $PI=PPi$ ), que requiere un gradiente electroquímico de  $H^+$ . Se comparó la reacción catalizada por esta enzima con la que se obtiene con la pirofosfatasa soluble de levadura, donde no hay gradiente de  $H^+$ .

En ambos sistemas la velocidad de intercambio aumentó al incrementar el pH y la concentración de  $MgCl_2$ . El  $K_{0.5}$  para  $PI$  de la pirofosfatasa soluble disminuyó al agregar solventes orgánicos al medio o al aumentar la concentración de  $MgCl_2$ . Los valores de  $K_{0.5}$  obtenidos fueron menores que los observados con los cromatóforos de *R. rubrum*. La disminución del  $K_{0.5}$  de la enzima soluble no se asoció a una disminución de la razón entre las velocidades de hidrólisis y síntesis de  $PPi$ . En presencia de  $MgCl_2$  1mM la razón hidrólisis/síntesis de  $PPi$  medida a pH 7.8 fue similar en ambos sistemas. En presencia de 10mM  $MgCl_2$  esta razón disminuyó más de 10 veces en los cromatóforos y 2-3 veces en la enzima soluble.

Estos resultados indican que para la pirofosfatasa no habría relación entre el  $K_{0.5}$  para  $PI$  y la razón hidrólisis/síntesis de  $PPi$ . El ión  $Mg^{2+}$  parece estar involucrado en la disminución de esta razón cuando se forma el gradiente de  $H^+$  en los cromatóforos.

Financiado por FINEP y CNPq, Brasil.

TIROSINACION DE MICROTUBULOS Y TUBULINA EN GLOBULOS ROJOS DE AVES. (Tyrosination of microtubules and non-assembled tubulin in avian red cells). Beltramo, D.M., Arce, C.A. y Barra, H.S. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. 5016-Córdoba. Argentina.

Estudios previos han demostrado que el terminal COOH de tubulina  $\alpha$  puede ser modificado por la incorporación de un residuo de tirosina mediante la acción de tubulina:tirosina ligasa. *In vitro*, la ligasa actúa sobre tubulina en su estado no-ensamblado pero no sobre microtubulos. Sin embargo, experimentos realizados en cortes de cerebro sugieren la posibilidad de que *in vivo* la incorporación se realice preferentemente sobre microtubulos, aunque cabe señalar que esta conclusión se ve complicada por la alta velocidad de intercambio entre tubulina y microtubulos. En este trabajo investigamos nuevamente esta cuestión pero utilizando glóbulos rojos de pollos donde los microtubulos están confinados a una banda marginal que intercambiaría muy lentamente con la población de tubulina no-ensamblada.

Los glóbulos rojos fueron incubados en presencia de tirosina- $^{14}C$  en condiciones en que la síntesis de proteínas está inhibida. Después de disgregar la membrana en condiciones en que los microtubulos son preservados, éstos fueron separados de la población de tubulina no-ensamblada. Los resultados mostraron que la tubulina no-ensamblada fué marcada con tirosina- $^{14}C$  en una magnitud mucho mayor que los microtubulos. La baja incorporación de tirosina- $^{14}C$  en microtubulos no se debe a la falta de tubulina aceptora ya que la desintegración de los microtubulos por frío y colchicina condujo a una mayor incorporación de tirosina radiactiva. Estos resultados claramente apoyan la idea de que la ligasa actúa preferentemente sobre tubulina no-ensamblada. Sin embargo no se puede asegurar que en todos los tipos de células opere el mismo mecanismo de tirosinación.

ESTUDIOS SOBRE LOCALIZACION Y FORMAS MOLECULARES DE LA FENILALANIL-tRNA SINTETASA DE OOCITOS DE *X. laevis*. (Studies on the location and molecular shapes of the phenylalanyl-tRNA synthetase of *X. laevis* oocytes.) Bentítez, R. y Arancibia, F. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: M. Gatica.)

La fenilalanil-tRNA sintetasa (FRS) es una enzima que ha sido estudiada tanto en procariontes como en eucariontes en cuanto a su estructura y PM, encontrándose para ésta valores que varían entre 130.000 y 230.000. En una presentación anterior nosotros encontramos que la FRS se encuentra en ovario de *Xenopus laevis* formando complejos con otras tRNA sintetetas (Tisil, isoleucil, leucil, etc.) y otras proteínas.

En este trabajo realizamos estudios sobre la localización de la FRS en oocitos. La enzima se encuentra principalmente en la fracción citosólica y no se encuentra presente en membranas ni en núcleos de oocitos. Al mismo tiempo realizamos la purificación de la enzima en forma de complejo y determinamos que la Mr es de  $\sim 2 \times 10^6$  daltons, medida por filtración en Sephacryl P-300. Para realizar un estudio sobre la estructura nativa de la enzima libre realizamos una preparación de la enzima de oocitos mediante cromatografía de afinidad a través de una columna de sepharosa-4B-tRNA en la cual la actividad de la enzima se presentó en 2 picos, uno que eluye en el frente y otro que eluyó con una concentración 180 mM de NaCl y que presentó una Mr de 110.000 daltons medido por electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS. No sabemos si la enzima nativa tiene una o varias subunidades de 110.000.

Al mismo tiempo realizamos la fosforilación de la enzima para medir cambios en su actividad y comparamos con lo observado con la FRS de levadura. Los resultados obtenidos no son concluyentes y se encuentran bajo estudio.

Estudio efectuado con patrocinio del DIB y la OEA.]

EFFECTOS DE METABOLITOS DE VITAMINA D<sub>3</sub> SOBRE LA COMPOSICION DE FOSFOLIPIDOS DE MIOBLASTOS EN CULTIVO (Effects of vitamin D<sub>3</sub> metabolites on phospholipid composition of cultured myoblasts). Bellido, T., Drittanti, L., Bolland, R y R. de Bolland, A. Departamento de Biología, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

El tratamiento *in vivo* con vitamina D<sub>3</sub> modifica la composición de fosfolípidos de membrana de músculo esquelético de pollo. En el presente trabajo se caracterizaron los efectos de metabolitos de vitamina D<sub>3</sub> en músculo embrionario *in vitro*. Se cultivaron mioblastos de embrión de pollo de 12 días en presencia de concentraciones fisiológicas de 25-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (25OHD<sub>3</sub>) y 1,25-dihidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) durante 4, 8, 12 y 24 horas. En fosfolípidos individuales aislados por cromatografía en capa fina de extractos lipídicos de las células se determinó el contenido de P y la composición de ácidos grasos (por cromatografía en fase gaseosa de los derivados metil ester). El 25OHD<sub>3</sub> no produjo modificaciones significativas en las concentraciones relativas de los distintos fosfolípidos mientras que el 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> incrementó el contenido de fosfatidilcolina (PC) a expensas del de fosfatidiletanolamina (PE). Los efectos fueron evidentes a las 4 horas de tratamiento y alcanzaron niveles máximos a las 24 horas (21% incremento PC, p<0.0005; 19% disminución PE, p<0,0125). Los cambios son similares a los observados *in vivo*. No se detectaron diferencias en composición de ácidos grasos mayoritarios (16:0, 18:0, 18:1 w9, 18:2 w6) para ningún fosfolípido. Sin embargo, en las células cultivadas en presencia de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> se observó un incremento notorio (de 1% a 9% del total de ácidos grasos a las 4 horas) en un ácido graso minoritario de PE, y en menor proporción en PC, de tiempo de retención prolongado. Se realizan estudios para la identificación de este compuesto.

CARACTERIZACION QUIMICA PARCIAL Y PROPIEDADES DE UN GLICOLIPIDO QUE UNE TOXINA COLERICA. (Partial chemical characterization and properties of a glycolipid that bind cholera toxin). Bennun, F.R.; Roth, G.A. y Cumar, F.A. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

En el mecanismo de acción de toxina colérica se acepta que el gangliósido GMI es el "receptor" de dicha toxina. Previamente demostramos, por ensayos de unión en TLC ó por cambios en los espectros de emisión de fluorescencia de triptofano, que de 6 gangliósidos de cerebro solo GD1b es capaz de interaccionar con toxina colérica con una capacidad similar a GMI. En extractos de glicolípidos de células de mucosa intestinal de cerdo, hemos detectado alrededor de 8 compuestos que unen toxina. Cuatro de ellos se comportan similares a GMI, por criterios cromatográficos y ensayos con neuraminidasa. Las diferencias entre ellos podrían deberse a la calidad del ácido siálico y/o porción hidrofóbica. Los restantes migran en TLC similares a GD1b. Sin embargo, uno de estos últimos, purificado a homogeneidad cromatográfica, revela ausencia de ácido siálico según reacción colorimétrica y comportamiento en DEAE-Sephadex. La identificación química parcial de dicho compuesto por GLC indica una composición porcentual de ácidos grasos: palmítico 20, palmitoleico 10, esteárico 14, oléico 26, no identificados 30; y una composición molar relativa de glúcidos: glucosa 1, galactosa 2, fucosa 1. No se descarta la posible presencia de hexosaminas y esfingosinas. Por otro lado, parece existir una relación entre la estructura química del compuesto en estudio y aquella que determina los grupos sanguíneos ABO ya que puede ser inmunodetectado en TLC con suero anti-A ó anti-AB pero no con anti-B. Esta propiedad podría ser relevante en la correspondiente patología en humanos. No conocemos que se haya descrito ningún compuesto sin ácido siálico, que contenga fucosa y que tenga la propiedad de unir toxina colérica; ni que exista antecedente de relación alguna entre compuestos que unen toxina y determinantes de grupos sanguíneos.

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACION EN LA FORMACION DE PELLETS PARA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO (Influence of operating conditions on pellets formation for use in citric acid production) Benuzzi, D. y Segovia, R. Cátedra de Microbiología General e Industrial, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, San Luis, Argentina.

Es de gran importancia para el buen rendimiento de un proceso de obtención de cítrico, por Aspergillus niger, (A.n.) contar con pellets pequeñas laxas y esponjosas. En la estructura influyen las condiciones de operación de la etapa de formación. Se planteó entonces la necesidad de manejar las distintas variables, cada vez que se inicia un proceso de producción. Paralelamente se intentó dar explicación a los fenómenos observados.

Métodos: Con esporas de A.n., de cepas buenas y malas productoras de ácido cítrico, se inocularon medios líquidos de formación de pellets. Se extrajeron muestras a las 8-12-24-36 y 48 h. Durante el proceso se realizó: cambio de baffles, variación en agitación, cambios en la proporción C:N del medio, variación del tamaño del inóculo.

Resultados y discusión: La calidad y estructura de las pellets fue adecuada en erlenmeyers con baffles de acero inoxidable que producen mayor turbulencia que los de vidrio. La agitación se ajustó a 200 rpm o sea que no es factor contraproducente en la formación de pellets. El tamaño del inóculo debe ser bajo pero esto es relativo, según nuestra experiencia, a la disponibilidad de C. Las mejores pellets fueron las extraídas a las 36 h de agitación, presentándose como tiempo favorable en la maduración de la pellet. Las cepas clasificadas como malas productoras de cítrico, aumentan su productividad y rendimiento al usarlas en forma de pellets de características óptimas, destacando así la importancia de manejar el conjunto de condiciones que permiten mayor éxito en la obtención de pellets pequeñas, laxas y esponjosas.

ESTUDIO DE LA CITOLOGIA VAGINAL DE LA LLAMA (LAMA GLAMA) EN CAUTIVERIO Y SU RELACION CON EL CICLO ESTRAL. (Study of the relationship between the vaginal cytology and the estrus cycle in the captive Llama-Lama Glama). Bernal, S. A.; Urquieta, M.B.; Bastres, O.C.; Ferrando, R.G. Dept. Fomento de la Producción Animal; Depto. Ciencias Biológicas Animales, Fac. Cs. Vet. Pec.

Patrocinio: G.R. Ferrando  
Se realizó un estudio cualitativo de la morfología citológica vaginal tendiente a caracterizar el funcionamiento ovárico. Se emplearon 12 ejemplares adultos; durante el período de noviembre - abril de 1986 obteniéndose las muestras semanalmente. Desde el punto de vista histológico se empleó la técnica de Papanicolaou descrito por López y Col. (1982); para la interpretación de los frotis se utilizó la clasificación descrita por Schutte (1967). Se determinó que el celo citológico tuvo una duración de 24 a 31 días, en tanto que el anestro citológico presentó un rango de 7 a 14 días. Este celo citológico, tuvo una duración mayor en plena temporada reproductiva. No se observaron diferencias en la citología vaginal entre las hembras en los distintos estados reproductivos, sólo se evidenció una abundante presencia de leucocitos durante el inicio de la gestación.

HETEROGENEITY OF LYSOSOMES: THE EFFECT OF CHLOROQUINE ON THE EQUILIBRIUM DENSITY OF LYSOSOMAL POPULATIONS. Bertini F. and Colombo I., IHEM-CONICET; Univ. Nac. de Cuyo, Mendoza, Argentina.

Lysosomes are heterogeneous populations of subcellular bodies, and we think that the lysosomotropism of some drugs may be useful to differentiate them.

A lysosomal fraction separated by differential centrifugation between 1,935 g x 3 min and 27,000 g x 15 min from mouse liver after injecting the drug or saline (controls), was analyzed in a Percoll gradient for acid hydrolytic activity and drug distribution. (L)

In the controls, the activity of all enzymes studied presented a peak in the zone of high density (1.147 g/ml, dense lysosomes) and another one in the zone of light density (1.070 g/ml, Light lysosomes). With the exception of acid phosphatase most of the enzymatic activity equilibrated with the high density lysosomes. In the CQ treated animals there was a shift of the enzymatic activities from the dense to the light lysosome zone, and the amount of shifted activity increased with the time elapsed after the injection. When the L particles were incubated in vitro with CQ, only moderate amounts of activity changed in density.

The results suggest that both in the in vivo and in vitro experiments CQ penetrate into the secondary lysosomes. In the first conditions these latter increase in number due to the vacuolation caused by the drug, and consequently more enzyme activity change in equilibrium density with time.

The lysosomes rich in acid phosphatase in the light zone may represent prolysosomes from GERL (Golgi-Endoplasmic Reticulum-Lysosomes).

PARAMETROS TERMODINAMICOS DE COMPRESION DE CAPAS MONOMOLECULARES DE GLICOESFINGOLIPIDOS SOBRE SUBFASES QUE CONTIENEN, GLICEROL, UREA Y SACAROSA. (Thermodynamic parameters of compression of glycosphingolipid monolayers on subphases containing glycerol, urea and sucrose). Bianco, I.D. y Maggio, B. Departamento de Óca. Biológica - CIOUBIC, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Se estudió la variación con la temperatura (10-35°C) de la energía libre de compresión ( $\Delta F_c$ ) para capas monomoleculares de glicoesfingolípidos (GSLs) (GalCer, sulfátido,  $G_{M1}$ ,  $G_{D1a}$  y  $G_{T1b}$ ) y fosfolípidos (PLs) (dpPC y dpPE) sobre subfases con glicerol, urea y sacarosa; se calcularon los cambios en entalpía ( $\Delta H_c$ ) y entropía ( $\Delta S_c$ ) del proceso de empaquetamiento bidimensional. Con respecto a NaCl 145 mM, los tres solutos provocan un aumento del  $\Delta F_c$  de todos los GSLs y PLs estudiados; la dependencia del  $\Delta F_c$  con la temperatura es diferente, lo cual se traduce en diferentes valores de  $\Delta H_c$  y  $\Delta S_c$ . En general  $\Delta S_c$  y  $\Delta H_c$  de capas monomoleculares de dpPC y dpPE son muy poco modificados por la presencia de estos solutos en la subfase. El proceso de compresión de GSLs en presencia de glicerol ocurre con un cambio en  $\Delta S_c$  hacia valores más positivos, indicando un mayor desordenamiento. Sobre sacarosa ocurre lo opuesto, y se observa que el proceso de reducción del área molecular está entrópicamente desfavorecido y entálpicamente favorecido. En subfases con urea, se observa una marcada dependencia de la magnitud y signo de los parámetros termodinámicos con el tipo de grupo polar del GSL. Estos efectos probablemente se relacionan con fenómenos de hidratación-deshidratación de la interfase.

VINCULACION DE LOS RESIDUOS DE HISTIDINA CON LA FUNCION BIOLOGICA DE LA FAMILIA DE LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO. (Histidine residues in the biological activity of the growth hormone family). Biscoglio de Jimenez Bonino, M. J., Cascone, O., Fukushima, J.G. y Santomé, J.A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA - CONICET).

La etoxiformilación de las hormonas de crecimiento de origen bovino y equino permitió vincular a los residuos de histidina 19 y/o 21 con la función biológica de estas proteínas. Ante la importancia de este hallazgo se extendió este estudio a la de origen humano.

Estas proteínas poseen tres residuos de histidina en su molécula.

La digestión triptica de derivados convenientemente modificados y el aislamiento y purificación de los péptidos correspondientes, mediante cromatografía líquida de alta performance y modulación de hidrofobicidad, permitieron identificar a la histidina 169 como el residuo más lento y a las 19 y 21 como los más reactivos. En la hormona humana sólo dos se etoxiformilaron en ausencia de desnaturizantes, la histidina 151 fue la más reactiva, la 21 no reaccionó y la 18 manifestó reactividad intermedia.

La influencia de la modificación química sobre la acción biológica se evaluó midiendo la capacidad de las hormonas modificadas para unirse a los sitios de unión específica en hígado de rata. La etoxiformilación de las histidinas 19 y 21 de las hormonas bovina y equina anuló esta capacidad.

El derivado obtenido con la hormona de crecimiento humana, en el que la histidina 21 es no reactiva retuvo el 40 % de la capacidad de reconocer los sitios de unión específica.

RELACION ENTRE PRODUCCION DE PROSTAGLANDINA-E<sub>2</sub> Y EXCRECION RENAL DE SAL Y AGUA EN RATAS HEMBRAS HIPERTENSAS. (Relationship between prostaglandin-E<sub>2</sub> production and renal salt and water excretion in female hypertensive rats). R. Bltran y B. Zamorano. Depto. Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Prostaglandina-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) además de su acción diurética y natriurética, modularía la reactividad vascular a agentes presores. Nosotros estudiamos si el aumento de la presión arterial (PA) producido por sobrecarga crónica de presión (SCP), se asociaba a cambios de la producción de PGE<sub>2</sub> renal y de la excreción de orina y electrolitos.

La SCP se indujo en ratas S. Dawley adultas, por constricción aórtica sub-diafragmática. Se midió la PA y se determinó la concentración de PGE<sub>2</sub> y electrolitos (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>), en plasma, orina y médula renal a los 7, 15 y 30 días después de la intervención quirúrgica.

Los resultados demuestran que en ratas con SCP: 1) el aumento de la PA desde un valor control de 115±2.7 a 166±2.6 mm de Hg, se asoció a un 270% de aumento de la concentración de PGE<sub>2</sub> plasmática; 2) aunque no hubo diferencia significativa de la concentración de PGE<sub>2</sub> en tejido renal, la excreción urinaria de PGE<sub>2</sub> aumentó a los 7 días: de 22.4±1.71 a 54.4±1.72; a los 15 días: de 22.7±1.31 a 54.9±3.4; y a los 30 días: de 25.1±1.16 a 66±3.5 ng/8 h; 3) este aumento se correlacionó con una mayor excreción de orina y electrolitos (P < 0.001).

Estos resultados sugieren que un mecanismo relacionado con PGE<sub>2</sub> participa en la respuesta compensatoria a este tipo de sobrecarga. (Financiado por Proyecto 1131, CONICYT).

EFFECTO DE REIMPLANTE DE ADENOHIPOFISIS SOBRE RESPUESTAS ESTROGENICAS EN RATAS ADULTAS. (Effect of adenohipophysal reimplants on estrogenic responses in the adult rat). Blamey, C., González, G. y Arriagada, R. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación.

Se ha postulado que los estrógenos presentan a lo menos dos mecanismos de acción independientes entre sí; de tipo genómico con desrepresión del ADN y no genómica mediada por eosinófilos. Condiciones de hiperprolactinemia provocan infertilidad. El objetivo de este trabajo fue estudiar el reimplante de adenohipofisis (AH) sobre respuestas estrogénicas.

Ratas Sprague dawley adultas, mantenidas en condiciones habituales de laboratorio con libre acceso al agua y comida fueron ovariectomizadas, 9 días después reimplantadas con una AH o un trozo equivalente de corteza cerebral (CC); al cabo de 5 días los animales de distribuyeron al azar en 4 grupos: I CC-suero; II CC-estradiol (E<sub>2</sub>); III AH-suero; IV AH-E<sub>2</sub>. El E<sub>2</sub> fue inyectado endovenoso en dosis de 300 ug/Kg; a las 06:00 y 24:00 horas, los cuernos uterinos fueron pesados y procesados histológicamente para cuantificación de eosinófilos y morfometría.

En animales AH no tratados se encontró un aumento de la densidad celular en endometrio superficial y una disminución de la altura del epitelio luminal. Se demostró además que el E<sub>2</sub> indujo mayor edema en el endometrio superficial de animales AH que en CC; en cambio el E<sub>2</sub> indujo menor hipertrofia miometrial y eosinofilia uterina, en animales AH que en animales CC. Se observó además que la hipertrofia luminal inducida por E<sub>2</sub> fue deprimida en animales con AH.

Los resultados indican disociación en las respuestas estrogénicas y atenuación de ellas bajo condiciones de hiperprolactinemia inducida por reimplante de AH.

Financiado por fondo: Proyecto BL 85-011 Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación y Proyecto B 14 93-8655 Universidad de Chile.

ESCHERICHIA COLI - 2',4-DIHIPOXICALCONA: SISTEMA MODELO PARA LA ENSEÑANZA DE CINÉTICA DE REACCION EN BIOQUIMICA. (Escherichia coli - 2',4-dihydroxychalcone: Model System for the reaction kinetic teaching in Biochemistry). Blanco, S.E., Segovia, R.F., Debattista, N.B., Pappano, N.B. y Ferretti, F.H. Cátedras de Química-Física II y Microbiología Industrial, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. San Luis Argentina.

La mayoría de los procesos bioquímicos no son fenómenos especiales sino más bien el resultado de un conjunto de transformaciones que obedecen las mismas leyes que las reacciones químicas comunes. Por ello numerosas materias de la Carrera de Bioquímica que hacen a la profesión en sí (Bacteriología, Análisis Clínicos, Farmacología, Química Biológica, etc.), requieren para su desarrollo el conocimiento previo de conceptos y leyes fundamentales de Cinética Química. Por otra parte se observa frecuentemente que la enseñanza y aprendizaje experimental de los temas cinéticos no se realiza directamente sobre sistemas biológicos. Esto provoca en los estudiantes de Ciencias de la Vida un cierto desinterés por la Cinética, a la cual ven como un compendio de recetas y procedimientos matemáticos de difícil aplicación. En esta terna bajo y para facilitar la integración de conocimientos básicos de Cinética de Reacción con asuntos y cuestiones que importan a la Bioquímica Aplicada, se presenta un sistema original muy conveniente para la enseñanza, aprendizaje y aplicación de conceptos como velocidad específica de crecimiento de microorganismos, tiempo de generación, mecanismos de inhibición bacteriostática, etc. Se determinan las curvas de crecimiento de *E. coli* (ATCC 25 922) en caldos nutritivos adicionados de 2',4-dihidroxicalcona obtenida por síntesis. Las mediciones cinéticas se realizan empleando un método turbidimétrico a 720 nm. Las experiencias propuestas son muy sencillas de efectuar, utilizan herramientas matemáticas muy simples y sólo requieren instrumental común de laboratorio.

DETERMINACION DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE INHIBICION DE MICROORGANISMOS Y DE CONSTANTES DE ESTABILIDAD DROGA - TRANSPORTADOR QUIMICO MEDIANTE REGRESION NO LINEAL (Determination of inhibition specific rate of microorganisms and stability constants of drug - chemical carrier by no lineal regression). Blanco, S.E., Segovia, R.F., Debattista, N.B., Pappano, N.B. y Ferretti, F.H. Cátedras de Química-Física II y Microbiología Industrial, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. San Luis. Argentina.

La velocidad de crecimiento de los microorganismos depende de una serie de variables y factores tales como pH, temperatura, aireación, agitación, etc. Recientemente se determinó que el desarrollo de bacterias gram positivas y gram negativas en caldo nutritivo a 33 °C, y pH 7 ajustado con buffer  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K:PO}_4\text{HNa}_2$ , disminuye notablemente con el agregado de cantidades de flavonoides menores que 100  $\mu\text{g/ml}$ . El efecto bacteriostático ejercido por estas sustancias se interpretó mediante un mecanismo de inhibición de tres etapas que involucra la formación de un complejo droga - transportador químico. La dependencia de la velocidad de crecimiento específica de los microorganismos estudiados con la concentración de droga adicionada al medio de cultivo se explica por medio de una ecuación cinética con cuatro parámetros. A partir de esta ecuación, usando un método de regresión no lineal, se calcula la velocidad específica de inhibición de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC 25 923 y 25 922), y también la constante de estabilidad de los respectivos complejos flavonoide - transportador químico. (El programa de ajuste utilizado se basa en el método de Newton para hacer mínima la diferencia entre los valores medidos y los valores calculados mediante la función  $f(x)$  con parámetros  $a_j$ ).

PROCESAMIENTO IN VITRO DE  $\text{SP}_1$  TRADUCIDA POR mRNA DE PLACENTA HUMANA (In vitro processing of  $\text{SP}_1$  translated by human placental mRNA).

Bocco J.L., Flury A. y Patrino L. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

En un trabajo previo identificamos al precursor de  $\text{SP}_1$  traducido in vitro por poli(A)<sup>+</sup>RNA total de placenta humana, cuyo peso molecular fue de  $31 \pm 2$  Kd. En el presente trabajo, se hicieron ensayos de procesamiento in vitro del mismo suplementando el sistema de traducción celular con vesículas microsomales de páncreas de perro, ensayos de proteólisis limitada post-traducciona previa estabilización de las vesículas con dibucaina e inmunoprecipitación de  $\text{SP}_1$ .

La imagen fluorográfica de un gel de poli(acrilamida) SDS donde se separaron los productos inmunoprecipitados indicaron la existencia de un péptido de 28 Kd y otro de 46 Kd que son protegidos del ataque de las enzimas proteolíticas adicionadas exógenamente. El péptido de 46 Kd no se observó cuando el producto inmunoprecipitado se sometió a digestión con endoglicosidasa H. Un ensayo control, que contenía además de proteasas, tritón X-100 0,5 %, no permitió observar banda alguna.

Se concluye que el péptido traducido de 31 Kd es trasladado al interior de las vesículas microsomales, sufriendo el clivaje de su péptido señal, cuyo peso molecular sería de 3 Kd, originando la banda de 28 Kd. La banda de 46 Kd representaría la molécula madura glicosilada y los pesos moleculares de 90-120 Kd asignados por otros autores a la proteína circulante en plasma podrían corresponder a formas dimericas y triméricas de esta molécula.

CAMBIO EN LA COMPOSICION DE (GLICO)PROTEINAS CUTICULARES DURANTE LA METAMORFOSIS EN LA MOSCA MEDITERRANEA *Ceratitis capitata*. (Changes in cuticular (glyco)protein composition during the metamorphosis of the medfly *Ceratitis capitata*)

Boccaccio, G.L. y Quesada Allué, L.A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Camponar", (1405) Buenos Aires, Argentina

La síntesis y deposición de sucesivos exoesqueletos cuticulares a lo largo del ciclo de vida de los insectos constituye un excelente modelo de diferenciación. Sus principales componentes son quitina y proteínas. Se estudiaron las (glico)proteínas cuticulares insolubles en soluciones salinas y solubles en SDS 1% (o 7M urea). Los fragmentos cuticulares, liberados de residuos celulares, se separaron de la cutícula larval tanificada (pupario) por flotación diferencial en soluciones salinas. Se analizaron las proteínas, parcialmente purificadas, por electroforesis en geles nativos y desnaturizantes. Se describen 11 proteínas mayoritarias en larvas tardías (LPC) y 28 proteínas pupales (PCP). Estas últimas aparecen secuencialmente a lo largo del estadio (13 son tempranas, de las cuales sólo 5 son permanentes, y 11 tardías). Se detectó la presencia de una proteína específica del cambio de larva a pupa.

Las LPC exhiben un peso molecular aparente menor de 40 KD, en tanto que las PCP parecen de tamaños de hasta 100 KD. Se identificaron 2 glicoproteínas larvales y 11 glicoproteínas pupales tempranas por varios métodos [Hidrólisis química y enzimática, P.A.S., "Affinoblotting" (Con.A/peroxidasa/ sustrato cromógeno) etc.] Se concluye que diferentes grupos de (glico)proteínas se manifiestan secuencialmente, reflejando probablemente un fenómeno de activación/desactivación de genes específicos a lo largo del ciclo de vida. Por analogía con lo conocido en *Drosophila melanogaster*, esta expresión estaría regulada por la hormona de la muda, 20-hidroxicodisona.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA  $\beta$ -LACTAMASA DE *Azospirillum LIPOFERUM*. (Isolation and characterization of a  $\beta$ -lactamasa from *Azospirillum lipoferum*). Boggio, S.B., Díaz Ricci, J.C., de Mendoza, D. y Roveri, O.A.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

*Azospirillum lipoferum* es un microorganismo habitante del suelo muy resistente a ampicilina. Se ha sugerido que esta resistencia se deba a la presencia de una actividad tipo  $\beta$ -lactamasa pero no se han demostrado, hasta ahora, evidencias conclusivas.

Se ha aislado y parcialmente purificado una enzima con actividad de  $\beta$ -lactamasa a partir de células de *Azospirillum lipoferum* RG20. Esta enzima posee un peso molecular de aproximadamente 28.500, es capaz de hidrolizar penicilina ( $K_M=155 \mu\text{M}$ ) y nitrocefina ( $K_M=27 \mu\text{M}$ ), es inhibida por ácido penicilánico sulfona ( $K_I=50 \mu\text{M}$ ) y no requiere cationes divalentes.

La enzima se produce a un nivel basal bajo que aumenta unas quince veces con la adición de benzilpenicilina; este aumento es bloqueado por la presencia de clo-ranfenicol o rifampicina.

En suma, *Azospirillum lipoferum* RG20 produce una  $\beta$ -lactamasa inducible, probablemente responsable de la resistencia del microorganismo a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Subsidiado por CONICET y Fundación Roemmers (Argentina).

COMPOSICION Y FLUIDEZ DE LIPIDOS AISLADOS DE MEMBRANAS DE ERITROCITOS HUMANOS ESFEROCITICOS (Composition and fluidity of lipid isolated from membranes of human spherocytic erythrocytes). Bonilla S., Carreño C., Ullrich H., López L., Montalvar Y., Celedón G., Departamentos de Fisiología Normal y Patológica, Bioquímica y Química, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. (Patrocinio: C. Behn).

En membranas de eritrocitos humanos esferocíticos con esqueleto proteico defectuoso observamos un aumento de la fluidez de la matriz lipídica. En el presente trabajo se investiga la posibilidad que ello se deba a alteraciones en la composición lipídica de la membrana y en la organización de los lípidos aislados. Extractos lipídicos de membranas esferocíticas y normales se obtienen según el método de Folch modificado. La cromatografía bidimensional en capa fina y la cromatografía gaseosa no indican diferencias en cuanto a fosfolípidos y ácidos grasos respectivamente. La relación molar colesterol/fosfolípidos fue  $0.997 \pm 0.117$  en membranas esferocíticas ( $n=4$ ) y  $0.983 \pm 0.102$  en normales. Liposomas unilamelares de extractos de lípidos de membranas esferocíticas y normales, preparados por el método de inyección de los lípidos disueltos en cloroformo a buffer salino pH 7.4, se incuban en presencia de  $34 \mu\text{moles/l}$  de pireno y se separan de microagregados por filtración en BioGel P-30. La relación de la intensidad de fluorescencia excímero/monómero, usada como indicador de fluidez fue  $0.143 \pm 0.03$  en normales ( $n=3$ ) y  $0.160$  y  $0.132$  en dos pacientes esferocíticos. Se concluye que el aumento observado en el eritrocito no puede atribuirse a alteraciones en los lípidos aislados. Las modificaciones in situ pueden deberse a defectos en el esqueleto proteico de la membrana. DICT (UV).

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE LA PRENILTRANSFERASA EN FLAVEDO DE *Citrus sinensis* (Subcellular distribution of prenyltransferase in *Citrus sinensis* flavedo). Bravo, C. Dep. Bioq. y Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. y Farm. U. de Chile (Patrocinio: Dr. O. Cori).

El gran número de isoprenoides con diferentes funciones, que se forman en tejidos vegetales, sugieren la existencia de vías paralelas para su biosíntesis presentes en distintos compartimentos subcelulares.

Se estudió la distribución de la preniltransferasa, enzima que cataliza una de las etapas comunes para la biosíntesis de los terpenos. La actividad enzimática se encontró asociada a cromoplastos intactos y a una fracción soluble. Ambas formas de enzima se compararon en cuanto a masa molecular, requerimiento de metales bivalentes, comportamiento frente a reactivos modificadores de aminoácidos, estabilidad, etc.

Los resultados indican que existen diferencias en el comportamiento de ambas formas de enzima, lo que confirma que la preniltransferasa de la fracción soluble no corresponde a una enzima liberada por ruptura de los cromoplastos. La presencia de dos formas de preniltransferasa ubicadas en diferentes compartimentos subcelulares, apoya la existencia de vías paralelas para la biosíntesis de los diferentes compuestos de estructura isoprenica.

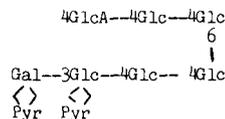
Trabajo dirigido por L.M. Pérez.

Proyectos 5001/85 FONDECYT y B 2078-8622 DIB.

LIPIDOAZUCARES EN RHIZOBIUM TRIFOLIUM

(Lipid linked sugars in *Rhizobium trifolii*) Bosch, M., Irion, N., Dankert, M. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y CONICET, Buenos Aires, ARGENTINA.

Bacterias gram-negativas del género *Rhizobium* infectan raíces leguminosas y forman nódulos donde se fija nitrógeno atmosférico. Los exopolisacáridos (EPS) que estas bacterias producen, parecen estar involucrados en las primeras etapas de infección, y por lo tanto de la nodulación. Se ha iniciado el estudio de la biosíntesis in vitro del EPS que produce *Rhizobium trifolii* U226. La unidad repetitiva propuesta para este EPS es la siguiente (Jansson et al., Carb. Res. 75 (1979) 207-220).



Utilizando un preparado enzimático, consistente en células permeabilizadas con EDTA, se ha observado incorporación de radioactividad a material extraíble con cloroformo metanol agua en relación 1:2:0.3, luego de incubación en presencia de UDPGlc( $^{14}\text{C}$ ), UDPGlc( $^{32}\text{P}$ ), y UDPGlcA( $^{14}\text{C}$ ). Estos compuestos son lábiles en medio ácido, sensibles a hidrogenación catalítica en presencia de platino; por tratamiento alcalino suave dan ésteres fosfóricos cíclicos y se retienen en columnas de DEAE celulosa en metanol 99%. Estas son características de prenilidifosfoazúcares. La estructura de la porción oligosacáridica de estos compuestos está en estudio. Se piensa que son intermediarios lipídicos en la síntesis del EPS.

CINETICA DEL TRANSPORTE DE L-ALANINA Y L-LEUCINA EN LA INTERFASE SANGRE-EPITELIO GASTRICO. (Kinetic of L-alanine and L-leucine transport at the blood - tissue interfase of gastric epithelium). Bravo, I.\*, Fuentes, O.\*\* y Pozo, M.\*. \*Depto. de Fisiología, Fac. de Ciencias Biológicas y R. Naturales, \*\* Depto. de Ciencias Básicas, Instituto Profesional de Chillán.

Estudios previos realizados en nuestro Laboratorio sugieren que en la interfase sangre-epitelio gástrico operan sistemas de transporte de aminoácidos considerados universales. En este trabajo, diseñado con el fin de caracterizar las agencias que transportan L-alanina y L-leucina, se presentan los resultados obtenidos en estómago de perro.

En un segmento del cuerpo del estómago perfundido a flujo constante ( $0.23 \text{ ml/min.g}$ ) con Tyrode-albúmina, utilizando la técnica de dilución de trazadores en mezcla, se encontró que alanina- $\text{H}^3$  y leucina- $\text{H}^3$  son captados en un  $30.6 \pm 12.2$  y  $35.1 \pm 13.2$ , respectivamente. La captación celular (U) de alanina- $\text{H}^3$  fue inhibida por adición del isómero frío ( $2$  a  $12 \text{ mM}$ ) o reemplazando al  $\text{Na}^+$  por colina. Además fue inhibido por L-serina. El flujo de alanina ( $v = \text{Ca.U.Q.}$ ) sigue una cinética de saturación con un  $\text{kM}$  aparente de  $2.56 \text{ mM}$  y una  $\text{Vmax} = 258.5 \text{ nM/ml.g}$ . La captación de leucina- $\text{H}^3$  fue inhibida en presencia del isómero frío (de  $10$  a  $60 \text{ mM}$ ) y muy levemente en ausencia de  $\text{Na}^+$ .

Aparentemente en la membrana basolateral del epitelio gástrico operan al menos dos sistemas de transporte de aminoácidos neutros. Uno dependiente de  $\text{Na}^+$ , que exhibe afinidad relativamente alta para la L-alanina y probablemente también para la serina y cisteína (tipo ASC). Otro, que aunque de menor afinidad, posee mayor especificidad por L-leucina y probablemente también por otros aminoácidos neutros de cadena larga.

Proy. DI. N° 20.33.17 y 33.03.22

ES LA RNA POLIMERASA I DE LEVADURA UNA PROTEINA GLICOSILADA? (Is yeast RNA polymerase I a glycoprotein?). Bravo, M., Riffo, R. y Bull, P. Laboratorio de Bioquímica, Dpto. Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La RNA polimerasa I de levadura es una enzima que cataliza la síntesis de RNA ribosomal y se ubica en el nucleolo. Se desconocen las señales que determinan su localización subcelular. Por otro lado, se sabe que la glicosilación de ciertas proteínas es un proceso fundamental para la transición G1/S en levadura, y que levadura tiene vías de glicosilación semejantes a las de organismos superiores. En este trabajo se pretende averiguar si la RNA polimerasa I presenta hidratos de carbono en su estructura.

La enzima se purificó a homogeneidad. Se determinó su afinidad por la lectina Concanavalina A (Con A) en columnas y en geles desnatantes. Se analizó la actividad de la enzima en presencia de la lectina. Además, se adaptaron levaduras a crecer en un medio sin glucosa, y se realizaron experimentos de incorporación *in vivo* de manosa- $2\text{-}^3\text{H}$  a cultivos en fase logarítmica de levadura adaptada, luego de los cuales se inmunoprecipitó la enzima a partir del extracto. Se determinó la radiactividad asociada a las subunidades por fluorografía.

Los resultados muestran que la actividad de la RNA polimerasa I no se modifica en presencia de Con A hasta al menos  $4.5\ \mu\text{M}$ . La enzima se retiene en columna de Con A-Sepharosa y es eluida con  $\text{NaCl}\ 0,1\ \text{M}$ , pero no con  $\alpha\text{-methylmanósido}$ . La subunidad de  $137.000\ \text{u}$  de Con A-FTIC, aunque en menor proporción que glicoproteínas conocidas como IgM o ovoalbúmina. Por marcación *in vivo* esta misma subunidad incorpora manosa- $2\text{-}^3\text{H}$  en pequeña cantidad.

Los datos disponibles hasta este momento, sugieren que si hubiera un componente hidrato de carbono en la enzima, éste no sería importante.

Financiado por Proyecto 1177/85 FONDECYT.

EFFECTO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN LA CONSTITUCION DE LOS LIPIDOS DEL TRIATOMA INFESTANS (Vinchuca). Effect of arachidonic acid in the lipid constitution of *Triatoma infestans*, Vinchuca). Brenner, R.R. y Bernasconi, A.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), UNLP-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nac.de La Plata, Argentina.

En líneas generales el ácido linoleico no es sintetizado por los insectos. Tampoco es convertido en ácido araquidónico como sucede con otros animales. El *T. infestans* a diferencia de otros insectos y por ser hematófago ingiere ambos ácidos con la sangre. En consecuencia, interesó estudiar si existe una utilización especial del ácido araquidónico por ese insecto. Por ello se analizó la composición lipídica y la composición de los ácidos grasos de cerebro, gonadas y cuerpo graso de insectos machos y hembras. Se demostró que ambos ácidos son incorporados preferentemente en los fosfolípidos, pero mientras el linoleico lo hace en proporción uniforme, el araquidónico es secuestrado específicamente por el fosfatidilinositol. Cerebro y gonadas contienen cantidades importantes de araquidónico pero la mayor proporción aparece en gonadas masculinas. Las gonadas femeninas vírgenes tienen menos ácido araquidónico. En las gonadas masculinas el araquidónico no sólo es secuestrado por el fosfatidilinositol sino también por la fosfatidilcolina. Los espermatóforos contienen cantidades elevadas de araquidónico que son transferidas a la hembra. Existe una posible relación entre las cantidades importantes de araquidónico en los órganos masculinos con la producción de prostaglandinas y la ovoposición.

ESPERMATOGENESIS EN ANIMALES ADULTOS DE *Tegula* (*Chlorostoma*) *tridentata* (POTIEZ Y MICHAUD, 1838) (MOLLUSCA, GASTROPODA). (Spermatogenesis in adult animals of *Tegula*, (*Chlorostoma*) *tridentata* (Potiez y Michaud, 1838) (Mollusca, Gastropoda). Brown, D. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

*T.(C.) tridentata* Arqueogastropodo del intermareal es dioico de fecundación externa. Las peculiaridades de espermatozoides primitivos en organismos con tal modalidad reproductiva, comparativamente, hace interesante caracterizar el gameto y la espermatogénesis.

Gónadas de animales de Bahía La Herradura (Coquimbo, Chile), fueron disecadas, fijadas, deshidratadas e incluidas en plástico. El estudio se realizó en cortes semifinos para M.O. y finos para M.E.T.

La espermatogénesis ocurre en túbulos gonadales con lúmen (vaso "sanguíneo"). La línea germinal se desarrolla en forma centrífuga hacia el antrogonal. Se caracteriza un tipo celular posiblemente sustentacular y 3 tipos de espermatogonias. Citos I ya poseen gránulos proacrosómicos. La espermioblastogénesis desde espermátida esférica pequeña se caracteriza por: Polarización de mitocondrias adosadas a carioteca hasta formar nebenkerne de mitocondrias voluminosas en parte posterior del núcleo; coalescencia de gránulos preacrosómicos en vesícula acrosómica; polarización de ésta en parte anterior y transformación en complejo acrosómico cónico prominente, con espacio subacrosómico que aloja un rodete axial; condensación de la cromatina con formación de un núcleo reducido cilíndrico corto, con indentación anterior presentando rodete, e indentación posterior con centríolo proximal perpendicular al distal que origina flagelo típico. Características del acrosoma permiten inferir su interacción especial con envolturas del huevo.

EFFECTO DE PROPRANOLOL Y SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD FEROMONAL SOBRE EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LA RATA MACHO. (Effect of propranolol and substances with pheromonal activity on the male rat sexual behavior). Bruzzone M. E., Zipper J., Balboa P., Chávez M. y Cabrera C.; Depto. Fisiol. y Biof., Fac. Medicina, Univ. de Chile.

Sustancias con actividad feromonal son producidas en la hipófisis posterior de la rata hembra bajo estimulación  $\beta$  adrenérgica. Se excretan por la orina y estimulan la conducta sexual de los machos. Se estudió el efecto de propranolol oral ( $20\ \text{mg/d.} \times 4\ \text{ds.}$ ) sobre la actividad sexual de un grupo de machos. Otros grupos tratados con propranolol recibieron además sustancias con posible acción feromonal por vía oronasal. Al 4º día se colocó cada macho con 3 hembras en proestro. Al día siguiente se determinó el % de cruzamiento por la presencia de espermios en el frotis vaginal. Al 9º día postcoital se cuantificó el n° de implantaciones confirmando el % de coitos fértiles. El propranolol disminuyó significativamente el % de cruzamiento ( $21,2\%$ ) con respecto al grupo control tratado con salino ( $36,6\%$ ). El efecto fue revertido por: inyección de epinefrina (E) en los machos ( $61,1\%$ ), presencia de hembras en proestro inyectadas con E ( $61,1\%$ ) y los siguientes estímulos oronasales: E ( $72,7\%$ ); orina de hembra en proestro inyectada con E ( $72,2\%$ ); orina de hembras ovariectomizadas ( $72,2\%$ ); orina de hembras ovariectomizadas inyectadas con E ( $77,8\%$ ); homogenizado de hipófisis posterior de hembras inyectadas con E ( $72,2\%$ ) y homogenizado de médula adrenal de hembras en proestro ( $50\%$ ). Los resultados sugieren que la E de la médula adrenal desempeñaría un rol en la producción de feromonas urinarias de origen neurohipofisiario sin aparente participación de las hormonas ováricas.

ESTRUCTURA DE 4  $\beta$ -LACTAMASAS DE BACILOS CEREBUS  
(Structure of 4  $\beta$ -lactamasas from *Bacillus cereus*)  
Bunster, M., Carrillo, O., Vargas, V. e Cid, H.  
Depto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas responsables de la inactivación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos tales como penicilinas y cefalosporinas. Su estructura terciaria es aún desconocida, pero estudios de estructura secundaria han permitido proponer un modelo estructural y un mecanismo catalítico comunes para 4  $\beta$ -lactamasas obtenidas de *B. cereus*, *B. licheniformis*, *S. aureus* y *E. coli*.

Una predicción de estructura secundaria de otras 3  $\beta$ -lactamasas III, cepa 569H y  $\beta$ -lactamasas secuenciadas recientemente, provenientes de *B. cereus*:  $\beta$ -lactamasa I cepa 5/B,  $\beta$ -lactamasa III, cepa 569H y  $\beta$ -lactamasa II, cepa 569H, por los métodos de Chou y Fasman y perfiles de hidrofobicidad, han permitido establecer la conservación del modelo de 2 dominios y la factibilidad del mecanismo catalítico propuesto, para la dos primeras. La  $\beta$ -lactamasa II, que requiere Zn como cofactor, presenta una estructura muy diferente: Se propone un modelo tridimensional de estructura secundaria y la posible ubicación del sitio activo para esta enzima. Este modelo es compatible con la proximidad de His 86-His 88, His 210 y Cys 169, ligandos del Zn.

Es interesante hacer notar que tanto  $\beta$ -lactamasa I 5/B y  $\beta$ -lactamasa III 569H obtenidas de *B. cereus*, presentan en algunas zonas una mayor homología estructural con la  $\beta$ -lactamasa de *B. licheniformis*, que con la  $\beta$ -lactamasa I 569H de *B. cereus*.

Proyectos de Investigación:  
20.31.12, D.I. Universidad de Concepción  
1085 FONDECYT.

CARACTERIZACIÓN DE UN DERIVADO FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA-N-ETILMALEÍMIDA ACTIVO INSENSIBLE A INHIBICIÓN POR FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO (Characterization of a fructose 1,6-bisphosphatase-N-ethylmaleimide active derivative insensitive to fructose 2,6-bisphosphate inhibition). Burgos, M.E., Reyes, A. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Se sabe que la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) de riñón de cerdo contiene residuos cisteína, esenciales para la activación de la enzima por  $K^+$ , cuya reactividad es aumentada por AMP (Reyes et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 373, 1985). El tratamiento de la enzima (50  $\mu$ M subunidad) con N-etilmaleimida (NEM, 100  $\mu$ M) a 30°C, pH 7,5, por 5 min y en presencia de AMP (200  $\mu$ M) resulta en la modificación de un grupo SH/subunidad. En este trabajo presentamos un estudio de las características cinéticas de la FBPasa así modificada.

El derivado activo que se forma es completamente insensible a inhibición por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>), un regulador potente de la enzima nativa. La pérdida de la inhibición se explica por la incapacidad del derivado modificado de unir Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Asimismo, la presencia del azúcar durante la incubación con NEM protege a la enzima de la pérdida de inhibición por Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Por otra parte, la enzima modificada no presentó inhibición por exceso de sustrato y fue inhibida por  $K^+$ . Una comparación de otras propiedades cinéticas entre las enzimas nativa y NEM-modificada revela algunas diferencias (pH óptimo,  $K_m$  para  $Mg^{2+}$ ,  $K_m$  y  $V_{max}$  para Fru-1,6-P<sub>2</sub>,  $I_{0,5}$  para AMP), pero ninguna es tan notable como la completa pérdida de sensibilidad hacia Fru-2,6-P<sub>2</sub> de la FBPasa NEM-modificada.

Los datos demuestran que la interacción de Fru-2,6-P<sub>2</sub> con FBPasa es de naturaleza exclusivamente alostérica, punto que era controvertido. Además, indican que la inhibición por exceso de sustrato de la enzima nativa se debe a la unión del Fru-1,6-P<sub>2</sub> al sitio alostérico para Fru-2,6-P<sub>2</sub>.

(Financiado por: DID-UACH, S-85-26; FONDECYT, 1199).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE PROPIEDADES CATALITICAS DE GLUTAMATO DEHIDROGENASA DE TRYPANOSOMA CRUZI (Effect of temperature upon catalytic properties of glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*)

Burgos, C., Gerez de Burgos, N.M., Rovai, L. y Olcina, M. Cátedra de Química Biológica, Facultad de C. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

En nuestro laboratorio se demostró que las dos isozimas de  $\alpha$ -hidroxiácido dehidrogenasa de epimastigotes de *T. cruzi* son capaces de ajustar instantáneamente su actividad catalítica en respuesta a los cambios térmicos del ambiente. El efecto se evidencia por el hecho de que la eficiencia catalítica relativa (V/Km) se mantiene constante entre 10° y 30°C.

Se ha extendido el estudio a glutamato dehidrogenasa NADP dependiente (GlutDH), purificada de epimastigotes de cultivo. Con fines comparativos, hemos incluido la misma enzima obtenida de un poiquilotermo (vibora yarará) y de un homeotermo (pollo).

Para la enzima de ofidio, el aumento de la relación V/Km con la temperatura es significativamente menor que el que se observa con la enzima de homeotermo, lo que indica la existencia de mecanismos compensatorios en el poiquilotermo. Con la enzima obtenida de *T. cruzi*, la mayor eficiencia catalítica se observa a 20°C. Este efecto es debido a que la velocidad máxima es la misma tanto a 20° como a 30°C, con un ligero descenso de la Km a la temperatura menor. Entre 20° y 10°C el comportamiento es similar al del homeotermo.

Estos resultados sugieren que, al menos in vitro, la GlutDH de *T. cruzi* aparece dotada para funcionar con mayor eficiencia a 20° que a 30° y 10°C.

CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE TIROSINA PROTEIN QUINASA DE LINFOCITOS ACTIVADOS CON LECTINAS (Partial characterization of Tyrosine Protein Kinase from lectin-activated lymphocytes)

Rustamante, M., & Klempau, A. Depto. Biol. Molec. y Depto. Microbiol., Fac. Ciencias Biol. y de R.N., Univ. de Concepción. (Patrocinio: L. Sánchez).

La actividad de tirosina protein quinasa ha sido asociada al control de la proliferación celular.

Los linfocitos T, en presencia de fito-hemaglutinina sufren transformación blástica acompañada de un aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, sugiriendo que esta transformación conlleva un aumento de la actividad de tirosina protein quinasa.

La enzima fue investigada en linfocitos T activados con lectinas utilizando ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP y caseína como sustratos.

Se detectó actividad, se estudió el efecto de tiempo en la velocidad de reacción, el efecto de concentración de caseína y ATP, el efecto de concentración de  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  y su distribución intracelular.

En la curva de progreso se observa linealidad hasta los 30 min.  $Mg^{+2}$  y  $Mn^{+2}$  aumentan la actividad enzimática siendo  $Mn^{+2}$  el mejor activador. Los Km para caseína y ATP fueron 0.5 mg/ml y 10  $\mu$ M respectivamente. La mayor actividad se encuentra en la fracción correspondiente a membranas, presentando un 86.9% la fracción soluble en Tritón X-100 y un 13.1 la fracción detergente insoluble.

Financiado por la Dir. Inv. U. de C. a través del Proyecto de Tesis de Magister, Proyecto 20.36.01 y Depto. de Biol. Molecular.

CULTIVO DE EXPLANTES TISULARES II. GRADO DE LISIS Y SU PROTECCION POR EL ACIDO  $\delta$ -AMINOLEVULICO. (Tissue explants cultures II. Cellular lysis and the protection by the  $\delta$ -aminolevulinic acid). Buzaleh, A.M.; Navone, N.N. Schoua, A.E.M.; Vázquez, E.S.; Polo, C.F.; Afonso, S.G. y Batlle, A.M. del C.

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Se ha desarrollado un sistema de cultivo de tejidos que puede permanecer metabólicamente viable por un período de 48-72 horas (SAIB, 1985). Una de las importantes aplicaciones de este modelo es la posibilidad de determinar la toxicidad cutánea de un cierto compuesto y de investigar su mecanismo de acción. Además, se pueden emplear explantes de piel provenientes de distintas especies, lo cual hace posible la comparación de los resultados y la extrapolación de datos obtenidos en animales al hombre; para ello es necesario normalizar los valores teniendo en cuenta el grado de lisis de los tejidos.

Con el objeto de cuantificar la lisis celular se estudió la presencia de enzimas marcadoras citoplasmáticas y mitocondriales en los medios de mantenimiento de explantes de piel e hígado. Se detectó actividad de LDH pero no de GLDH. La aplicación de diversos tratamientos sobre los medios de mantenimiento (sonicación, concentración, etc.) o sobre los explantes (congelamiento y descongelamiento) sólo condujo a un incremento de actividad de LDH.

Se encontró que el ALA (0,8 mg/placa) ejercería un efecto protector disminuyendo la lisis.

Se definió el grado de lisis de los explantes como una función de la actividad de LDH en el medio de mantenimiento.

INTOXICACION POR CIANURO Y ACCION DE LA S-ADENOSYL METHIONINA - (Cyanide intoxication and the effect of S-Adenosyl Methionine). Buzaleh, A.M.; Vázquez, E.; Wider, E. y Batlle, A.M. Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porfirias-CIPYP (CONICET y FCEN, UBA).

Los efectos tóxicos provocados en los mamíferos por el cianuro son bien conocidos. Este compuesto ejerce su acción primaria inhibiendo la citocromo oxidasa (cit. ox.) y en menor grado otras enzimas como la aminolevulí codehidrasa (ALA-D), y se detoxifica por conversión a sulfocianuro en una reacción catalizada por la rodensasa (Rod.).

Se ha estudiado el efecto de la intoxicación aguda por cianuro sobre los metabolismos del azufre y del hierro, utilizando ratones a los que se le administró KCN en dosis variables (1-10 mg/kg), otro grupo recibió simultáneamente con el KCN, una dosis de 15mg/kg de S-Adenosyl Metionina (SAM); otro lote sólo recibió SAM y el grupo control el vehículo. A distintos tiempos (0-60 min) se sacrificaron los animales y se investigaron los niveles de cit. ox. Rod. y ALA-D, contenido de S lábil, SCN y tiosulfato en hígado y sangre.

En los animales intoxicados se observó disminución del 50% de Rod., del 30-60% de cit. ox. y del 20-25% del ALA-D y correspondiente aumento de CN en hígado. Los datos de S-lábil, SCN y tiosulfato no variaron con respecto a los controles. En sangre los cambios fueron menos marcados pero evidentes. En los animales intoxicados que recibieron SAM, la inhibición de las enzimas fue mucho menor a tiempos cortos y la recuperación más rápida, sugiriendo cierto efecto protector de este generador de tioles por la vía de su trans-sulfuración.

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LA FOTOSINTESIS DEL FITOPLANCTON ANTARTICO. (Some characteristics of photosynthesis in antarctic phytoplankton).

Cabrera, S.\* Montecino, V.# y Graf, M.E.\*

\*Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, # Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las fluctuaciones en la temperatura del aire en el territorio antártico, desde -70° a 5°C hace difícil el desarrollo de vegetación en este medio. En cambio en el agua varía solo entre -2° y 5°C. Aún más, en el mar la salinidad disminuye el punto de congelación del agua. Ambos aspectos son decisivos para que organismos fotosintetizadores colonicen preferentemente los ambientes acuáticos en esta región. A 63°S, las microalgas reciben un 56% menos de radiación total anual que a 34°S, sin embargo la Radiación Fotosintética Activa (R.F.A.) equivale solo a un 49% de este total en ambos casos.

Estudios orientados a conocer la fotosíntesis en estos ecosistemas acuáticos en verano demostraron que: 1) en cuerpos de agua límnicos la R.F.A. alcanza por lo general hasta el fondo, lo que favorece el desarrollo de fotosintetizadores bentónicos (Briófitas) que se presentan con gran densidad. Esto implica que la entrada de energía al ecosistema por las macrofitas, puede ser de igual o mayor importancia que por el fitoplancton. 2) En el ambiente marino: a) La penetración de la R.F.A. tiene relación inversa con la biomasa (Clorofila  $a$ ,  $Cl_a$ ) en los niveles superficiales del mar. b) Mientras menor es la cantidad de  $Cl_a$  en la columna eufótica, mayor es el carbono fijado por unidad de  $Cl_a$  (Productividad primaria específica), c) Las áreas con bajas biomasa fitoplanctónicas ( $Cl_a$ ) fijan una cantidad de carbono igual o mayor que otras donde la densidad fitoplanctónica es elevada. De acuerdo con estos resultados parece necesario revisar para las áreas oceánicas el concepto de pobreza y riqueza fitoplanctónicas.

ACCION DEL TAMOXIFEN EN LA PROLIFERACION CELULAR DE TUMORES MAMARIOS HUMANOS EN CULTIVO. (Tamoxifen action on cell proliferation of breast tumors in culture). G. Calaf, C. Moyano\* y E. Alvarez. 1.- Dpto. Biología, Universidad Metropolitana de Cs. de la Educación. 2.- Facultad de Medicina, División Sur; Stgo.

Modelos de estudio como aquellos llevados a cabo en animales de experimentación y líneas celulares introducen una herramienta útil para el estudio de los antiestrógenos. Tales sustancias inducen efectos directos en el tumor mismo, como en el sistema endocrino, el cual puede contribuir a la regresión tumoral. El propósito de este trabajo fue analizar la capacidad proliferativa de algunas hormonas y el tamoxifen en lesiones mamarias humanas en cultivo de órgano. Con este objeto, se usó 17 $\beta$  estradiol (0.05  $\mu$ g/ml) (E) y/o tamoxifen (0.05  $\mu$ g/ml) (T) como también progesterona (1.0  $\mu$ g/ml) (Prog.) para determinar viabilidad celular y síntesis de DNA de lesiones mamarias en cultivo de órgano.

Explantos derivados de tales tejidos fueron cultivados a 37°C (95% aire: 5%  $CO_2$ ) en un medio químicamente deficiente adicionado con hidrocortisona (1.0  $\mu$ g/ml) e insulina (5.0  $\mu$ g/ml) durante 2 y 5 días. Estudios histológicos se basaron en la viabilidad de las células, autorradiografía (índice de marcación) y actividad específica (incorporación de timidina tritiada en el DNA). Los resultados indicaron que no hubo efecto significativo en grupos tratados en comparación con los controles, después de 2 días en cultivo, cuando se analizó células del estroma, conducto y alvéolos como también síntesis de DNA. Sin embargo, hubo un efecto inhibitorio inducido por T o E más T ( $P < 0.05$ ) después de 5 días en cultivo, mientras que E tuvo efecto estimulador en lesiones malignas ( $P < 0.05$ ). Estudios con E señalaron que estimulaba la síntesis de DNA en tejidos derivados de lesiones con enfermedad fibroquística ( $P < 0.01$ ) y carcinomas de mujeres premenopáusicas ( $P < 0.05$ ), pero no tuvo efecto en carcinomas. Por otra parte, Prog. no tuvo efecto en lesiones benignas, pero inhibió tal síntesis en carcinomas derivados de mujeres premenopáusicas ( $P < 0.05$ ).

En conclusión, este sistema de cultivo nos permite predecir la respuesta de las lesiones mamarias ante diversos estímulos.

**APROXIMACION AL MECANISMO CINETICO DE LA ATP SINTETASA MITOCONDRIAL MEDIANTE EL EMPLEO DEL ANION INHIBIDOR BICARBONATO (Approach to the kinetic mechanism of the mitochondrial ATP synthase by means of the dead-end inhibitor bicarbonate).** Calcaterra, N.B. y Roveri, O.A. CEFÓBI (CONICET, Fund. M. Lillo y Universidad Nacional de Rosario), Rosario, ARGENTINA.

La  $H^+$ -ATPasa mitocondrial es la enzima responsable de catalizar la síntesis de ATP a partir de ADP y  $P_i$  a expensas de un gradiente electroquímico de protones generado a través de la membrana interna mitocondrial por el transporte de electrones desde el NADH o succinato al oxígeno.

Fueron realizados estudios cinéticos en un amplio rango de concentraciones de ADP (3 a 1000  $\mu$ M) y  $P_i$  (50 a 5000  $\mu$ M). En todos los casos se obtuvieron cinéticas bifásicas respecto de ambos sustratos.

La presencia de bicarbonato, anión activador de la hidrólisis de ATP ( $I_i$ ), no modificó la característica bifásica de las cinéticas si bien resultó ser un inhibidor de la síntesis de ATP, no competitivo respecto de  $P_i$  ( $K_i = 20$  mM) en todo el rango de concentraciones ensayadas, competitivo respecto de ADP ( $K_i = 7$  mM) a bajas concentraciones de ADP y mixto respecto de ADP ( $K_i = 20$  mM y  $\alpha = 3.5$ ) a altas concentraciones de dicho sustrato.

Estos resultados sugieren que el mecanismo para la síntesis de ATP correspondería a un mecanismo de Random Bi Uni o a un mecanismo Ordenado Bi Uni de tipo "subsiste" con el  $P_i$  como sustrato conductor.

1) Roveri, O.A. and Calcaterra, N.B. (1985) FEBS Lett. 192, 123-127.

Subsidiado por CONICET (Argentina).

**UN MODELO EXPERIMENTAL DE DESMINERALIZACION DE DENTINA PULPAR HUMANA.** (An experimental model of human pulp dentine demineralization). Calvo, V.F., Medina, M.E., Sánchez, U. Dpto. Ciencias Químicas y Físicas, Fac. Odontología, Universidad de Chile. (Patrocinante: Aida Traverso P.)

Se ha divulgado ampliamente la desmineralización de los conductos radiculares, mediante soluciones quelantes tales como EDTA a pH neutro. Sin embargo durante la reacción, la solución quelante se vuelve más ácida.

Previamente habíamos observado que la acidez del EDTA parece ser determinante de:

- La velocidad de desmineralización por EDTA,
- La velocidad de hidrólisis ácida del mineral del diente.

En este estudio intentamos comprender lo que ocurre en el diente mientras las condiciones de acidez del medio cambian. Se empleó como modelo experimental, una suspensión de hidroxiapatita sintética y se comparó con lo que ocurre en las cavidades pulpares de dientes humanos.

Se encontró que tanto la liberación de ácido como el consumo de EDTA son funciones exponenciales del tiempo, lo cual está de acuerdo con el concepto clínico odontológico de "capacidad autolimitante del EDTA". Este modelo permite explicar, porque la reacción tiende a detenerse antes de haberse agotado todo el quelante, como otros investigadores han determinado. También, permite diseñar modificaciones simples para aumentar la capacidad quelante y la rapidez con que actúa el EDTA en los conductos radiculares.

(Proyecto D.I.B. Q-2328-8613).

**PROTEOGLICANES DE MATRICES EXTRACELULARES DE LARVAS DE Drosophila.** (Proteoglycans from Extracellular Matrix of Drosophila Larvae). Cambiazo, V. y Brandan, E. Grupo de Neurobiología Molecular, P.Universidad Católica de Chile, Santiago.

Estudios recientes han establecido que los proteoglicanos (PGs) de matriz extracelular (ECM) están involucrados en adhesión celular y morfogénesis. En este trabajo se presenta la caracterización de los PGs de ECM como una primera etapa en la evaluación del papel que estas macromoléculas cumplen en el desarrollo de Drosophila.

Durante la diferenciación larval, la mayor incorporación de  $^{35}SO_4$  ocurre entre el 2º y 3er estado. 70% de las macromoléculas sulfatadas es sensible al ácido nítrico, lo que indica una predominancia de heparán sulfato. Los PGs fueron solubilizados con 4M guanidina-HCl, concentrados en Sephadex G50 y purificados en columnas de DEAE-Sephacel. La columna fue lavada con un gradiente lineal de NaCl y la mayoría de los PGs presentes fue eluido a 0.45M NaCl. Este material presenta una gran sensibilidad al ácido nítrico. Para establecer cuántos tipos de PGs estaban presentes, el material obtenido de DEAE-Sephacel fue fraccionado en columnas de Sepharosa CL-6B, lo que mostró la presencia de 2 especies con distinto peso molecular. Los resultados indican que las ECM de larvas de Drosophila poseen al menos 2 PGs de heparán sulfato.

En experimentos en marcha se está evaluando el efecto que tienen los  $\beta$ -xilósidos (interfieren con el ensamblaje del PG) en el desarrollo de Drosophila.

Financiado por proyectos DIUC (77/86) y Fundación Gildemeister al Dr. N.C. Inestrosa.

**ESTIMULACION AUDITIVA, DIFERENCIAS INDIVIDUALES Y REACTIVIDAD HEMISFERICA** (Auditory stimulation, Individual differences and hemispheric reactivity). Camposano, S., Etcheberrigaray, R. y Lolas, F. Unidad de Psicofisiología, Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Div. Cs. Médicas Norte, Universidad de Chile.

Para la pendiente de la función intensidad/amplitud del potencial evocado (PE) cortical, hemos estudiado distribución hemisférica, influencia de la modalidad sensorial sobre componentes tempranos y tardíos y relación con potenciales del tronco encefálico.

Se registró 16 Ss diestros, sexo masculino (edades 20 a 40) con electrodos subdérmicos en vertex, C3 y C4 referidos a mastoides bilateral. Se estimuló mediante clicks binaurais de 1 ms, freq. 1/seg, intensidades 50, 57 y 90 dB SL, amplificación y promediación mediante computador Nicolet CA 1000, tiempo de análisis 400 ms, filtro pasa banda 0-150 Hz, promedios de 100 estímulos. Se evaluó amplitud y latencia de componentes  $P_1N_1$ ,  $N_1P_2$  y  $P_2N_2$ , calculando pendientes intensidad/amplitud que fueron positivas en el vertex en la mayoría de los Ss para  $P_1N_1$  y  $N_1P_2$  y negativas para  $P_2N_2$  en 5 casos. Se observó correlación positiva (Spearman  $p < 0.001$ ) entre vertex y cada uno de los hemisferios en pendientes de los componentes  $N_1P_2$  y  $P_2N_2$ , ausente para  $P_1N_1$ . La pendiente intensidad/amplitud  $P_1N_1$  fue mayor en C3 que en C4 (Wilcoxon  $p < 0.025$ ). Al agrupar los sujetos según las pendientes  $P_2N_2$  en el vertex (positivos o negativos - aumentadores o reductores) la correlación entre vertex y derivaciones hemisféricas está ausente en el grupo de los reductores sólo en  $P_2N_2$ . No se observó correlación entre variables hemisféricas y potenciales del tronco.

Los resultados concuerdan con datos previos. En la modalidad auditiva hay raramente "reducción" en derivaciones centrales; el hemisferio izquierdo (C3) presenta pendientes mayores que el derecho. También sugieren la existencia de diferencias individuales, más acentuadas en el componente  $P_2N_2$ .

REGULACION DE LA PIRUVATO QUINASA DE GLANDULA MAMARIA DE RATA. (Pyruvate kinase regulation from rat mammary gland) Campos, E.O. \* Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. (Patrocinio: Dr. M. Sapag-Hagar).

La piruvato quinasa (PK) es una enzima regulable de la vía glicolítica. La isoenzima alostérica posee un control intracelular (fructosa-1,6-difosfato ó FDP, ATP, alanina y 6-fosfogluconato ó 6-FG) y un control extracelular por fosforilación-desfosforilación dependiente de AMP cíclico vía  $\beta$ -receptores, mecanismo de gran importancia en los tejidos gluconeogénicos.

Hemos establecido la existencia de dos isoenzimas de PK en la glándula mamaria de rata. Una de ellas, la de mayor actividad, se encuentra en las células epiteliales secretoras de la glándula, demostrada por cromatografías en sobrenadantes de homogenizados de las células aisladas. Estas células, aisladas por digestión enzimática controlada, son funcionales e incorporan  $^3\text{H}$ -leucina a caseína y  $^3\text{H}$ -uridina a RNA. Asimismo, demostramos que los  $\beta$ -receptores, ya caracterizados en glándula completa por nuestro Laboratorio, son también operables.

La isoenzima presente en las células epiteliales secretoras tiene un  $K_{0.5}$  de 0.35 mM para fosfoenolpiruvato y presenta cooperatividad + para FDP ( $K_{0.5}$  de 0.08 mM), es inhibida por ATP y alanina (entre un 40 y 50%) y 6-FG no afecta su actividad. Estudios en células aisladas y en cultivo de tejido de glándula completa, en presencia de isoproterenol (0.01 mM), toxina del cólera (0.15 ug/ml) ó forskolin (0.05 mM) no muestran efecto sobre la actividad de la enzima.

Se informa que la isoenzima presente en las células epiteliales secretoras de la glándula posee sólo regulación intracelular y no tendría, aparentemente, regulación por fosforilación, lo que confirmaría la escasa relevancia de la gluconeogénesis en la glándula mamaria.

(Proyecto B-2116-8623 de la Universidad de Chile, 1986). \*Financiamiento parcial por Beca DIB, U. de Chile.

MODIFICACIONES QUIMICAS ESPECIFICAS EN  $\beta$ -LACTAMASA DE *Shigella flexneri* UCSF-129. (Specific chemical modifications in  $\beta$ -lactamase from *Shigella flexneri* UCSF-129). Campos, M., Alarcón, M., González, H., Ríos, M. & Flores, H. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

Las  $\beta$ -lactamasas son producidas por más de 80 cepas diferentes y varían considerablemente en sus propiedades fisicoquímicas. Se caracterizan por hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de las penicilinas y cefalosporinas, generando compuestos bacteriológicamente inactivos; causa fundamental de la resistencia bacteriana a antibióticos. De ahí que, nos encontramos abocados al estudio del Centro Activo de  $\beta$ -lactamasa de *Shigella flexneri* UCSF-129, cepa patógena que presenta resistencia a la ampicilina; siendo periplásmica, la enzima producida. Esta se caracteriza por ser globular, constituida por una sola cadena polipeptídica de peso molecular 23.600 en 219 residuos a minoácidos. Cabe destacar, la presencia de 4 Tyr, 12 Ser, 1 Cys y 25 Pro; siendo Lys el amino ácido N-terminal y -Tyr-Gly-Lys-COOH, el fragmento obtenido con Carboxipeptidasa B. Mediante reacción con tetranitrometano y estudios de protección con el sustrato, se determinó que una Tyr estaría en la vecindad del Centro Activo.

Un residuo de Ser se modificó con ácido 6- $\beta$ -yodopenicilánico (1:2), inhibidor competitivo y altamente específico. La reacción se llevó a cabo a pH 7.5, por 5 min. a 25°C, con pérdida total de la actividad enzimática. Ser formaría un complejo acil-enzima, al igual que en la quimotripsina y en enzimas que intervienen en la síntesis de la pared bacteriana (e.g. transpeptidasas).

Se estableció que el residuo de Cys no era relevante en la actividad enzimática, al modificarlo con: Hg(II), DTNB, PMB, NTCB; en exceso considerable.

Nuestro objetivo final es sintetizar y diseñar el inhibidor específico que permita recuperar la acción terapéutica original de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Financiado por Proyecto Dirección de Investigación N°20.13.20, Universidad de Concepción.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Thiobacillus ferrooxidans* DEL NORTE DE CHILE RESISTENTES A ARSENICALES. (Isolation and characterization of *Thiobacillus ferrooxidans* arsenic resistant strains from northern Chile). Campos, G., y Olivares, H. Unidad de Bioquímica, Depto. Cs. Biológicas, Facultad Cs. de la Salud, Universidad de Antofagasta. (Patrocinio: I. Northland).

En la obtención de sales solubles de cobre, el proceso de lixiviación bacteriana tiene gran importancia para el país. Para poder aplicar este método a los minerales de baja ley de la zona norte contaminados con altos niveles de As es necesario contar con cepas de *T. ferrooxidans* resistentes al As para ello se aislaron a partir de plantas de lixiviación química cepas de *T. ferrooxidans*, las que se denominaron según su origen en MB y MI.

El crecimiento celular se siguió midiendo la D.O a 550 nm, por recuento celular y titulación  $\text{Fe}^{++}$  remanente en el medio de cultivo en presencia de o-fenantrolina. De crecimiento en medio sólido 9 K. a pH 3.0 se aislaron cepas isogénicas las que se utilizaron para su caracterización y estudiar la resistencia a distintos arsenicales. La caracterización se realizó por reacción de inmunodifusión en agarosa e inmunoprecipitación líquida analizando los inmunoprecipitados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Ambas cepas oxidaron el medio líquido a 9 K a pH 1.5 a 30°C y crecieron en presencia de  $\text{CuSO}_4$  hasta 6 g/l. La concentración del arsenical suplementado en el medio líquido osciló entre 50 y 1.000 ppm. Los resultados indicaron que ambas cepas crecen en presencia de As, siendo los más tóxicos  $\text{As}_2\text{O}_3$  y  $\text{NaAsO}_2$ , los que producen un considerable aumento en el período de retardo y disminución en el crecimiento celular, en cambio los compuestos que contenían As<sup>5+</sup> como  $\text{As}_2\text{O}_5$  y  $\text{NaHASO}_4$  fueron menos tóxicos.

FINANCIADO: DIXAT U. de Antofagasta. Proyecto S03-85.

RELACION ESTRUCTURA FUNCION DEL LIPOPOLISACARIDO Y ALGUNAS PROTEINAS DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*. (Structure and function relationship of the lipopolysaccharide and some proteins from the outer membrane of *Thiobacillus ferrooxidans*). Campos, S., Gómez-Silva, B. y Rodríguez, M. Lab. Microbiología, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El análisis de la estructura y composición de la superficie externa del quimolitótrofo *Thiobacillus ferrooxidans* es fundamental para entender su rol en el proceso de adherencia a minerales durante la biolixiviación.

El lipopolisacárido (LPS) fue purificado libre de ácidos nucleicos y proteínas, y fue analizado por microscopía electrónica y espectroscopía infrarroja, indicando su semejanza a LPS de enterobacterias gram (-), aunque su mayor contenido de lípidos le confiere un aspecto menos compacto al microscopio electrónico y su toxicidad es menor que el LPS de *E. coli*.

La membrana externa posee 5-6 polipéptidos de masa molecular menor a 60 KDa. El polipéptido de 40 KDa está presente en mayor proporción y sus características electroforéticas sugieren un rol de porina a esta proteína.

Estudios de adherencia a calcopirita usando LPS purificado de *Thiobacillus* indican que esta macromolécula se adhiere al mineral, a diferencia del LPS de enterobacterias. Estructuras como pili o mucopolisacáridos ácidos no parecen estar involucrados en este fenómeno.

Financiado por Grant PNUD-UNIDO CHI-85/002.

ROL DEL cAMP EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO. (Role of cAMP in heme biosynthesis regulation). Cáncopa, E. T., Llambías, E. B. C. y Grinstein, M. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Las porfirias hepáticas son enfermedades causadas por alteraciones en el camino biosintético del hemo y pueden ser producidas por ciertas drogas, entre ellas el fenobarbital. En base a resultados que presentamos anteriormente, fue necesario confirmar que existe una relación entre los niveles de cAMP endógeno y la inducción de actividades de enzimas reguladoras de la biosíntesis del hemo y contenido de citocromo P-450. Se utilizan hepatocitos de ratas normales y tratadas con estreptozotocina, preparados según Fry et al. (Anal. Biochem. 71, 341, 1976) y las mediciones se hacen según los métodos descritos por Cáncopa et al. (Biochim. Biophys. Acta 841, 186, 1985). La inducción mediada por fenobarbital de las actividades de ALA-sintetasa y ferroquelatasa, y del contenido de citocromo P-450, es mayor en hepatocitos de ratas diabéticas. El agregado de dibutiril cAMP potencia esta inducción sólo en hepatocitos de ratas normales. 3-metil-1-isobutilxantina y papaverina, inhibidores de la fosfodiesterasa, potencian la acción inductora del fenobarbital, sólo en hepatocitos de ratas normales. La adenosina, que es inhibidor de la proteinquinasa, inhibe parcialmente esta inducción en hepatocitos de ratas normales y diabéticas, indicando una posible fosforilación proteica responsable del efecto del cAMP. El 8BrAMP cíclico, análogo no metabolizable del dibutiril cAMP, potencia el efecto del fenobarbital sólo en hepatocitos normales, mientras que otras sustancias relacionadas, como el butirato de Na y el dibutiril cGMP no tienen efecto. El descenso de los niveles de cAMP endógeno por aloxano y/o imidazol disminuye la inducción mediada por fenobarbital. Estos resultados confirmarían el rol preponderante del cAMP en la regulación de la biosíntesis del hemo.

ALTERACIONES DE ESTEROIDES PLASMATICOS Y DEL TRANSPORTE OVULAR INDUCIDAS POR ESTRES EN LA RATA.- (Changes of plasma steroids and in ovum transport induced by stress in the rat). Cárdenas-Sankán, H. Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El estrés puede alterar el proceso reproductivo. Anteriormente demostramos que la inmovilización a 10° C por dos horas aplicada en los primeros 4 días de preñez no afecta el transporte ovular en la rata, y que la natación en agua fría (16° C) aplicada en el día 3 de preñez acelera discretamente el transporte ovular en dicha especie. Tratando de entender qué factores median esta diferencia medimos los niveles de corticosterona circulante (C) mediante HPLC con el propósito de verificar la efectividad de los estímulos estresantes usados, y también los niveles plasmáticos de estradiol (E<sub>2</sub>) y progesterona (P) mediante RIA en ratas estresadas y controles. Ambos estímulos produjeron importantes aumentos de la C, lo que confirma que fueron estímulos estresantes efectivos. La inmovilización en frío produjo un importante aumento de la P (300% sobre el nivel control), mientras que la natación en frío produjo aumento del E<sub>2</sub> (70% sobre el nivel control) sin cambios de la P.

Considerando que aumentos del E<sub>2</sub> sobre lo normal aceleran el transporte ovular en la rata preñada, y que aumentos de la P contrarrestan este efecto del E<sub>2</sub>, los resultados sugieren que la diferencia de efecto de estos dos estímulos estresantes sobre el transporte ovular podría estar mediada por las distintas alteraciones de esteroides que ellos inducen.

Financiamiento: DIUC 82/83 y RF 83016.

CAMP EXTRACELULAR EN ALGUNOS MODELOS DE HIPERTENSION. (Extracellular cAMP in some hypertension models). Carmona, M. T. y Becerra, M. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Cantidades variables de cAMP son vaciadas al fluido extracelular desde algunos tejidos sometidos a acción hormonal, las que mueven el "pool" libre y difundible de cAMP. Dentro de nuestra línea de investigación, y por el rol que cumple el cAMP, quisimos saber cuál es la situación de este nucleótido en algunos modelos experimentales de hipertensión crónica, a saber: contricción aórtica y Goldblatt 1 y 2.

Utilizamos ratas Sprague-Dawley hembras. La presión sistólica se midió en la cola por plethmografía. Las muestras de sangre se obtuvieron directamente de la aorta en animales anestesiados. La determinación de cAMP plasmático se hizo según Nastrup Madsen y col. (1975), técnica basada en la unión competitiva a proteína.

Los resultados indican un alza de la presión arterial al cabo de 4 a 5 semanas de tratamiento. Es una hipertensión de 150-190 mm Hg. Los niveles de cAMP en ratas hipertensas son más elevados (25 pmol/ml) que en ratas controles (19 pmol/ml). El stress quirúrgico por sí solo provoca un alza de cAMP plasmático (Gill y col., 1975), por lo que no se hace muy significativa la diferencia entre ratas controles e hipertensas.

El alza de cAMP plasmático observado en ratas con sobrecarga crónica de presión, sería un reflejo de la actividad hormonal que haría que se vacie probablemente desde el tejido cardíaco y/o desde el tejido vascular cAMP a la circulación, escapando a la acción de la fosfodiesterasa.

Trabajo financiado por proyecto N° 1131-CONICYT

FOSFORILACION DE FOSFATIDILINOSITOL POR VESICULAS DE TUBULOS TRANSVERSALES Y SU POSIBLE PAPEL EN ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION.

(Phosphorylation of phosphatidylinositol by transverse tubule vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling). Carrasco, M. A., Hidalgo, C., Magendzo, K., Jaimovich, E. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Centro de Estudios Científicos de Santiago.

Membranas aisladas de túbulos transversales de músculo esquelético de rana fosforilan fosfatidilinositol a fosfatidilinositol-4-fosfato y este último a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato cuando se usa [<sup>32</sup>P]ATP como sustrato.

Ambas reacciones de fosforilación se completan en 15 segundos a 25°C, son dependientes de Mg<sup>2+</sup> en el rango milimolar y son reguladas por Ca<sup>2+</sup>. La incorporación de <sup>32</sup>P en fosfatidilinositol-4-fosfato es máxima a concentraciones de Ca<sup>2+</sup> de 10<sup>-6</sup>M o menores, mientras que la incorporación en fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato aumenta significativamente a partir de 10<sup>-4</sup>M. Tetraacaina, un inhibidor del acoplamiento excitación-contracción, aparentemente inhibe la formación de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. Membranas aisladas de retículo sarcoplásmico forman fosfatidilinositol-4-fosfato con menor actividad que la membrana de túbulos transversales y no producen fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

Estos resultados muestran que las membranas aisladas de túbulos transversales poseen la capacidad de formar los precursores de inositol trisfosfato, posible mediador fisiológico del acoplamiento excitación-contracción.

Grants: HL 23007 de NIH/Muscular Dystrophy Tinker Foundation Inc. Assoc. DIB-2149 / DIB-2123

RELACION LLUVIA DE POLEN/VEGETACION EN CHILOE (Pollen rain in relation to vegetation in Chiloé). Carrillo, R. y Villagrán, C. Instituto de Botánica, Univ. Austral y Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, Univ. de Chile.

Con el propósito de evaluar la producción y dispersión de polen de los distintos taxa del bosque de Chiloé, se establece la relación polen atmosférico/vegetación circundante en la Cordillera de Piuchué, Isla Grande. Cada 50 m de altitud se coleccionaron muestras de musgos (utilizadas como captadores de la lluvia de polen) y se muestrearon 100 árboles. Para cada especie, se calculó la relación entre las frecuencias de individuos y las del polen contenido en los musgos (índices t/p).

Los resultados muestran los siguientes cambios a través del gradiente altitudinal: (i) Bajo 250 m de altura, el espectro de polen se caracteriza por la mayor importancia de los indicadores de bosque valdiviano, como *Gevuina/Lomatia* (hasta 41%), *Eucryphia/Caldcluvia* (h. 13%) y *Aextoxicon* (h. 12.5%); (ii) Entre 200 y 400 m el espectro se caracteriza por la dominancia de *Myrtaceae* (X 50%), en correspondencia con la composición del bosque nordpatagónico característico de este sector; (iii) Sobre 400 m, el espectro se caracteriza por la codominancia de *Nothofagus* (hasta 58%), *Saxo-gothaea* (h. 35%) y *Podocarpus* (h. 32%), taxa característicos de las cimas de la Cordillera. Los valores t/p muestran que en la lluvia de polen estarían sobrerrepresentados *Nothofagus*, *Podocarpus* y *Tepualia* (t/p < 1); equilibradamente representados *Drimys* y *Saxo-gothaea* (t/p = 1-5); y subrepresentados *Myrtaceae* y *Laurelia* (t/p > 5).

De la concordancia florística observada entre los espectros polínicos y las asociaciones forestales del gradiente estudiado, se desprende que el polen dispersado a larga distancia no constituye una contribución importante en la lluvia polínica del área. Sin embargo, la mayor producción de polen de las especies anemófilas, en comparación con las entomófilas, jugaría un rol importante en la mayor representatividad de estos taxa en el polen atmosférico local. (Proyecto DIB N2010/8635, C.V.).

DETERMINACION DE VELOCIDADES FRACCIONALES DE SINTESIS DE PROTEINAS Y LECTINA EN DISCOS DE PAPA. (Determination of fractional rates of protein and lectin synthesis in potato slices). Casalón, C.A. y Pont Lezica, R.

Instituto de Investigaciones Biológicas, Fac. Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata y Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA.

La lectina de papa es una glicoproteína presente en la pared celular, rica en hidroxiprolina. Estructuralmente es semejante a otras glicoproteínas constitutivas de la pared como las extensinas. En la actualidad se desconocen las funciones de la lectina, así como muchos aspectos ligados a la síntesis, glicosilación y secreción de la misma. En trabajos anteriores encontramos que la lectina es abundante en tubérculo y que los discos aireados de perénquima amiláceo eran capaces de sintetizar lectina. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la síntesis de lectina y otras proteínas en discos aireados, para determinar si la síntesis de la misma tiene la misma magnitud durante todo el tiempo de aireación o presenta óptimos bien precisos.

Para realizar las mediciones se procedió a saturar el pool de prolina con dosis masivas de L-[<sup>3</sup>H]prolina (50 mM), midiendo las velocidades iniciales de síntesis de proteínas totales y lectina a distintos tiempos de aireación por incorporación de radiactividad. Se determinó el contenido de Pro en las proteínas a los distintos tiempos y en lectina. El contenido de lectina se determinó inmunológicamente.

Los resultados indican que el contenido total de proteínas aumenta sólo un 9% en las primeras 36 h de aireación. La síntesis de proteínas totales tiene un máximo en las primeras 12 h de aireación, lo que representa un 19% de incremento sobre la velocidad inicial de síntesis. Por otra parte, si bien el contenido total de lectina no varió notablemente durante la aireación, su síntesis se aumentó un 76% con respecto a la velocidad inicial a las 36 h de aireación. Se concluye que el sistema de discos aireados es apropiado para el estudio de síntesis, glicosilación y secreción de lectina, dado que por tener una síntesis tardía, no se ve interferida por la síntesis de otras proteínas de la papa que ocurre en tiempos distintos.

Trabajo realizado con subsidios de CONICET y CIC.

CLONAMIENTO DEL GEN ESTRUCTURAL DE INVERTASA DE *NEUROSPORA CRASSA* POR EXPRESION EN LEVADURA (Cloning of the structural gene for invertase of *Neurospora crassa* by expression in yeast). Carú, M., Cifuentes, V. y Jiménez, A\*. Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, \*Centro de Biología Molecular, CSIC, UAM, Madrid, España. (Patrocinio: G. Pincheira).

La invertasa de *N. crassa* (B-D fructofuranosidasa-fructohidrolasa EC 3.2.1.26) es una glicoproteína que cataliza la hidrólisis del enlace B-fructosido en una variedad de sustratos, entre ellos la sacarosa.

El gen estructural de invertasa (inv) de *Neurospora* se clonó por complementación génica de la mutación *suc*<sup>0</sup> de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa MR17A). Para el clonado se utilizó una librería genómica construida en el plásmido de replicación autónoma de levadura (YRp7). El DNA genómico de la cepa silvestre de *Neurospora crassa* (74-A) se digirió parcialmente con la endonucleasa de restricción BamHI y los fragmentos resultantes se insertaron en el único sitio BamHI del plásmido vector.

De los clones transformantes de levadura *suc*<sup>+</sup> se aisló un plásmido recombinante (pNC-2) que posee un inserto de 7.6 Kb que hibrida con el DNA genómico de *Neurospora*.

Los transformantes de levadura *suc*<sup>+</sup> tienen actividad enzimática detectable y los ensayos inmunológicos indican la presencia de un péptido inmunoreactivo con suero anti-invertasa de *Neurospora*.

El plásmido recombinante transforma un mutante de *Neurospora* que carece de invertasa funcional (*inv*<sup>-</sup>). El análisis del DNA de los transformantes indica que el modo de transformación es recombinación homóloga.

ACTIVIDADES PROTEOLITICAS NEUTRA Y ACIDA EN HIGADO Y RIÑON DE RATONES EN DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO PROTEICO. (Neutral and acid proteolytic activities in liver and kidney from mice under different protein diets). Cassia, R.O., Sant'Iorenti, P.M. y Conde, R.D. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

El contenido proteico de hígado y riñón disminuye un 40% en animales alimentados sin proteínas durante 5 días. Al realimentarlos con una dieta completa recuperan rápidamente su contenido proteico normal. Esto se debe a una inhibición general de la proteólisis intracelular. La regulación de la capacidad proteolítica intracelular podría ejercerse al nivel de proteasas neutras (pH óptimo: 7.5) o al nivel de proteasas lisosomales (pH óptimo: 5.0). En este trabajo se analizaron las actividades proteolíticas neutra y ácida en homogenatos de hígado y riñón de animales controles, privados de proteínas y realimentados con dieta completa. El ensayo consistió en medir la hidrólisis de azocaseína. Se obtuvieron los siguientes resultados: la actividad a pH 5.0 fue la más alta en todos los casos. Asimismo esta actividad, por gramo de riñón, fue dos veces mayor que en hígado. Además, esta actividad proteolítica no se modificó en ambos órganos como consecuencia del tratamiento nutricional, especialmente en el riñón. En promedio, la actividad neutra por gramo de riñón fue cinco veces mayor que en hígado. Al realimentar los órganos no mostraron una franca recuperación de la actividad proteolítica neutra.

Los resultados obtenidos no permiten concluir que hay una correlación absoluta entre las capacidades degradativas *in vivo* y las actividades proteolíticas neutra y lisosomal de ambos tejidos. Sin embargo, llama la atención que las actividades neutras decaigan y no acompañen al proceso de recuperación del contenido proteico. Esto podría estar relacionado con la inhibición de la degradación que exhiben los órganos en recuperación.

Financiado por CONICET, CIC y FIBA.

**EXCRECIÓN DE AMONÍACO Y UREA EN ORINA DE ANUROS DE DIFERENTES HABITATS.** (Urinary ammonia and urea excretion in anurans of different habitats). Castañé, PM, Rovedatti, MG y Salibián, A. Universidad Nacional de Luján y Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Bs. As.

La mayoría de los batracios excretan por orina  $\text{NH}_3$  (A) y urea (U) y, en menor escala, ácido úrico (AU). Se acepta que el A predomina en larvas y adultos acuáticos, y la U en las especies terrestres. La presencia de AU está descripta en algunas especies sin haber una correspondencia con el habitat como en los otros casos. Se sabe que varios factores (estado nutricional, temperatura, estación, etc) inciden sobre el metabolismo proteico alterando el perfil de la excreción urinaria. Se ha evaluado el A y la U en la orina de cuatro anuros pre-adaptados a condiciones de humedad, temperatura y estado nutricional controlados: Bufo arenarum (peso  $27.9 \pm 2.5$  g; n: 24), B. granulatus (peso  $17.5 \pm 1.4$  g; n: 18), Leptodactylus ocellatus (peso  $50.5 \pm 4.2$  g; n: 19) y B. arunco (peso  $63.0 \pm 5.1$  g; n: 33); los primeros tres son terrestres, cavícola y semiacuático, y el último de los valles montañosos chilenos de la Cordillera Central. Las determinaciones de U y A fueron realizadas por la técnica de Fawcett y Scott (con y sin ureasa). Los resultados están en  $\mu\text{g-N/ml}$  y expresados como % del total de los productos medidos. Los % de N-U fueron: B. arenarum,  $96.0 \pm 0.5$ ; B. granulatus,  $95.6 \pm 0.7$ ; L. ocellatus,  $91.1 \pm 0.6$ ; B. arunco,  $95.0 \pm 0.5$ . Los valores absolutos de U y A mostraron gran variabilidad estacional pero al compararlos como % ellos resultaron homogéneos.

La diferente disponibilidad de agua en los habitats a los cuales pertenecen las especies estudiadas no se refleja en el perfil de su excreción nitrogenada.

**CONTRIBUCIÓN A LA LIMNOLOGÍA DE LAGUNA REDONDA, CONCEPCIÓN. UN SISTEMA EN EUTROFICACIÓN** (Contribution to the Limnology of Laguna Redonda Concepción. A system in process of eutrophication). Castro, H., Dellarossa, V. Lab. Limnología, Depto Botánica, Fac.Cs.Biol.y de Rec. Nat. U. de Concepción (Patrocinio: Irma Vila).

La Laguna Redonda, un pequeño lago dentro de la ciudad de Concepción ( $36^\circ 50' \text{ S}$ ,  $70^\circ 02' \text{ W}$ ) se encuentra en proceso de eutroficación por actividad cultural y recreacional. Se describe la morfología en Laguna Redonda y se discute su influencia en los ciclos biogeoquímicos para comprender su funcionamiento.

El estudio se realizó durante invierno-primavera de 1985. Para batimetría se usó un ecosonda. Los parámetros morfológicos, abióticos y bióticos se midieron según la metodología estándar. Los resultados indican: una profundidad de 17.75 m, un ancho máximo de 195 m, largo máximo de 210 m, un volumen de  $0,3 \text{ km}^3$  y una superficie de  $2,88 \text{ km}^2$ . La circulación es invernal, la  $\text{t}^\circ$ , el  $\text{O}_2$ , el pH y nutrientes se distribuyen homogéneamente. El fitoplancton está dominado por Microcystis aeruginosa. La estratificación distingue: un epilimnio con sobresaturación de  $\text{O}_2$ , la termoclina se presenta entre 5-7 m ( $3.5^\circ\text{C/m}$ ) un hipolimnio anóxico a profundidades mayores de 7 m. El fitoplancton está dominado por Peridinium willei. Las curvas clinografadas de  $\text{O}_2$  y pH sumadas a altos valores de nutrientes, sugieren un proceso en desarrollo de eutroficación.

**MODIFICACIÓN DE LA QUINASA PIRUVICA DE MÚSCULO DE CONEJO POR 8-AZIDO-1, N<sup>6</sup>-ETENO ADP.** (Modification of rabbit muscle pyruvate kinase by 8-azido-1, N<sup>6</sup>-etheno ADP). Castillo, Y., Wilkens, M., Salas, L., Schäfer, H.-J. y Bazaes S. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile e Instituto de Bioquímica, Universidad de Mainz, Alemania.

Con el objeto de marcar el sitio activo de la quinasa pirúvica de músculo de conejo (PK) se empleó el reactivo fluorescente de fotoafinidad 8-Azido-1, N<sup>6</sup>-eteno ADP ( $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$ ).

Al irradiar la enzima en presencia de  $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$  se produce la inactivación progresiva de ella, alcanzándose un valor máximo de inactivación que depende de la concentración de  $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$  empleada. Junto con la inactivación se produce la incorporación del reactivo fluorescente a la enzima. Se encontró una relación hiperbólica entre pérdida de actividad y concentración de  $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$ . Por extrapolación a concentración infinita del reactivo se obtuvo un 100% de inactivación.

Los nucleótidos ADP y ATP en ausencia y en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  protegen eficazmente a la enzima de la inactivación, no así la adenosina. El  $\text{Mg}^{2+}$  también produce buen efecto protector y el PEP casi no produce protección. La PK parcialmente inactivada presenta la misma Km para el ADP que la enzima nativa. La incorporación de  $^{14}\text{C}$ -8-azido ADP ( $\text{N}_3\text{ADP}$ ) a la PK nativa es de alrededor de 1 mol por subunidad de enzima; este valor se reduce proporcionalmente al grado de inactivación en la PK parcialmente inactivada por  $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$ .

Se concluye que el  $\epsilon\text{N}_3\text{ADP}$  actúa como reactivo de fotoafinidad, sobre la PK de músculo de conejo, de modo similar al  $\text{N}_3\text{ADP}$  empleado previamente.

Proyecto DIUC 90/85, P. Universidad Católica de Chile.

**PROPIEDADES DE LIPOSOMAS CONTENIENDO SULFOBROMOFTALEINA ENCAPSULADA.** (Properties of liposomes containing sulfobromophthalein entrapped) Catalá, A. y Zanetti, R.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) C.C. 403, (1900) La Plata, Argentina.

La sonicación de fosfolípidos en agua produce poblaciones uniformes de liposomas de bicapa simple (200Å) con un alto grado de curvatura, que afecta muchas de las propiedades físicas de los fosfolípidos en la vesícula. En el presente trabajo se estudiaron la formación y propiedades de liposomas unilamelares (1000Å). Liposomas de lecitina, conteniendo sulfobromoftaleína (BSP) encapsulada, fueron preparados a partir de lecitina y deoxicolato (1:2). La eficiencia de encapsulamiento de estas vesículas fue función de la concentración de BSP, alcanzando un máximo para una relación lecitina/BSP = 25. Las características espectrales de BSP en diferentes solventes ( $\epsilon_{\text{max}}$ ) relacionadas con la polaridad aparente del solvente (ET), indican que el entorno de BSP en liposomas corresponde a aquel del colorante en agua. Se observó liberación de BSP desde liposomas cuando estos fueron incubados con albúmina. El BSP liberado aparece asociado a albúmina cuando la mezcla es analizada por filtración a través de Sepharosa 4B. El BSP es también liberado de las vesículas cuando estas son incubadas con ácido oleico. Sin embargo la cantidad de BSP liberado fue mucho menor que la observada en presencia de albúmina. Estas vesículas parecen ser adecuadas como aceptores en estudios de transferencia de ácidos grasos entre membranas.

ATPasa de *T. cruzi*: MODIFICACION DE RESIDUOS DE CISTEINA POR ACCION DE RADICALES DEL O<sub>2</sub>. (*T. cruzi* ATPase: modification of cysteine residues by oxygen radicals). Cataldi de Flombaum, M.A. y Stoppani, A.O.M. Centro de Investigaciones Bioenergéticas y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Es sabido que especies moleculares generadas por reducción parcial del oxígeno, especialmente el radical OH<sup>•</sup>, producen la inactivación de numerosas enzimas, entre ellas la ATPasa mitocondrial del *Trypanosoma cruzi*. En trabajos previos se demostró que esta enzima posee arginina en el centro catalítico, como así también grupos SH de los cuales depende la actividad de la ATPasa. En el presente trabajo se realizaron cinéticas de inhibición a fin de localizar el sitio de acción de los productos de la reducción parcial del oxígeno generado por el sistema Cu-ascorbato. Se estudió el efecto de la inhibición, en forma conjunta, de radicales OH<sup>•</sup>, a concentración constante y de fenilgioxal (reactivo de argininas) a concentración variable. El análisis de los resultados por gráficos de Dixon (de 1/v en función de la concentración de inhibidor) dan como resultado inhibición lineal no competitiva, indicando que ambos inhibidores pueden afectar a la enzima simultáneamente, actuando a nivel de distintos residuos de aminoácidos. Resultados coincidentes se obtuvieron en condiciones de ATP-Mg variable ya que el análisis de los datos por gráficos de dobles recíprocas responde a inhibición del tipo no competitivo. El estudio de cinética de inhibición por concentraciones variables de p-cloromercuribenzoato y constantes de OH<sup>•</sup>, actuando simultáneamente, es del tipo competitivo, es decir que los dos inhibidores se excluyen mutuamente. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición producida por los productos de la reducción parcial del O<sub>2</sub> sobre la ATPasa se localizó a nivel de restos SH.

CARACTERIZACION DE DOS BACTERIOFAGOS RELACIONADOS A CAMBIOS EN LA SUPERFICIE CELULAR Y COMPETITIVIDAD DE *RHIZOBIUM MELLILOTI*. (Characterization of two bacteriophages related to cell surface changes and competitiveness of *Rhizobium meliloti*). Cavaignac, S., Coira, J.A. y Ugalde, H. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar y CONICET, Bs. As., Argentina.

En la cepa 102F51 de *R. meliloti* se han identificado dos fenotipos, caracterizados por diferente aglutinabilidad por aglutininas de alfalfa, competitividad y sensibilidad a los fagos 16B y F20. Estos bacteriófagos pueden ser usados para identificar cambios en la superficie celular y habilidad de nodulación de *R. meliloti*. Los mismos fueron caracterizados por microscopía electrónica, aislamiento del ácido nucleico, análisis con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel de poliacrilamida de sus proteínas. El fago 16B tiene cabeza icosaédrica de 58 nm de diámetro, cola de 100 nm de longitud y 6.1 nm de diámetro, DNA 2c de 50 Kb, dos proteínas mayoritarias de 39 y 16 Kd y otras siete minoritarias entre 14 a 140 Kd. El fago F20 tiene cabeza icosaédrica de 55 nm de diámetro, cola de 47,5 nm de longitud y 9 nm de diámetro, DNA 2c de 40 Kb, una proteína mayoritaria de 42 Kd y otras once minoritarias entre 12 a 98 Kd. Los estudios realizados indican que los fagos 16B y F20 son muy diferentes. De distintos suelos de alfalfares de la Argentina se han aislado fagos semejantes al 16B con respecto a su rango de huéspedes.

CORRIENTES IONICAS EN UNA LINEA CELULAR CARDIACA DE RATA ADULTA. (Ionic currents in an adult rat cardiac cell line). Caviedes, P. y Jainovich, E. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Una línea celular cardiaca fue establecida por nuestro laboratorio y se mantiene en cultivo permanente por tres años. Las células mantienen parámetros morfológicos diferenciados y bioquímicos organoespecíficos descritos previamente, tras dos meses de cultivo en medio definido con 0.5% de suero de bovino.

Mediante la técnica del patch-clamp, en configuración de registro en célula entera, se detectaron corrientes iónicas activas en 33% de los sellos establecidos. Con potencial controlado, se observaron corrientes de entrada de hasta 2.5 nA/cm<sup>2</sup> que se inactivan; seguidas de corrientes de salida de hasta 8 nA/cm<sup>2</sup> que no se inactivan.

Los potenciales de inversión de las corrientes de entrada se encuentran a +119 mV y +90 mV, con tiempos de activación promedio de 2.7 y 2.1 msec respectivamente. Algunas de dichas corrientes se abolieron en presencia de TTX 20 nM.

Estos hallazgos permiten establecer la persistencia de algunas propiedades de excitabilidad en esta línea celular.

Financiado por DIB Univ. de Chile B.2124, B. 2123 y Muscular Dystrophy Association.

GENOTOXICIDAD DEL ALCOHOL EN LA POBLACION CHILENA. UN ESTUDIO PRELIMINAR. (Alcohol Genotoxicity in the Chilean Population). Cea, G., Weigert, G., Aiarcón, M., Smith, C., Mena, M. y Venegas, W. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales Universidad de Concepción. Proyecto N° 20.31.14 DIC.

En Chile el alcoholismo es un problema de salud pública (5% de alcohólicos, 15% de bebedores excesivos). En 1973, Jones y Smith definieron la patología conocida como Síndrome Fetal Alcohólico (FAS), que demuestra el efecto teratogénico del alcohol. Mena *et al* (1984) encuentran en la Octava Región un 10.2% y 19.0% de prevalencia de FAS en escuelas especiales y hogares del SENAME, respectivamente. Un 18.0% de los niños con padres bebedores excesivos y madres abstemias presentaban signos parciales de FAS y bajo IQ.

Estos datos y los de otros autores, sugieren que el alcohol y/o sus catabolitos inducen mutaciones transmisibles en las células germinales humanas. Debido a esto se ha decidido investigar el daño genético inducido por el alcohol en alrededor de 200 grupos familiares clínicamente caracterizados, que presentan niños con FAS. El estudio comprende la determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos de los miembros de estas familias, tipificadas de acuerdo a sus patrones de ingesta alcohólica.

Los resultados de un estudio piloto preliminar, realizado en un grupo familiar tipo III (padre bebedor excesivo, madre abstemia e hijo con FAS), muestran una frecuencia de ICH por célula elevada en el niño con FAS (22.1) y en el padre (11.1) con respecto a la de los controles (7.6) (p= 0.01).

Este Proyecto forma parte de un proyecto multidisciplinario en relación al alcohol y sus efectos en la población chilena.

**INHIBICION DE HEXOQUINASAS POR UNA PROTEINA CITOSOLICA DEPENDIENTE DE FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO.** (Inhibition of hexokinase by a fructose-2,6-bisphosphate-dependent cytosolic protein). Cerpa, C., Niemeyer, H., Rabajille, E. y Acoria M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) inhibe la actividad hexoquinásica en el citosol de hígado de rata. Las hexoquinastas se miden espectrofotométricamente en el citosol filtrado por Sephadex G-25, con un sistema acoplado de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa de *L. mesenteroides* y NAD. La inhibición es función del volumen de citosol y de la concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub>. A concentración constante de citosol, el Fru-2,6-P<sub>2</sub> disminuye la velocidad máxima y el K<sub>0.5</sub> de la función de saturación con glucosa de la actividad hexoquinásica endógena total del citosol. El Fru-2,6-P<sub>2</sub> fue muy específico en su efecto, pues otros metabolitos no produjeron inhibición ni interfirieron en la inhibición por Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Las 4 hexoquinastas de mamífero (A, B, C, D) semipurificadas, así como la hexoquinasa de levadura, fueron inhibidas por Fru-2,6-P<sub>2</sub>, pero solo en presencia de citosol. El inhibidor citosólico es inestable y el Fru-2,6-P<sub>2</sub> fue un protector efectivo de su inactivación térmica. El inhibidor no fue retenido en DEAE-celulosa en condiciones en que las hexoquinastas de hígado son retenidas y precipitó entre 30 y 40% de saturación de sulfato de amonio. Por filtración en gel se estimó un peso molecular de 200.000. Se postula que el inhibidor es una proteína reguladora dependiente de Fru-2,6-P<sub>2</sub>.

Financiado por Proyectos del Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile, del Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología y de la Organización de los Estados Americanos.

**PATRONES DE RESISTENCIA Y ROL DE ACINETABACTER CALCOACETICUS COMO INTERMEDIARIO EN EL INTERCAMBIO DE INFORMACION GENETICA.** (Resistance patterns and role of *A. calcoaceticus* as an intermediary in the genetic information exchange). Chabauty, H., Montoya, R., \*Bello, H., \*Mondaca, M.A. y \*Zemelman, R. Departamento de Biología Molecular y \*Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

Cepas de *A. calcoaceticus* han sido aisladas de productos patológicos, de ambientes con y sin contaminación por coliformes de la zona de Concepción.

Las cepas presentan una elevada resistencia para antibióticos beta lactámicos (CMI > 256 mcg/ml), variable para aminoglicósidos (CMI: 2 - 1024 mcg/ml), mediana para sulfametoxazol, estreptomycin y cloranfenicol (CMI < 256 mcg/ml) y baja para tetraciclina y ácido nalidixico (CMI < 2 mcg/ml).

La investigación de plasmidios demuestra su presencia en sólo dos de las cepas estudiadas.

Experimentos de trasapaso de información genética:

- Conjugación con *E. coli* plasmidio RP 4, *S. flexneri* plasmidio UC 1.
- Transformaciones con el plasmidio pBR 322 y otros, de muestra la posibilidad de las cepas de *A. calcoaceticus* para actuar como intermediarios en el intercambio de información genética en ambientes contaminados principalmente por enterobacterias.

Se investiga la presencia de trasposones que expliquen la codificación de resistencia hacia antibióticos aminoclicósidos detectada en algunas de las cepas aisladas.

**FECONDACION Y REPRODUCCION EN EL ALCOHOLISMO EXPERIMENTAL** (Feundation & Reproduction in Experimental Alcoholism) Chala, E., Campana, I., Cruz, M.C., Rolfo, A. y Allier de F. Universidad de Chile-Facultad de Medicina; Instituto de Medicina Experimental. (Patrocinio: E. España). El alcohol (EtOH) y su derivado ALCHO producen alteración neurofisiopatológica y bioquímica en diversos órganos, SNC entre otros. Se ha diseñado modelos de alcoholismo experimental que nos enseñan mecanismos genéticos y otro en que opera la genotoxicidad. En nuestro Instituto se creó el alcoholismo permanente y generacional (AG rats): mecanismo genético. Rata Wistar normal y AG/25 (subcepa creada en nuestro Instituto bebe exclusivamente EtOH 25% durante 16 gener. Se empleó 11 y 12ava gener. 48 ♀ normal y 48 ♀ AG/25 cruzadas con ♂ normal y AG/25. Se estudió diariamente frotis vaginal ciclo estral; cruce en día fértil, preñes con el hallazgo de un espermio al frotis. Se controló neonatales y crías al destete. 4 grupos: 1. ♀ Normal y ♂ Normal; 2. ♀ AG/25 y ♂ AG/25; 3. ♀ AG/25 y ♂ Normal; 4. ♀ Normal y ♂ AG/25. **Resultados.** Los ciclos previos al cruce fueron irregulares y de mayor duración en AG/25 comparadas con control. Las ♀ AG/25 tuvieron mayor dificultad para preñarse en condiciones similares a sus controles, hecho que se potenció con ♂ AG/25, éste no fué determinante por sí sólo. Embarazo no se prolongó en el alc. materno y/o paterno. El materno y paterno redujo los implantes, sin diferencias con alcoholismo mixto y materno exclusivo. El paterno exclusivo indujo menor reducción. El N° de crías mortinatas y el N° de abortos no se afectó por el ♂ y/o ♀. El materno exclusivo es preponderante en la reducción de crías al destete. El alcoholismo paterno no influyó la viabilidad. Crías nacidas vivas fueron menos en ratas AG/25. **Conclusión:** El alc. materno: mayor efecto en reproducción, alterando los ciclos, dificultando el cruce (mayor N° de cruces en día fértil sin preñes). Presentó menor N° de implantes, de neonatales y viabilidad. El paterno también determinó alteraciones aunque menores. \* Alumnas-ayudantes-investigadoras.

**PARTICIPACION DEL COMPLEJO FERREDOXINA NADP REDUCTASA/PROTEINA DE UNION EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES FOTOSINTETICO.** (Involvement of ferredoxin-NADP reductase-binding protein complex in the photosynthetic electron transport chain). Chan, R.L., Soncini, F.C. y Vallejos, R.H. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET), F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario Suipacha 531, Rosario, Argentina.

Se ha demostrado que la ferredoxina-NADP reductasa está unida a la membrana tilacoide de cloroplastos de espinaca a través de un trómero de un polipéptido de 17.5 kDa que sentiría el gradiente protónico y se lo transmitiría a la reductasa [Vallejos y col. (1984) J. Biol. Chem. 254, 8048]. La reductasa es una enzima extrínseca regulada por luz, esto es, la luz aumenta la afinidad de la misma por sus sustratos naturales: ferredoxina y NADP [Carrillo y Vallejos (1983) TIBS 8(2) 52].

Se prepararon fragmentos Fab de IgG contra la proteína de unión (polipéptido de 17.5 kDa) de espinaca. Estos fragmentos inhiben el transporte de electrones lineal desde agua hasta NADP, probablemente impidiendo la formación del complejo ternario entre fotosistema I, ferredoxina y el complejo reductasa-proteína de unión.

La velocidad de inactivación es mayor cuando la incubación de las tilacoides con los Fab se hace en luz y en presencia de ferredoxina indicando que la generación del gradiente protónico producido por el transporte de electrones cíclico alrededor del fotosistema I, produciría un cambio conformacional en el complejo reductasa-proteína de unión aumentando la exposición de esta última a los Fab. Los Fab anti-proteína de unión inhibieron la fotofosforilación acoplada al transporte cíclico y este efecto dependió de la concentración de ferredoxina.

**APRENDIZAJE MONOCULAR CONFLICTIVO ENTRENANDO EN INVERSIÓN EL OJO IPSI O CONTRALATERAL EN LA RATA ALBINA** (Conflict learning in albino rats when a monocularly learned task is reversed with the ipsi or contralateral eye). Susana Aronsohn, Andrea Chellew, Humberto Guadagno y Teresa Pinto-Hamuy. Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Se ha considerado el sistema visual de la rata albina como equivalente al de un cerebro dividido por ser esencialmente cruzado (90% de fibras contralaterales) lo que induciría a una escasa interacción hemisférica. Se trató de demostrar conductualmente la relativa independencia de huellas mnémicas entre ambos hemisferios mediante la adquisición del hábito de inversión. Se entrenaron 3 grupos de ratas en una tarea de discriminación de triángulos (erecto vs. invertido): Grupo control binocular (n=6), Grupo ipsilateral monocular (n=7) y Grupo contralateral monocular (n=8). Todos adquirieron el hábito en un número semejante de ensayos y errores. En la tarea de inversión (se cambia el valor de refuerzo de los estímulos) se comparó el número de errores en la primera sesión. Las ratas entrenadas con el mismo ojo (ipsilateral) no se distinguen del grupo control en el sentido de que sistemáticamente responden al estímulo reforzado anteriormente. El grupo contralateral en cambio, no muestra claramente esta preferencia, siendo su rendimiento significativamente diferente al de los otros dos grupos (p<.05). Finalmente, en un test en que todos los sujetos se enfrentan binocularmente ante los mismos estímulos previos, sólo el grupo control elige sistemáticamente el último reforzado. Estos resultados sugieren una relativa independencia funcional de las huellas de memoria entre ambos hemisferios.

Financiado por el proyecto DIB 8-1903-8633

**ESTUDIOS SOBRE LA RESISTENCIA A TELURITO EN BACTERIAS DEL GENERO *Thermus***. (Studies on the resistance to tellurite in *Thermus* sp.). Chiong, M., Barra, R., Gonzalez, E., Vásquez, C. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Durante estos últimos años, nuestro interés se ha enfocado hacia el estudio de la expresión génica a altas temperaturas. Hemos escogido como modelo a *T. thermophilus* HBB y *T. flavus* AT62 y sus plasmidios respectivos pTT8 y pTF62. No ha sido posible adscribir un marcador genético a tales elementos extracromosomales, por lo que es necesario, mediante manipulación *in vitro*, incorporar algún gen marcador a tales plasmidios. Las especies mencionadas poseen resistencia a sales de telurio. Hemos iniciado experimentos tendientes a aislar y caracterizar este gen a fin de insertarlo en los plasmidios ya mencionados como un marcador genético. Paralelamente, hemos comenzado un estudio de la actividad enzimática responsable de tal resistencia la que hemos denominado telurito reductasa por su capacidad para reducir  $K_2TeO_5$  a  $Te^{0}$ , a expensas de la oxidación de NADH. El peso molecular determinado para esta enzima es de 50-55 Kdaltons. Su extraño comportamiento cromatográfico ha dificultado su obtención, aun cuando se ha logrado una purificación de 30 veces con respecto al extracto crudo. Hemos determinado algunas propiedades de la telurito reductasa, su  $T^o$  óptima fluctúa entre 65-75°C, su pH óptimo es 7,5, es inhibida completamente por NaCl 0,3 M y SDS 0,01%. Sin embargo, urea 1,5 M y Trisón-x100 3%, no afectan su actividad. Esta enzima pudiera estar relacionada con un mecanismo de resistencia general a metales pesados. Tal posibilidad crea una potencial aplicación biotecnológica al mecanismo de resistencia mencionado, especialmente en lo que se refiere a descontaminación de ambientes en que tales metales se encuentran presentes.

Financiado por DIB B2318 8613, IFS E/834-1 y Fondecyt 5035/85.

**MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y TRANSFERENCIA GENÉTICA EN CEPAS DE *Salmonella typhimurium***. (Antibiotic resistance and genetic transfer in *Salmonella typhimurium* Strains.) Cofré, G., Miranda, M., Morales, R. y Henríquez, V. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La resistencia múltiple a drogas se ha detectado en *S. typhimurium* en un elevado porcentaje (80-90%), en comparación a otras enteropatógenas. Se escogió un grupo de cinco cepas *S. typhimurium* aisladas de cuadros diarréicos infantiles con el fin de estudiar la resistencia a antibióticos y su posible mecanismo genético.

La aplicación de antibiograma a estas cepas reveló un patrón de resistencia similar y múltiple a los antibióticos: cloranfenicol, ampicilina, estreptomina, tetraciclina y kanamicina. La concentración mínima inhibitoria (CIM) para cada antibiótico fluctuó entre 125 a 250 ug/ml, a excepción de la resistencia a la ampicilina que alcanzó a valores superiores a 250 ug/ml. La similitud de estas cepas se confirmó al comparar sus patrones plasmidiales en geles de agarosa al 0.8%. En cada cepa se observaron, por lo menos, cuatro bandas de DNA plasmidial cuyos pesos fueron de: 116 Kb, 23,7 Kb, 8,6 Kb y 2,6 Kb.

La transferencia de estos plásmidos mediante conjugación con *E. coli* K-12, fue de baja frecuencia y el único marcador observado en las bacterias transconjugantes fue el de resistencia a la ampicilina. Resultados similares se obtuvieron al purificar el DNA plasmidial e introducirlo por transformación a *E. coli* HB101 y *S. typhimurium* LT<sub>2</sub>. Las transformantes fueron todas ampicilina resistentes y sensibles al resto de los antibióticos ensayados.

El origen genético de las otras resistencias observadas se atribuye a genes cromosómicos.

Financiado parcialmente por Proyecto FONDECYT 85/86

**MODIFICACION POR FLUORESCAMINA DE CANALES DE SODIO EN MUSCULO ESQUELETICO DE RANA**. (Modification of sodium channels in Fluorescamine treated frog skeletal muscle). Compagnon, D. y Liberona, J. L. Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La modificación de grupos amino primarios disminuye la afinidad por tetrodotoxina (TTX) de los receptores de membrana aislada de superficie (con mayor sensibilidad) y de túbulo transversal. Esto se ratificó usando fluorescamina a pH 7., condiciones en que otros marcadores de la membrana permanecen intactos.

Se estudiaron las corrientes de sodio (I<sub>Na</sub>) en fibra muscular cortada bajo potencial controlado, bloqueando las corrientes de salida con aspartato de TMA (120mM) intracelular. La corriente máxima (4 mA/cm<sup>2</sup>) es inhibida a un 50% por 1nM TTX.

El tratamiento con concentraciones bajas de fluorescamina (50 y 100  $\mu$ M) produce alteraciones menores en I<sub>Na</sub> sin producir corrientes de fuga. Se discute la posibilidad de que este tratamiento altere la sensibilidad del canal de sodio a TTX y a otras toxinas sin que varíen las propiedades de conductancia del canal.

Financiado por DIB, Univ. de Chile 2123, Muscular Dystrophy Association y NIH -GM 35981-01.

CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE LAS ZONAS DE CONTACTO ENTRE CELULAS DE LANGERHANS Y LINFOCITOS EN PROCESOS PATOLÓGICOS EXPERIMENTALES Y HUMANOS. (Ultrastructural analysis of the attachment between lymphocytes and Langerhans cells in experimental and human diseases). Concha, M., Figueroa, C.D. y Caorsi, I. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

La célula de Langerhans (CL) posee la capacidad de captar y presentar antígenos a linfocitos T, induciendo en éstos una respuesta inmunitaria. La presencia de zonas de contacto entre ambas células sería la expresión morfológica de esta función.

En este trabajo se describen las características ultraestructurales de estas zonas de contacto en dermatitis por contacto experimental con y sin tratamiento con colchicina, en cáncer cérvico uterino y micosis fungoides. Las muestras se fijaron en aldehídos,  $\text{OsO}_4$ - $\text{K}_4$  [Fe (CN) $_6$ ], con tinción de acetato de uranilo en bloque o en mezcla fijador-hidróxido de lantano. El análisis con microscopía electrónica de alta resolución reveló 3 tipos de contactos: a) puentes intercelulares, b) gliococalix-glicococalix y c) aposición de membranas con sellamiento del espacio intercelular. Aparecían asociados a estas uniones microfibrilares y el gránulo de la CL. En la dermatitis por contacto, colchicina en dosis de 10  $\mu\text{g}/20$  gr de peso produjo un aumento de los contactos CL-linfocitos, 24 y 48 hrs después de inyectada, sin modificar la estructura de las uniones.

Los resultados sugieren que estas estructuras de contacto representan interrelaciones transitorias producidas por modificaciones de la membrana plasmática, dependientes del citoesqueleto. Es posible que permitan el intercambio de señales o comunicaciones de una célula a otra.

Financiado por Proyecto S-85-16, Dirección de Investigaciones, U.A.CH. y Proyecto 1233/84 CONICYT.

EFFECTO DE POLIAMINAS SOBRE LAS QUINASAS DE FOSFATIDILINOSITOL Y FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE MEMBRANAS DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*. (Effect of polyamines on the activity of phosphatidylinositide kinases and cyclic nucleotide phosphodiesterases of *Xenopus laevis* oocyte membranes.) Connelly, C., Plaza, M., Carrasco, D. y Marinovic, B. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, y Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que polilisina (0.1-1 mM) y otras poliaminas estimulan notablemente la fosforilación de proteínas y la adenilato ciclasa presente en membranas de oocitos de *X. laevis*. Este hallazgo nos ha interesado en determinar si estos compuestos también pueden afectar a otras enzimas de membrana que pueden participar en la transducción de señales en dichos organelos. Se analizó la fracción lipídica obtenida por extracción con cloroformo-metanol ácido de membranas incubadas por 3 min con [ $^{32}$ P]ATP. En estos estudios se pudo establecer que la presencia de polilisina (25 lisina) (50-200  $\mu\text{M}$ ) causó un estímulo de 2 veces en la formación de fosfatidilinositol 4-fosfato y un incremento apreciable en fosfatidilinositol-4,5 difosfato. Copolímeros de lisina con alanina y serina y poliornitina mostraron efectos similares, pero histona H1 y poliarginina fueron menos eficientes. Un péptido sintético de 14 aminoácidos que contiene 8 lisinas y la secuencia carboxi terminal de la proteína oncogénica Ki-ras humana también estimula la fosforilación de fosfatidilinositol. Al ensayar la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos presente en las mismas membranas se pudo observar que polilisina (P.M.20.000), a concentraciones de 5 a 50  $\mu\text{M}$ , produce una inhibición de un 50% en la actividad de esta enzima. Estos resultados indican que polipeptidos ricos en grupos amino tienen un notable efecto sobre las membranas, modificando en forma diferente la actividad de enzimas presentes en estas membranas. [Trabajo apoyado por el DIB de la Universidad de Chile y OEA.]

CARACTERIZACION PARCIAL DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN FRACCION SOLUBLE DE CROMATINA DE HUEVO FECUNDADO DE ERIZO DE MAR *T. niger*. (Partial characterization of proteolytic activity in soluble chromatin fraction from fertilized sea urchin egg *T. niger*). Contreras, M. y Sánchez, L. Depto. Biología Molecular. Fac. Cs. Biol. y de Rec. Nat. Universidad de Concepción. Chile.

Se ha reportado actividades proteolíticas en fracción nuclear de huevo no fecundado y fecundado de erizo de mar *T. niger* y se ha sugerido que podrían desempeñar una función en la regulación de la expresión génica.

En este trabajo se informa de la actividad proteolítica en la fracción soluble de cromatina en NaCl 0.7M obtenida de huevos fecundados (cigotos 80 min). Degrada caseína-urea con un pH óptimo de 7 a 9. A pH 7.0 degrada selectivamente proteínas de la misma fracción, como también histonas de espermatozoides de la misma especie. La histona H<sub>1</sub> es más sensible a la degradación a 0°C y H<sub>2</sub>A y H<sub>4</sub> a 37°C.

El efecto de inhibidores de proteasas, sobre la degradación de histonas, fue: PMSF inhibió en forma parcial la degradación de todas ellas. ITPS inhibió parcialmente la degradación de histona H<sub>2</sub>A. TLCK inhibió parcialmente la degradación de histonas H<sub>2</sub>A y H<sub>1</sub>. TPCK inhibió la degradación de histona H<sub>1</sub> casi en su totalidad. Cuando la actividad que degrada H<sub>1</sub> es inhibida por TPCK ocurre una rápida degradación de histona H<sub>3</sub> y algo menos de histona H<sub>2</sub>B y H<sub>4</sub>.

Estos resultados indican la existencia de actividades proteolíticas tipo tripsina y quimotripsina y sugiere un rol regulador de esta última sobre la actividad que degrada histona H<sub>3</sub>.

Financiado por Proyecto 203108. U. de C.

FORMAS ENZIMATICAS DE LA DEAMINASA DE *Saccharomyces cerevisiae*. (Enzymic species of Deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*). Correa García, S. R., Rossetti, M. V. y Batlle, A. M. del C. Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias-CIPYP- (FCEN, UBA - CONICET).

La Deaminasa, proteína que cataliza la formación de 1 molécula de Uroporfirinógeno I a partir de 4 unidades de Porfobilinógeno (PBG), ha sido estudiada en numerosas fuentes, sin embargo existe muy poca información acerca de la misma en la levadura *S. cerevisiae*. En este trabajo se emplearon como fuente de enzima las cepas D27, normal en lo que a la síntesis de hemo se refiere y su mutante D27/C6, que se caracteriza por una elevada síntesis de citocromos como consecuencia probablemente de una anomalía enzimática a nivel de la Deaminasa (J. Mattoon, Univ. Colorado). En la mayoría de las fuentes estudiadas se encontró para esta proteína un único pico de PM 40000 con la única excepción de la enzima de *Euglena gracilis* para la cual se obtuvo además un segundo pico activo de PM 20.000. En este caso, sucesivos pasajes por Sephadex G-100 de la enzima de la cepa D27 parecería indicar la presencia de 2 picos de actividad cuyos PMs serían de 20.000 y 10.000; sin embargo, cuando se estudió la Deaminasa de la cepa mutante sólo se obtuvo un único pico activo de PM 20.000.

Además, teniendo en cuenta que para la enzima de otras fuentes se han detectado múltiples formas moleculares por cromatografía de intercambio iónico, cuyo origen no está aún totalmente esclarecido, se decidió estudiar el comportamiento de la enzima en un pasaje a través de DEAE-celulosa. Los perfiles de elución obtenidos para las dos cepas fueron diferentes según la enzima se eluyera en ausencia o presencia de su sustrato, obteniéndose en este último caso varios picos de actividad en la zona de alta fuerza iónica que no aparecían cuando la corrida se hizo en ausencia de PBG, sugiriendo por lo tanto la posible existencia de distintas formas enzimáticas que podrían corresponder a diferentes complejos E-PBG.

PURIFICACION DE LA UDP-N-ACETILGALACTOSAMINA: GM3 N-ACETILGALACTOSAMINIL TRANSFERASA DE CEREBRO DE EMBRION DE POLLO (Purification of UDP-N-acetylgalactosamine; GM3 N-acetylgalactosaminyl transferase from chick embryo brain). Cortassa S., Rosa A.L. y Maccioni H.J.F. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, CIQUIBIC, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

En estadios tempranos del desarrollo embrionario del sistema nervioso central de aves y mamíferos los gangliosidos mayoritarios son de cadena oligosacárida simple (GD3), mientras que en estadios avanzados lo son de cadena compleja (GD1a). Resultados de este laboratorio muestran que el cambio en el perfil de gangliosidos ocurre, al menos en parte, debido al aumento de la actividad GM3 N-acetilgalactosaminil transferasa. Esta actividad fue parcialmente solubilizada de microsomas de cerebro de embrión de pollo de 14 días por tratamiento con 0,5% Triton X 100, 0,64M sucrosa y sonicación extensiva. El extracto se llevó a 3% dodecilsulfato de sodio (SDS), se calentó 2 min. a 90°C y se cromatografió en Sephadex C 200 equilibrado en 0,1% SDS, 0,1M Tris, pH 7,2. La actividad en las fracciones se determinó luego de eliminar el SDS y renaturalizar la enzima en presencia de lípidos. El 60% de la actividad eluyó cerca del Vt con menos del 5% de la proteína sembrada. La electroforesis del extracto en geles de poliacrilamida en presencia de SDS permitió ubicar la actividad en dos regiones del gel de PM 30 y 90 kD. El producto de reacción de la enzima renaturalizada fue identificada como CM2 por criterios cromatográficos. La posibilidad de tener un gangliosido glicosil transferasa purificada permitiría iniciar estudios de su expresión a nivel molecular durante el desarrollo del sistema nervioso.

BIOTRANSFORMACIONES ESTEREOSELECTIVAS DE D,L-5-HIDANTOINAS SUSTITUIDAS A D- o L-AMINOACIDOS. (Stereoselective Bioconversions of D,L-5-substituted Hydantoin to D- or L-Aminoacids).

D. Cotorás\*, A. Möller, C. Syltatk y F. Wagner. Instituto de Bioquímica y Biotecnología, Universidad de Braunschweig, Alemania Federal. (Patrocinio: M.A. Valenzuela).

Acoplando reacciones enzimáticas a un proceso de síntesis química es posible introducir quiralidad en el producto deseado. Las 5-hidantoinas sustituidas racémicas son sustratos adecuados para una biotransformación, ya que pueden ser sintetizadas químicamente a bajo costo.

Se obtuvo los dos enantiómeros puros de diferentes aminoácidos, hidrolizando estereoselectivamente D, L-5-hidantoinas sustituidas, mediante dos microorganismos aislados de muestras de suelo.

La bacteria D-específica (cepa AM2) hidroliza D, L-5-metilhidantoina a N-carbamil-D-alanina y D-alanina. Las condiciones óptimas de la reacción completa, con células en reposo, fueron: pH 9,2 y temperatura 50-55 °C. La D-hidantoina y la D-carbamilasa son específicas D y tienen una amplia especificidad de sustrato.

La bacteria L-específica (cepa BH20) hidroliza D, L-5-indolimetilhidantoina a N-carbamil-L-triptofano y L-triptofano. Las condiciones óptimas de la reacción completa, con células en reposo, fueron: pH 7,5 y temperatura 27°C. Con células enteras, sólo la segunda reacción fue estereoselectiva y un grupo limitado de D, L-5-hidantoinas sustituidas fueron hidrolizadas a L-aminoácidos.

Se discute la aplicación industrial de ambas reacciones para la producción de aminoácidos ópticamente activos.

\* Dirección actual: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

CITOCROMO P-450 Y QUIMIOLUMINISCENCIA (QL) DE HIGADO DE RATA EN LA HIPOXIA HIPOBARICA CRONICA. (Chemiluminescence and Cytochrome P-450 of rat liver in chronic hypobaric hypoxia). Costa, L. y Boveris, A. Ininca, Iquifib (Conicet) Universidad de Buenos Aires.

Se ha postulado que el citocromo P-450 interviene en el transporte de O<sub>2</sub> intracelular en los hepatocitos y en la producción de radicales libres, procesos que tendrían relevancia en la hipoxia. El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de citocromo P-450 en el hígado y la velocidad de peroxidación lipídica mediante QL de la superficie del órgano "in situ" en la adaptación a la hipoxia hipobárica crónica. Se utilizaron 60 ratas de ambos sexos, la mitad de las cuales fueron sometidas a una altura simulada de 4.400 m o 5.500 m durante 2 a 11 meses en una cámara de hipopresión y el resto permanecieron a presión atmosférica ambiental. La QL se midió en ratas hembras mediante un contador de fotones. La emisión se expresa como cps/cm<sup>2</sup>. La emisión espontánea fue 25% menor en las ratas sometidas a hipoxia. C (control): 17.5 ± 1.3, H (hipoxia): 13.2 ± 1.2, p < 0.05. La QL inducida por administración i.p. de Cl<sub>4</sub>C fue 46% menor en las ratas hipoxicas. C: 55 ± 6, H: 26 ± 2, p < 0.01. El citocromo P-450 microsomal determinado espectrofotométricamente y expresado en nmol/mg de proteína, no mostró diferencias significativas por efecto de la hipoxia. Hembras, C: 0.98 ± 0.05, a 4.400 m: 0.89 ± 0.08, a 5.500 m: 0.98 ± 0.05. Machos, C: 1.27 ± 0.05, a 4.400 m: 1.32 ± 0.08, a 5.500 m: 1.42 ± 0.01. La estimación del contenido de retículo endoplásmico señaló una disminución del mismo en las hembras hipoxicas, por lo cual el contenido de citocromo P-450, expresado en nmol/g de tejido fue menor. C: 11.6 ± 1.3, H: 8.6 ± 0.6, p < 0.05. Los resultados no apoyan la hipótesis de un aumento del citocromo P-450 como mecanismo de adaptación a la hipoxia y sugieren que una disminución de su contenido, por disminución del retículo endoplásmico hepático, daría cuenta de la menor QL observada en los animales hipoxicos.

ESTUDIOS DE EXPRESION DEL GEN OMPF MEDIANTE TRANSFORMACION DE MUTANTES DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE E. COLI. (Transformation and expression of ompF gene in E. coli outer membrane protein mutants). Cotorás, M., Zaror, M. I., Imarai, H., Claude A., Gómez, I., Yudelevich, A. y Venegas A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Estudios previos han sugerido que el antibiótico carbenicilina sería transportado a través de la porina OmpF ya que mutantes seleccionados por resistencia a este antibiótico carecen de OmpF en la membrana externa. Para corroborar este planteamiento se estudió la expresión de ompF en distintos mutantes de proteínas de membrana externa.

Para esto se construyó un vector sin el gen de beta-lactamasa, por delección controlada en el sitio PstI de pBR327. En el gen CAF de este vector se incorporó un fragmento EcoRI aislado de pLF4 con el gen ompF de E. coli (vector pMC538). Con este plásmido se transformaron los mutantes W7NR, MC4104 y MC4105. W7NR parece ser un mutante regulatorio en que no se expresa OmpF, y OmpC se expresa escasamente. En cambio, MC4104 y MC4105 son mutantes de los genes estructurales ompC y ompF respectivamente. En ninguno de ellos se detectó actividad beta-lactamásica. Los transformantes se identificaron por el fenotipo Tet<sup>r</sup>, CAF<sup>+</sup> y por la presencia de pMC538. Se detectó la expresión del gen mediante análisis de las proteínas en geles poliacrilamida-SDS y por "Western blotting" con anticuerpos anti-porinas.

Luego de transformación con pMC538, W7NR bajó su resistencia a carbenicilina de 80 a 40 µg/ml observándose moderada expresión de OmpF. El mutante MC4105 transformado con pMC538, mostró sobreexpresión de OmpF, sin cambios significativos en sensibilidad a carbenicilina.

Se concluye que carbenicilina es transportada preferentemente por OmpF en W7NR.

\*Financiado por proyecto DIUC 81/86.

RELACION MIOSINA/ACTINA EN ACTOMIOSINA DE MERLUZA (*Merluccius hubbsi*) EN PRE Y POST - DESOVE. (Myosin/actin ratio in pre and post-spawned Hake (*Merluccius hubbsi*) actomyosin). Crupkin, M.; Montecchia, C.L. and Trucco, R. Centro de Investigaciones de Tecnología Pesquera (CITEP - INTI), Marcelo T. de Alvear 1168, (7600) Mar del Plata, Argentina.

Se cuantificó la relación miosina/actina de la actomiosina de merluza, a lo largo de su ciclo reproductivo. La determinación fotodensitométrica, luego de la electroforesis de la proteína en geles de SDS-Poliacrilamida 10%, reveló que el valor de la relación es  $1,50 \pm 0,27$  en la actomiosina de pescado capturado en pre-desove, y de  $2,59 \pm 0,60$  en la de post-desove. El perfil de la relación miosina/actina fue similar al del Índice Hepato Somático (IHS) a lo largo del ciclo reproductivo de la merluza, encontrándose una buena relación entre ambos parámetros ( $r = 0,804$   $P < 0,01$ ).

Estos resultados sugieren que la composición de la actomiosina de merluza es influenciada por su condición biológica.

Tratamiento enzimático del agua de cola de la industria de harina pescado en proteasas de Cucurbita Ficifolia (Enzymatic Treatment Stickwater from Fichmeal Industry with the Protease from Cucurbita Ficifolia). Curotto E., Aguirre C., Illanes A. y Shaffeld G. Instituto de Química y Escuela de Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso (Patrocinio: G. González).

Anualmente se procesan 2,5 millones de tt de agua de cola en la industria de harina de pescado. El proceso de evaporación del agua de cola es la etapa inicial en la obtención de la harina integral. Durante la evaporación, la viscosidad aumenta; entre los compuestos que favorecen este aumento están las proteínas. La elevada viscosidad del fluido produce varios problemas en la obtención del producto y en la industria. La utilización de proteasas permite obtener fluidos de menor viscosidad. El uso de estas enzimas podría bajar el costo de operación en la industria de harina de pescado. En este trabajo se utilizó proteasas de *C. Ficifolia* para analizar el efecto en la viscosidad del agua de cola y comparar los datos obtenidos con los de alcalasa 0.6L, proteasa importada.

Se utilizaron las proteasas precipitadas al 30% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en una relación enzima-sustrato 1:20. El método de ninhidrina se usó para cuantificar la hidrólisis del agua de cola en función del tiempo y de la temperatura. Se determinó la viscosidad del agua de cola hidrolizada en distintas etapas de evaporación.

Las mejores condiciones determinadas para la hidrólisis fueron temperatura  $60^\circ\text{C}$  y tiempo de reacción 1 hora. En estas condiciones presentan mayor actividad las proteasas de la *C. Ficifolia* que la alcalasa. La viscosidad del agua de cola hidrolizada disminuye en un 65% en relación a la no tratada, pero es mayor en un 20% a la viscosidad obtenida con alcalasa.

ROL DE PROTEINAS CITOESQUELETICAS EN LOS CAMBIOS DE FORMA DE CELULAS OXINTICAS DE AVE. (Role of cytoskeletal proteins in the changes in shape of avian oxyntic cells). Dabiké, M., Koenig, C. y Munizaga, A. Dpto. Biología Celular, Fac. Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El cambio morfofuncional que experimentan las células oxínticas durante la secreción de ácido clorhídrico (HCl), parece estar mediado por proteínas citoesqueléticas. La célula oxíntica de ave es un excelente modelo para estudiar el rol del citoesqueleto en este proceso de movilidad cíclica por tener un polo secretor prominente expuesto hacia el lumen glandular.

Se realizó un estudio comparativo de la estructura y localización inmunocitoquímica de miosina, filamina y filamentos intermedios (FI) en células oxínticas de ave en reposo y actividad. Se estableció que la célula oxíntica en reposo presenta una superficie lisa y canalículos intercelulares cortos. La estimulación determina la aparición de profundos canalículos intercelulares, llenos de prolongaciones citoplásmicas ricas en microfilamentos, generados por desplazamiento de los complejos de unión hacia el tercio basal de la célula. La inmunofluorescencia mostró que en glándulas en reposo, miosina, filamina y FI forman un anillo adyacente al lumen glandular, el cual se desplaza hacia el tercio basal como resultado de la estimulación. En ambos estados funcionales miosina y filamina se distribuyen difusamente en el resto del citoplasma mientras que FI forman una red que se proyecta desde el anillo hacia la base de la célula.

Se concluye que el desplazamiento de los complejos de unión y del anillo citoesquelético mediarían la formación de los canalículos intercelulares. La reorganización ultraestructural sería consecuencia de cambios en la distribución e interacciones entre FI, actina y proteínas asociadas.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN *R. SPHEROIDES* SH. (Regulation of the nitrate reductase activity in *R. Sphaeroides* SH). De Castro, R., Kerber, N.L., Massuco, S.V. y García, A.F. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

En algunos procariontes fototróficos el nitrato es reducido a través de un camino disimilatorio permitiendo el crecimiento en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno. También existe una aparente actividad de tipo disimilatorio. En este trabajo se investiga el posible rol de la reducción de nitrato en *R. Sphaeroides* SH que a pesar de tener esta capacidad enzimática no puede asimilar nitrato durante su crecimiento.

Los resultados que se presentan indican que en este procarionte fototrófico la reducción de nitrato está parcial y simultáneamente regulada por:

- disponibilidad de espacio físico para su inserción en la membrana citoplasmática.
- variaciones en la disponibilidad de poder reductor, lo que regularía la cantidad de electrones que se canalizan a través de la nitrato reductasa.
- potencial electroquímico de las células, que nos ha permitido conjeturar que bajo condiciones de crecimiento limitado por una menor producción energética, el nitrato es reducido de una manera disimilatoria para contribuir a los requerimientos del metabolismo general.

A pesar de algunas diferencias entre la expresión "in vivo" e "in vitro" de la enzima, solamente ha sido posible detectar una única actividad mediante geles de electroforesis no disociantes.

Financiado por CIC y CONICET.

POSFOSFORILACION ENDOGENA DEL RECEPTOR COLINERGICO NICOTINICO, PROTEINAS NO RECEPTORAS Y POSFOLIPIDOS EN LA MEMBRANA POSTSINAPTICA. A.M.R. de Fernández, I.C.B. de Romanelli y F.J. Barrantes; Instituto de Investigaciones Bioquímicas, UNS/CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

Varios tipos de proteína quinasa han sido caracterizadas en la membrana postsináptica de órgano eléctrico, rica en receptor colinérgico (AChR), que fosforilan las subunidades del mismo y proteínas no receptoras. Se conoce poco acerca de quinasa semejantes que actúan sobre los lípidos de tales membranas, en analogía a lo que ocurre en otros sistemas quimioexcitables. Membranas enriquecidas en AChR (*T. marmorata*) fueron incubadas con ATP- $\gamma$ - $^{32}$ P en medios apropiados para determinar la incorporación del radioisótopo en lípidos y proteínas. En los primeros, alrededor del 95% de la marca se concentra en los polifosfoinosítidos, constituyentes minoritarios de estas membranas. En presencia de  $Ca^{2+}$  y calmodulina la fosforilación se ve marcadamente inhibida, especialmente a nivel de PIP. Tratamiento de las membranas con NaOH produce la depleción de proteínas periféricas e inesperadamente, la extracción de fosfolípidos, en particular PIP y PIP<sub>2</sub>. Cuando se marcan electrocitos de *D. tschudii* con  $^{32}$ P más del 70% de la radioactividad se incorpora a fosfolípidos ácidos, que es co-extraída por el tratamiento alcalino. Por otra parte, cuando se compara el perfil de membranas nativas ricas en AChR con aquellas deplecionadas de proteínas periféricas se evidencia fundamentalmente la disminución de la fosforilación de las proteínas de 43 KDa (v) conjuntamente con una apreciable disminución de la marcación de la subunidad  $\gamma$  ( $M_r$  56000) del AChR. Esta subunidad es sustrato de dos proteínas quinasa: la AMP dependiente y una tirosina quinasa. Si bien la co-extracción de proteínas periféricas no receptoras y ciertos lípidos no permite afirmar la existencia de relaciones estructurales entre ambos en la membrana nativa, los resultados sugieren 1) la posibilidad de tal asociación *in situ* y 2) la unión laxa a la membrana de proteína quinasa cuyos sustratos incluyen proteínas no receptoras y la subunidad  $\gamma$  del AChR.

SOBREVIVENCIA DE EMBRIONES DE *CHOROMYTIUS CHORUS* (MOLL. BIVALVIA) DESPUES DE HABER SIDO CONGELADOS Y DESCONGELADOS. (Survival of *Ch. chorus* (Moll., Bivalvia) embryos after freezing and thawing). Del Campo, M.R., Gallardo, C.S., Leal, P. y Filón, L. Instituto de Reprod. Animal e Inst. de Zoología, UACH.

Las técnicas de congelación de embriones, aplicadas en mamíferos, han abierto un campo ilimitado de investigación en otro tipo de animales. Aparte de su importancia científica, la ventaja de estos estudios radica en su aplicación práctica.

El presente estudio se realizó para determinar si embriones de *Ch. chorus* sobreviven tras haber sido congelados/descongelados. Los embriones fueron colocados sucesivamente en 4 soluciones crecientes de glicerol y agua de mar. En seguida fueron envasados en pajuelas de plástico de 0,5 ml de capacidad en la solución de equilibrio (1,4 M de glicerol) y posteriormente enfriados a 1°C/min desde 6°C a -7°C, y a 0,3°C/min hasta -35°C. A esta temperatura fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados por más de 15 días. Después de la descongelación los embriones recuperados fueron sometidos a soluciones decrecientes del crioprotector y agua de mar y posteriormente cultivados por 48 hrs. Se observó que un porcentaje significativo (sobre 80%) de los embriones recuperados y llevados a cultivo, continuaron su desarrollo alcanzando estados larvales. Estos resultados preliminares demuestran que la técnica de congelación usada puede ser aplicada con éxito en la preservación de embriones de esta especie.

Subvencionado por Dirección de Investigación UACH. Proyecto RS-83-4 y por la Agencia Internacional de Cooperación de Japón (JICA).

TRIPANOSOMATIDOS: MUTANTES NATURALES DE LA N-GLICOSILACION DE PROTEINAS (Trypanosomatids are natural mutants in protein N-glycosylation) de la Canal, L. y Parodi, A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

La N-glicosilación de proteínas involucra la transferencia de Glc<sub>3</sub>MangGlcNAC<sub>2</sub> del derivado de Dolicol-P-P (Dol-PP) a la proteína. El Dol-P-P-GlcNAC<sub>2</sub>MangGlc<sub>3</sub> se sintetiza por adición de residuos de monosacárido de manera única y ordenada. En todos los tripanosomátidos estudiados en nuestro laboratorio el oligosacárido transferido a proteínas "in vivo" a) no contiene Glc y, b) el número de manosas varía entre 6 y 9 según la especie. Aquí se estudia la síntesis de Dol-P-P-oligosacáridos en sistemas libres de células con el objeto de caracterizar las deficiencias observadas "in vivo".

Se muestra que la ausencia de Glc en el oligosacárido transferido se debe a la falta de la actividad que sintetiza Dol-P-Glc (dador de restos glucosilo) en todas las especies estudiadas. Estos tripanosomátidos sintetizan Dol-P-Man pero difieren en su capacidad de síntesis de Man<sub>5-8</sub>GlcNAC<sub>2</sub>-P-P-Dol; cuando se incuban membranas de parásitos con GDP-Man( $^{14}$ C), Dol-P y una mezcla de Man<sub>5-8</sub>GlcNAC<sub>2</sub>-P-P-Dol frío como sustrato se observa que *T. cruzi* (in vivo sintetiza Man<sub>7</sub>GlcNAC<sub>2</sub>) tiene todas las actividades de manosiltransferasa. *C. fasciculata* y *L. enriettii* (in vivo Man<sub>7</sub>GlcNAC<sub>2</sub>) no tienen actividad de transferasa 8 y 9. *B. culicis* (in vivo Man<sub>6</sub>GlcNAC<sub>2</sub>) no tiene las transferasas 7, 8 y 9.

Se concluye que los tripanosomátidos son mutantes naturales de la N-glicosilación de proteínas.

EFFECTOS DE L-GLUTAMATO SOBRE LA SECRECIÓN DE  $^3$ H-NORADRENALINA Y LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL CONDUCTO DEFERENTE DE RATA. (Glutamate effects on  $^3$ H-noradrenaline release and contractile activity of the rat vas deferens). Del Villar, M., Peirano, A. y Lara, H. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

L-glutamato (L-glu), neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central, puede actuar como neuromodulador de las neuronas catecolaminérgicas. Aún no se ha estudiado la participación de L-glu como modulador en sistema nervioso periférico. En este trabajo se estudió el efecto de L-glu sobre la secreción de  $^3$ H-noradrenalina ( $^3$ H-NA) y sobre la actividad contractil del conducto deferente de rata.

La secreción inducida por  $K^+$  65 mM de  $^3$ H-NA recién captada, aumenta en un 30% cuando se estimula en presencia de L-glu  $10^{-6}$ M. La secreción espontánea de  $^3$ H-NA es inhibida en un 30% por Glu  $10^{-6}$ M, este efecto es menor cuando se estudia a  $10^{-5}$  M y desaparece a concentraciones de  $10^{-4}$  M. Fracciones de membrana aisladas por centrifugación diferencial de homogeneizados de conducto deferente, presentan unión de alta afinidad para L- $^3$ H-Glu. La unión máxima es un 20% de la obtenida en membranas aisladas desde el ganglio periférico en donde se originan las neuronas adrenérgicas que inervan el conducto deferente. La adición de NA a una preparación de conducto deferente evoca una respuesta contractil dependiente de la dosis. L-Glu en dosis equimolares induce contracciones cuya magnitud es un 10-20% de las obtenidas con NA. Este efecto no aparece al agregar L-Glu junto con NA al baño de incubación.

Estos resultados sugieren que L-glu puede actuar como neuromodulador de la actividad contractil del conducto deferente actuando sobre los terminales noradrenérgicos. No se descarta la posibilidad de una posible inervación glutamatérgica en el órgano.

REGULACION POR GLUCOCORTICOIDES DEL SISTEMA  $\beta$ -RECEPTOR-ADENILATO CICLASA DE GLANDULA MAMARIA DE RATA. (Glucocorticoids regulation on  $\beta$ -receptor-adenylate cyclase system from rat mammary gland). Depix, M.S. y Sapag-Hagar, M. Dpto. Cs. Biológicas, Fac. Cs. de la Salud, U. de Antofagasta y Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Resultados recientes, obtenidos en nuestro Laboratorio, indican que los glucocorticoides (GCs), tales como la hidrocortisona (Hc), no afectan el N° de receptores  $\beta$ -adrenérgicos mamarios en ratas adrenalectomizadas (ADX), pero sí se observan aumentos significativos en los niveles intracelulares de AMP cíclico (AMPC). Este efecto de los GCs podría estar relacionado con la proteína Ns ó con la adenilato ciclasa (AC) del sistema  $\beta$ -adrenérgico. Células de neuroblastoma, *in vitro*, han permitido establecer que los GCs potencian la formación de AMPC, actuando sobre la AC (subunidad catalítica) sin alterar el N° de receptores.

Ahora estudiamos el efecto de la Hc en glándula mamaria de ratas ADX, sobre el sistema proteína Ns-adenilato ciclasa.

Se evaluó *in vivo* e *in vitro*, en células epiteliales aisladas de la glándula y en cultivo de tejido (36 horas), el efecto de la Hc (*in vivo* 1 mg/Kg peso; *in vitro* 1  $\mu$ g/ml) en los niveles intracelulares de AMPC basales y estimulados por  $\beta$ -agonistas, toxina del cólera y fluoruro (proteína Ns), y forskolin (AC) y también al bloquear los receptores  $\beta$ -adrenérgicos con propranolol.

Nuestros resultados indican que, probablemente, la acción de los GCs podría estar relacionada con una mayor interacción receptor-proteína Ns y/o proteína Ns-AC, o bien una mayor actividad funcional de la proteína Ns o de la AC, debido a que se observan aumentos en los niveles de AMPC en presencia de Hc en ratas ADX, sin variar el N° de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ni la actividad de la AMPC-fosfodiesterasa en la glándula.

(Proyecto B-2116-8623 de la Universidad de Chile, 1986).

INTERACCION DE ALCOHOLES ALIFATICOS CON EL TRANSPORTADOR DE COLINA DE ERITROCITOS HUMANOS. (Interaction of aliphatic alcohols with the choline carrier of erythrocytes). Devés, R. y Cáceres, J. Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. Medicina, U. de Chile y Depto. Biología, Fac. Medicina, U. de Valparaíso.

El transportador de colina a través de la membrana del glóbulo rojo ocurre por medio de un transportador que oscila entre dos estados conformacionales e involucra, por lo tanto, al menos una etapa de reorganización de la proteína. Una forma de investigar la naturaleza del cambio conformacional es mediante el uso de inhibidores que interfieren a este nivel.

En este trabajo demostramos que el transportador es inhibido reversiblemente por alcoholes alifáticos sin que estos afecten la etapa de reconocimiento del sustrato. Esto sugiere que su efecto se debe al bloqueo del cambio conformacional responsable de la translocación. En una primera etapa, hemos caracterizado el mecanismo de inhibición utilizando una serie de alcoholes de cadena recta de 2 a 10 átomos de carbono. To dos inhiben el sistema en forma no competitiva y con una dependencia de la concentración compleja (coeficiente de Hill 1,6-1,9). La dosis requerida para inhibir en un 50% ( $I_{50}$ ) decrece a medida que aumenta el número de carbonos, existiendo una relación lineal entre el  $\ln I_{50}$  y el número de átomos de carbono. Esto sugiere la existencia de un mismo sitio de acción. La inhibición es simétrica afectándose por igual el movimiento en una y otra dirección. Los alcoholes difieren sin embargo, en su capacidad para exponer un grupo sulfhidrilo susceptible a modificación por N-etilmaleimida.

Proyecto B 1540-8355 DIB. (U. de Chile).

EFFECTO DEL DIETILPIROCARBONATO, REACTIVO K DE WOODWARD Y PICRILSULFONATO SOBRE LA ACTIVACION DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE CLOROPLASTOS MEDIADA POR ANIONES CAOTROPICOS. (Effect of diethylpyrocarbonate, Woodward's K reagent, and picrylsulfonate on the chaotrope-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase). de Prat Gay, Gonzalo y Wolosiuk, Ricardo Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

Los aniones caotrópicos estimulan la actividad específica de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) de los cloroplastos. En todos los casos los cambios en las propiedades cinéticas no implican una modificación del peso molecular de la enzima. En el presente estudio se analizaron los efectos que sobre el proceso de la activación tienen reactivos específicos de grupos histidilo (dietilpirocarbonato), carboxilo (reactivo K de Woodward), y amino (picril-sulfonato).

La preincubación de la FBPasa con dietilpirocarbonato o con el reactivo K de Woodward previa a su activación con moduladores, provoca una disminución de la actividad específica; la presencia de ditiotreitol o fructosa 1,6-bisfosfato en dicha preincubación previene parcialmente tal inhibición. El agregado de dietilpirocarbonato o reactivo K de Woodward a la enzima activada no influye en su actividad. El tratamiento de la FBPasa nativa con picrilsulfonato no afecta el proceso de activación; por el contrario este reactivo disminuye la actividad específica de la enzima activada.

Los resultados obtenidos indican que a) la exposición de varios residuos de aminoácidos es modificada por la activación de la FBPasa, y b) algunos son esenciales para el proceso de activación, en tanto otros lo son para la catálisis

EFFECTO DE MOLECULAS ANFIFILICAS SOBRE ESPERMATOZOIDES DE ANFIBIOS. (Effect of amphiphilic molecules on Amphibian Spermatozoa). Díaz Fontdevila M., Cabada M., Bloj B. INSIBIO (UNT-COINICET) Fac. Bioq. Qca. y Farm. Tucumán, Argentina.

En estudios previos (XIV Reunión Anual de SAB, Rosario, Argentina, 1985) se comunicó que cuando se compara el efecto de Fosfatidilcolinas (PCs) de distinta longitud de cadena ( $C_{10}$  a  $C_{18}$ ) sobre la capacidad fecundante de espermatozoides de *Bufo arenarum*, la Didecanoil-PC ( $C_{10}$  PC) resulta la más efectiva. En el presente estudio se establece que PCs de cadena más corta ( $C_6$ ,  $C_7$  y  $C_8$ ) resultan menos efectivas que  $C_{10}$  PC. A una concentración de 0,01  $\mu$ moles/ml  $C_{10}$  PC provoca una completa inhibición a los pocos segundos de agregada a la suspensión de espermatozoides, mientras a esa concentración ninguna de las otras PCs presenta efecto aún después de 2 hs. de incubación. Cuando se ensaya a esa misma concentración ácido decanoico hasta 4 hs. de incubación no presenta efecto y Monodecanoil-Glicerol presenta algún efecto recién a las 2 hs.

Estudios efectuados sobre glóbulos rojos de esta especie muestran que  $C_{10}$  PC en una concentración de 0,01  $\mu$ moles/ml es el agente hemolítico más eficaz produciendo hemólisis completa, mientras no se detecta hemólisis por efecto de ácido decanoico o Monodecanoil-Glicerol en la misma concentración.

Estudios efectuados con espermatozoides de *Leptodactylus chaguensis*, donde se evaluó el efecto de las diferentes PCs sobre el Índice Acrosómico (1) indican también que  $C_{10}$  PC es la más efectiva de todas. El hecho que  $C_{10}$  PC sea inhibitoria a concentraciones por debajo de 0,003  $\mu$ moles/ml sugiere que es la forma monomérica la que se une a la membrana plasmática de los espermatozoides causando desorganización de la misma, desorganización de los centriolos y pérdida del acrosoma, efectos que pudieron visualizarse por Microscopía Electrónica.

1. Cabada M. y colaboradores (1984) Develop. Growth and Differ. 26, 515-523.

MODELO MATEMATICO Y SIMULACION COMPUTACIONAL DE LA REGULACION EMBRIONICA. C.F. Doggenweiler. Fac. de Ciencias U. de Chile.

La regulación en el desarrollo de mamíferos implica que los blastómeros de la mórula son equivalentes; por ende, la internalización de algunas células, para formar la masa celular interna del blastocisto, debe depender de mecanismos inespecíficos. Hemos propuesto un modelo que da cuenta de la compactación y de la internalización en términos de la minimización de un parámetro que denominamos energía de superficie (Goel, Doggenweiler y Thompson, J. Math. Biol. 48: 167-187). La validez de este modelo se demostró mediante simulación computacional.

En la búsqueda de una situación más real, modificamos el programa computacional para incluir células de diferentes tamaños (que en el embrión se producen por la asincronía de las divisiones), de diferentes posiciones relativas (que dependen de las secuencias de planos de segmentación) e incluso diferencias en adhesividad. El programa de graficación de resultados fué modificado consecuentemente.

Se concluye que es más probable que las células más pequeñas (de división más precoz) o las más adhesivas resulten internalizadas. A pesar de lo cual, el orden de planos de segmentación puede producir "atrapamientos" de células internalizadas aun cuando no sean las menores o las más adhesivas. Se agradece al DIB (Proyecto 2201) y al CIES (Comisión Fulbright).

PROPIEDADES DEL INTERCAMBIO Na-Ca EN MEMBRANAS DE TUBULO TRANSVERSAL AISLADAS DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO. (Properties of the Na/Ca exchange system in transverse tubule membranes from skeletal muscle). Donoso, P. e Hidalgo, C. Depto. de Fisiología y Biofísica y Depto. Ciencias Preclínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Vesículas aisladas de túbulo transversal de músculo esquelético de rana (*Caudiverbera caudiverbera*) presentan actividad de intercambio Na-Ca que se estudió midiendo la incorporación de  $^{45}\text{Ca}$  a vesículas precargadas con Na. Al imponer un potencial intravesicular positivo, mediante gradiente de  $\text{K}^+$  y valinomicina, la velocidad inicial de intercambio aumenta, lo que sugiere que el intercambio es electrogénico con una estequiometría para Na/Ca  $> 2$ .

La velocidad de incorporación de calcio es función hiperbólica de la concentración de calcio extravesicular, con una constante de afinidad aparente de 26  $\mu\text{M}$ . La dependencia de la concentración de sodio intravesicular es sigmoidea, con una constante de afinidad aparente de 60 mM.

El intercambio es estimulado por pH alcalino y por  $\text{K}^+$  en el medio extravesicular, e inhibido por amilorida.

Los resultados sugieren que el sistema de intercambio Na-Ca de túbulo transversal de músculo esquelético es semejante al de sarcolema de músculo cardíaco y podría tener papel importante en la mantención de la concentración intracelular de calcio en el músculo esquelético.

Financiado por DIB Univ. de Chile B.2149, NIH HL 23007 y GM 35981-01 y por Muscular Dystrophy Association.

ESTIMULACION DE LA METILACION DE FOSFOLIPIDOS EN MIOBLASTOS POR 1,25-DIHIIDROXI-VITAMINA D<sub>3</sub> (Stimulation of phospholipid methylation in myoblasts by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>). Drittanti, L. y A.R. de Boland. Departamento de Biología, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

En mioblastos de músculo esquelético se ha detectado un receptor específico para 1,25-dihidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Trabajos previos (SAIB 1985) sugirieron que el esteroi estimula la conversión de fosfatidiletanolamina (PE) a fosfatidilcolina (PC) por la vía de transmetilación e incrementa la síntesis de triglicéridos (TG). Se realizaron experimentos adicionales para corroborar estos cambios y establecer si los mismos eran el resultado de la acción nuclear de la hormona. Cultivos primarios de mioblastos de músculo pectoral de embrión de pollo fueron tratados 12 h con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (5 x 10<sup>-10</sup> M) en ausencia y presencia de actinomicina-D y posteriormente incubados (2 h) con  $^3\text{H}$ -glicerol o con  $^3\text{H}$ -colina y  $^{14}\text{C}$ -etanolamina simultaneamente. El esteroi aumentó significativamente la marcación con  $^3\text{H}$ -glicerol de PC y TG y disminuyó la de PE. En el experimento de doble marcación no afectó la incorporación de  $^3\text{H}$ -colina a lípidos totales y PC pero incrementó la de  $^{14}\text{C}$ -etanolamina a PC a expensas de una disminución proporcional en PE. Al separar los intermediarios de la vía de metilación se observó un incremento significativo en la marcación de derivados dimetilados (130 %) y trimetilados (66 %) de PE. Los cambios en marcación de lípidos fueron suprimidos por la actinomicina D. Los resultados indican que el 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula la metilación de fosfolípidos en mioblastos a través de un mecanismo nuclear.

INFLUENCIA DE LOS ANTICHAGASICOS NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL SOBRE LA LIPOPEROXIDACION EN MICROSOMAS DE HIGADO DE RATA IN VITRO. (Influence of the antichagasic drugs nifurtimox and benznidazoles on lipoperoxidation in rat liver microsomes in vitro). Dubin, M., Grinblat, L., Fernandez Villamil, S.H. y Stoppani, A.O.M. Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las drogas nitroheterocíclicas, en particular el nifurtimox y el benznidazol, forman radicales libres por reacciones redox cíclicas (Docampo y col. Arch. Biochem. Biophys. 207,316(1981)). Como esos radicales pueden afectar los procesos de lipoperoxidación y los lipoperoxidos causan daño celular, se estudió la acción de esas drogas y análogos sobre la lipoperoxidación en microsomas hepáticos incubados con los sistemas I) glucosa-6-P 5,5 mM, glucosa-6-P deshidrogenasa 3 UI, NADP<sup>+</sup> 0,55 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 5,5 mM, ADP 1,7 mM y Cl<sub>3</sub>Fe 0,1 mM; II) ascorbato 0,5 mM, ADP 2,0 mM y Cl<sub>3</sub>Fe 67  $\mu\text{M}$ , o III) ter-butil hidroperóxido 2,5 mM, EDTA 0,11 mM, y SO<sub>4</sub>Fe 0,1 mM. La peroxidación se midió por formación de malondialdehído, con la reacción del ácido tiobarbitúrico. Con la concentración 53  $\mu\text{M}$ , los nitroheterocíclicos produjeron inhibición de la lipoperoxidación (%) como sigue: nifurtimox 35; benznidazol 9,8; nitrofurantoina 9,1; nitroindol 9,4; nitroimidazol 0 y cloranfenicol 0. Con los sistemas II y III, no hubo inhibición, excepto con nitroindol y sistema III, 25%. Con el sistema I, sin ADP-Fe, los nitroheterocíclicos no estimularon la formación de lipoperoxidos. Experimentos complementarios con las quinonas  $\beta$ -lapachona, CBP-10248, CBP-9442 y CBP-8935, 5  $\mu\text{M}$ , mostraron 80-90% de inhibición con el sistema I, pero no inhibieron, con los sistemas II y III. Teniendo en cuenta la acción de las quinonas como inhibidores de la lipoperoxidación (Talcott y col. Arch. Biochem. Biophys. 241, 88(1985)), se postula una acción similar de los nitroheterocíclicos, a saber, captura de radicales libres involucrados en el proceso de lipoperoxidación.

CURSO ESTACIONAL DE RESISTENCIA A LAS BAJAS TEMPERATURAS EN PODDOCARPACEAS CHILENAS. (Seasonal changes of frost resistance in Podocarpaceas from Chile). Ebensperger, G., \*Ríos, D., \*Peruzzo, G., \*Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de La Frontera, Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile.

Se estudió el curso estacional de la resistencia foliar al frío, presión osmótica potencial ( $\pi^*$ ) y carbohidratos totales del jugo celular de *P. salignus*, *P. nubigena* y *S. conspicua* cultivadas en el jardín botánico de la Universidad Austral de Chile-Valdivia. Esta propiedad se relacionó con las condiciones climáticas a que estuvieron expuestas las especies durante el desarrollo del trabajo.

La resistencia se determinó en cámaras frías autoregulables, donde las ramas fueron enfriadas a una determinada temperatura durante 120 minutos y posteriormente descongeladas a 19°C. Los daños se evaluaron en base a temperatura capaz de lesionar el 50% de la lámina foliar.

Las  $\pi^*$  se investigaron crioscópicamente y los azúcares totales por método colorimétrico.

En las tres especies, la mayor resistencia se obtuvo en invierno y la menor en primavera verano, coincidiendo con un descenso y ascenso de las temperaturas mínimas del hábitat respectivamente. La mayor resistencia coincidió con un ascenso de los valores osmóticos y carbohidratos totales.

Los resultados se discuten en base a los grados de resistencia encontrados en especies leñosas de otros continentes. Se reafirma la hipótesis de que las especies del Hemisferio Sur son menos tolerantes a las bajas temperaturas que las del Hemisferio Norte, debido a que las condiciones climáticas invernales son más benignas en el primer caso que en el segundo.

Proyecto DIDUACH RS-83-19

EFEECTO DE LA INGESTION DE ETANOL (EtOH) SOBRE VELOCIDAD DE FLUJO DE  $Ca^{2+}$  EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. (Effect of ethanol intake on  $Ca^{2+}$  influx velocity in Central Nervous System). Egaña, E. y Ramirez, M.T. Universidad de Chile - Facultad de Medicina - Instituto de Medicina Experimental - Laboratorio de Neuroquímica - Santiago 7 - Chile.

Se ha demostrado en diferentes modelos de alcoholismo experimental que EtOH produce alteración de las biomembranas, especialmente de membrana mitocondrial de diferentes órganos, lo que se traduce en una disminución de la disponibilidad de energía indispensable para los procesos celulares. Nos interesó conocer el efecto que nuestro modelo de alcoholismo experimental: permanente y generacional, pudiera tener sobre el transporte mitocondrial en SNC con especial referencia a  $Ca^{2+}$ , catión fundamental en procesos de neurotransmisión y neurosecreción.

Rata albino Wistar ♂ y ♀; Normal (Control) y AG/25; ratas que beben exclusivamente solución EtOH 25% v/v; actualmente 16 generaciones. Proteína mitocondrial 15-20-mg/ml de 3 áreas de SNC: corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo, obtenida por centrifugación diferencial. Cámara reaccional: 4.5 ml v.f.; termostatisada: 25° C. Medio reaccional: 75mM KCl, 3mM Hepes, 0.5 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.4 0.5 mg alb/ml. Substrato: Glutamato 10mM/Malato 2mM, adición ADP 360 amoles,  $Ca^{2+}$ , cada pulso 1  $\mu$ mol. Estudio polarográfico; consumo de oxígeno medido con electrodo Clark<sup>®</sup>, transporte de  $H^+$  con electrodo combinado pH Sigma<sup>®</sup> y flujo de calcio determinado con electrodo específico de  $Ca^{2+}$  WTW<sup>®</sup> conectado a pHmetro con inscriptor.

Los resultados demostraron una disminución de la velocidad de incorporación de  $Ca^{2+}$  ( $\mu$ moles de  $Ca^{2+}$  mg prot.<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) en ratas AG/25 comparada con normal. Esta diferencia es más notable en ♀. La mayor diferencia se presentó en corteza cerebral.

Grant DIB Proyecto B 1050-845-5, Universidad de Chile.

RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD EN RECEPTORES H2 DE HISTAMINA. (Structure-activity relationship in histamine H2-receptors). Enriz, R.D., Ciuffo, G.M., Estrada M.R. y Jauregui, E.A. Cátedra de Química General II. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis. Argentina.

Ranitidina y Etintidina son antagonistas en receptores H2 de histamina, de reciente desarrollo. Ambos compuestos presentan elevada actividad antisecretoria gástrica, siendo ranitidina la droga más usada clínicamente, junto con cimetidina.

Etintidina presenta, debido a la presencia del anillo imidazol, dos tautómeros y un catión, en condiciones fisiológicas. Por otra parte, y debido a la presencia del grupo cianoguanidina equivalente, ambos compuestos presentan 4 posibles isómeros configuracionales.

Para los distintos tautómeros y los diferentes isómeros configuracionales, se realizó un análisis conformacional teórico, utilizando un potencial átomo-átomo empírico, en el cual se supuso que la hidratación eliminaría las interacciones electrostáticas.

Para ranitidina, la configuración Z,E es la de mayor población sobre los otros isómeros configuracionales (más del 90%), mientras para etintidina, se encontró que la configuración E,Z es la preferida (más del 90% de la población). En ambos casos, conformaciones plegadas del tipo "gauche", con un marcado paralelismo entre los planos del anillo (imidazol o furano) y el grupo cianoguanidina equivalente, resultaron muy preferidas. Estas conformaciones, similares a las obtenidas previamente para cimetidina, presentan distancias entre grupos potencialmente activos en el orden de 3.5-4 Å, como se encontraría previamente para cimetidina e histamina. Estas distancias se han propuesto como importantes para la interacción en este tipo de receptor.

REACTIVOS BIFUNCIONALES EN LA DETERMINACION DE DISTANCIAS INTRAMOLECULARES EN LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA. (Bifunctional reagents in the intramolecular distances determination in bovine growth hormone.) Ermacora, M., Nowicki, C., Wolfenstein-Todel, C. y Santomé, J.A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA - CONICET).

En nuestro laboratorio se demostró la proximidad estérica de la lisina 111 y la tirosina 174 de la hormona de crecimiento bovina (bGH) mediante la formación de un puente covalente entre estos residuos. Con el fin de obtener nuevos puentes con reactivos bifuncionales, así como aumentar el rendimiento y la selectividad, la reacción se realizó ahora en dos etapas. Por nitración a pH 8.5 con tetranitrometano y posterior reducción con hidrosulfito de sodio se pudo introducir grupos amino en las tirosinas 35, 42 y 174, sin afectar el contenido de alfa hélice ni la actividad biológica de la hormona. El bajo pKa de estas aminotirosinas permitió unirles selectivamente a pH 3.6 uno de los extremos reactivos del 1.5-difluor-2,4-dinitrobenceno. Después de eliminar el exceso de reactivo se llevó a pH 9.3 para permitir la reacción del otro extremo.

El derivado obtenido se trató con bromuro de cianógeno y se cromatografió en Sephadex G-50 SF. Las fracciones obtenidas se sometieron a digestión trípica y fraccionamiento en SP-Sephadex. Los péptidos con absorbancia en 345 nm se purificaron por HPLC. La determinación de la composición en aminoácidos de cada uno de ellos permitió identificar los siguientes puentes covalentes: 29-35, 29-174, 111-174 y 170-174. Esto sugiere la proximidad espacial de las cadenas laterales de los residuos involucrados.

El derivado entrecruzado conserva la capacidad promotora de crecimiento y el contenido de alfa hélice determinado por difracción circular.

EFFECTO DE LIGANDOS EN LA INACTIVACION DE LAS FORMAS MUTADA Y NORMAL DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* POR MODIFICACION DE GRUPOS-SH. (Effect of ligands in the inactivation of the normal and mutant forms of phosphofructokinase-2 from *E. coli* by modification of SH-groups). Espinosa, X. y Babul, J. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación y Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Bajo condiciones gluconeogénicas, cepas con una forma mutada de fosfofructoquinasa-2, Pfk-2\*, crecen más lentamente que las que contienen la enzima normal Pfk-2. Ambas enzimas son dímeros de igual peso molecular y MgATP promueve la tetramerización de Pfk-2 solamente. Pfk-2 presenta un sitio alostérico inhibitorio para MgATP el que estaría alterado en Pfk-2\* como consecuencia de la mutación estructural. ATP libre es un inhibidor competitivo de ambas enzimas. Pfk-2\* es más lábil que Pfk-2, hecho que se acentúa en ausencia de ditiotreitól y sugiere que uno o más grupos-SH están comprometidos en la actividad de las enzimas.

Pfk-2\* presentó una mayor inactivación que Pfk-2 por el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) y N-etilmaleimida (NEM). Ambas enzimas presentaron una cinética de pseudo-primer orden no lineal que indica dos clases de grupos-SH con reactividades diferentes. A 0°C los grupos-SH que reaccionan más rápidamente en Pfk-2\* tienen una constante de segundo orden aproximadamente 30 veces mayor que los correspondientes en Pfk-2. MgATP protegió a Pfk-2 de la inactivación por DTNB y NEM. Fructosa-6-P, fructosa-6-P más MgATP y ATP libre no actuaron como protectores. En el caso de Pfk-2\* sólo fructosa-6-P actuó como protector, pero su efecto fue parcial. Estos resultados sugieren una mayor reactividad de los grupos-SH de Pfk-2\* que de Pfk-2 como consecuencia de la mutación estructural y que la protección de MgATP a la inactivación de Pfk-2 resulta de la unión de este compuesto al sitio alostérico. Financiado por DIB-U de Chile, Fondecyt y OEA.

PIRUVATO KINASA DE *THERMUS THERMOPHILUS*: PURIFICACION Y EFECTO DE IONES METALICOS. (*Thermus thermophilus* pyruvate kinase: purification and effect of metal ions). Eyzaguirre, J., Sopic, A. y Nowak, T. Department of Chemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, IN, y Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.

Pyruvate kinase from the thermophilic microorganism *Thermus thermophilus* was purified to homogeneity by protamine sulfate and ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography and affinity chromatography on Affi gel-Blue. The sub-unit molecular weight, as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, was found to be 50,000, and the enzyme has a pI of 5.0. The enzyme has a requirement for divalent metal cations, but in contrast to eukaryotic pyruvate kinases,  $Mn^{2+}$  activation by monovalent cations was observed.  $Mn^{2+}$  substitutes for  $Mg^{2+}$ , but at about one-third the velocity. Monovalent metal ions inhibit at high concentration, increasing the  $K_{0.5}$  for PEP, but this effect is probably due to ionic strength. Kinetic studies were performed at 22° and pH 7.0, in the absence of monovalent metal ions. PEP gives sigmoidal kinetics with  $K_{0.5}=0.8$  mM; addition of G-6-P induces hyperbolic kinetics with  $K_m$  (PEP)=0.2 mM. The  $K_m$  for ADP is 0.23 mM and the  $K_A$  for G-6-P is 0.02 mM. At pH 6.4 qualitatively similar kinetics are observed with greater  $K_m$  values. In the presence of  $Mn^{2+}$ , pH 7.0, the  $K_{0.5}$  for PEP is 10  $\mu$ M, and the addition of G-6-P induces hyperbolic kinetics with a  $K_m$  (PEP)=4  $\mu$ M;  $K_m$  for ADP is 21  $\mu$ M. The ligands oxalate and phosphoglycolate behave as competitive inhibitors versus PEP with  $K_i$  values of 0.37 mM and 4.9 mM, respectively. This research was supported by NIH grant AM17049.

CALIBRES Y MICROTUBULOS DE AXONES AMIELINICOS EN NERVI PERIFERICO: EFECTO DE LA DESNUTRICION INTENSA. (Calibers and microtubules in non-medullated axons in peripheral nerve: effect of malnourishment). Fañandez, V. y Rosso, P. Lab. Neurocitología, Fac. Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. (Patrocinio: F. Nervi.)

El empaquetamiento de los microtúbulos (MTs) es función inversa del calibre axonal. Una desnutrición intensa y mantenida podría asociarse a una disminución del calibre. En esta condición debería mantenerse esta correlación.

Ratas machos de 570 g. fueron alimentadas con el 25% de la dieta habitual hasta su sacrificio a los 27 y 48 días (53 y 46% de peso inicial, respectivamente).

Los nervios surales se procesaron para microscopía electrónica. Se contó los MTs y se midió las áreas de axones amielínicos.

La desnutrición no afectó el peso del encéfalo. Las áreas de las fibras amielínicas disminuyeron de 0.61  $\mu$ m<sup>2</sup> a 0.57  $\mu$ m<sup>2</sup> a los 27 días y a 0.41  $\mu$ m<sup>2</sup> a los 48 días de desnutrición. El número de MTs aumentaba con el calibre del axón, pero su empaquetamiento disminuía. Esta correlación se mantuvo cercana a la de los animales controles.

Concluimos que la desnutrición hace disminuir el calibre pero no afecta de manera importante el empaquetamiento de los microtúbulos de la fibra amielínica. Proponemos una labilidad del SNP frente a la desnutrición intensa.

LOS PARASITOS DE LA LISA, *MUGIL CEPHALUS* L., EN CHILE: SISTEMATICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL. (Parasites of grey mullet, *Mugil cephalus* L., in Chile: systematics and population structure). Fernández, J. Dpto. Zoología, Universidad de Concepción. Concepción.

La lisa es una especie marina, costera, cosmopolita, que a pesar de ser un recurso pesquero de cierta importancia en Chile (738 ton. en 1985), está muy poco estudiada desde el punto de vista parasitológico.

Durante 1985 se estudiaron los parásitos de *M. cephalus* en 3 localidades a lo largo de Chile (Arica, Coquimbo, Concepción) cuali y cuantitativamente. Se identificaron un total de 20 especies de parásitos: PROTOZOA: *Kudoa* sp.; *Myxobolus* sp.; *Trichodina* sp.; MONOGENEA: *Ligophorus huitrempe* n.sp.; *Metamicrocotyla macracantha* (A.); *Microcotyle pseudomugilis* H.; DIGENEA: *Dicrogaster fastigatus* T & S; *D. fragilis* n.sp.; *Hymenocotta manteri* O.; *Lasiotocus* sp.; *Phagicola longa* (R.) (metacercarias, adultos obtenidos a partir de infecciones experimentales de *Mus musculus*); *Saccocoelioides overstreetsi* n.sp.; *S. papernai* n.sp.; CESTODA: *Scolex pleuronectis* M.; NEMATODA: *Contractaecum multipapillatum* (D.) (larva); *Phocanema* sp. (larva); COPEPODA: *Bomolochus chalcuanus* n.sp.; *Ergasilus lizae* K.; *E. versicolor* W.; *Naobranchia lizae* (K.).

El 100% de los peces de Concepción estaba parasitado por al menos un parásito, distribuyéndose éstos a través de todas las tallas muestreadas, desde 150 a 460 mm. Todos los parásitos, excepto *Lasiotocus* sp., están altamente sobredispersos, indicando una distribución agrupada y no al azar. La carga parasitaria de todas las especies (excepto *D. fragilis* n.sp.) está positivamente correlacionada con la longitud del pez ( $P < 0,001$  y  $P < 0,01$ ). Existe además una asociación positiva significativa entre *L. huitrempe* y *M. pseudomugilis* ( $P < 0,001$ ). Ningún otro par de parásitos presenta algún tipo de asociación.

Existen diferencias en la distribución geográfica de las especies encontradas, las cuales se atribuyen en parte a las condiciones abióticas a lo largo de la costa (gradientes de temperatura, áreas estuarinas, etc.).

EFFECTO DEL CIANIDANOL (CN) SOBRE EL METABOLISMO DE ETANOL (E) IN VIVO Y LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN SU OXIDACION HEPATICA. (Effect of cyanidanol on the in vivo ethanol metabolism and on the activity of enzymes involved in its hepatic oxidation). Fernández, V. y Kriz, A. Unidad de Bioquímica, Dept. Ciencias Biológicas, Fac. Medicina-Div. Occidente, U. de Chile.

El CN es un potente atrapador de radicales libres. Debido a que se ha evidenciado que la oxidación microsomal hepática de E tiene un componente radicalario, se estudia el efecto del CN sobre el metabolismo de E y sobre la actividad de la deshidrogenasa alcohólica (ADH), sistema microsomal (MEOS) y catalasa (C) hepáticas.

Ratas Wistar macho (200 g) recibieron 0,4 g CN/kg s.c. o salino isovolumétrico (controles). Una hora después, todos los animales fueron tratados con 2,5 g E/kg i.p. Muestras de sangre fueron obtenidas a las 2,3,4,5 y 6 hr de administrado E, para su determinación enzimática. El efecto del CN sobre la actividad ADH, MEOS y C hepáticas se estudió en un rango de concentraciones de 0,2 a 2,0 mM.

CN inhibe el metabolismo de E in vivo en un 20% ( $P < 0,005$ ). En el rango de concentraciones usado, CN no afecta la actividad hepática de ADH y C. Sin embargo, la actividad MEOS se inhibe progresivamente, observándose un 46% de inhibición con 2,0 mM CN.

Los resultados indican que el CN inhibe selectivamente el sistema MEOS, vía oxidativa de E asociada a un mecanismo radicalario, lo cual se traduce en una disminución del metabolismo de E in vivo. Este efecto está de acuerdo con la acción antilipoperoxidante del CN observada en la intoxicación aguda con E. (Financiado por D.I.B., Universidad de Chile, E-1960).

CAPTACION DE  $[^3\text{H}]$ -L-GLUTAMATO Y  $[^3\text{H}]$ -DOPAMINA EN ESTRIADO DE RATA: DEPENDENCIA DE IONES CLORURO E INHIBICION POR BLOQUEADORES DE TRANSPORTE DE ANIONES. (Chloride ions dependent uptake of  $[^3\text{H}]$ -L-Glutamate and  $[^3\text{H}]$ -Dopamine by the rat striatum: Inhibition by anions transport blockers). Fiedler, J.L., Argueros, L. Lab. Farmacología-Bioquímica, P. Universidad Católica de Chile.

En estudios de unión de ác. L- $[^3\text{H}]$ -Glutámico (L-Glu) a membranas, hemos encontrado que el L-Glu retenido, dependiente de  $\text{CaCl}_2$  y temperatura, corresponderían a secuestro de L-Glu por las membranas. Este hallazgo nos llevó a estudiar el rol del  $\text{Cl}^-$  en la captación de L-Glu y  $[^3\text{H}]$ -Dopamina (DA) por tejido y sinaptosomas estriales y si este proceso era afectado por inhibidores de transporte de aniones.

Cortes de tejido y sinaptosomas se incubaron con L-Glu o DA en KRF durante 2 min a  $31^\circ$ . La reacción se detuvo por filtración. Los inhibidores fueron: 4-acetamido-4'-isotiociano-2-2'-disulfonilbenzoato (SITS), 4-[(dipropilamino)sulfonil]benzoico (Probenecid) 2, 4, 6 trinitrofenol (Picric). La captación de L-Glu y DA se inhibe totalmente por remoción de  $\text{Na}^+$  y baja temperatura. Al sustituir el  $\text{Cl}^-$  por acetato o citrato, se inhibe la captación de L-Glu (58 y 38%) y totalmente la DA (90%). El transporte de L-Glu y DA aumenta en forma lineal al incrementar el  $\text{Cl}^-$  entre 5 y 100 mM, a mayores concentraciones no es lineal. SITS, Probenecid y Picric ( $10^{-5}$  a  $10^{-3}\text{M}$ ) inhiben progresivamente el transporte de L-Glu y DA por los cortes y sinaptosomas. La remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  externo y/o exceso de  $\text{Mg}^{2+}$  no afectan la captación de L-Glu y DA.

En conclusión, la captación de L-Glu y DA en los terminales nerviosos es dependiente de la presencia de iones  $\text{Cl}^-$  en el medio extracelular y en concordancia con esto, inhibidores de transporte de aniones disminuyen la captación de L-Glu y DA, sugiriendo un importante rol para el cloruro en el transporte de alta afinidad de L-Glu y DA.

Financiado por Grant 1182/85 Fondecyt.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES DEL CUERPO CROMATOIDE DE TESTICULO DE RATA. (Isolation and characterization of the components of rat testis chromatoid body). Figueroa, J. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Al cuerpo cromatoide (CC) de testículo de rata, se le ha descrito como una estructura citoplasmática única, de tamaño aproximado de una  $\mu\text{m}$  de diámetro, típica de las espermatidas y con una ultraestructura fibrogranular densa. Para caracterizar los componentes de esta estructura y como primera fase para definir su rol en espermiogénesis, se desarrollaron dos procedimientos de purificación que consistieron en centrifugación diferencial y gradientes discontinuos de sacarosa. Un segundo procedimiento consistió en el bandeado isopéptico de CC en gradientes de metrizamida. Estos métodos producen una preparación conformada por alrededor de un 80% de CC, los contaminantes consisten en pequeñas membranas.

Análisis del contenido de RNA mostró una población heterogénea, donde destacan una serie de bandas con tamaños entre 7S y 4S, con total ausencia de tRNA. Mediante electroforesis en condiciones denaturantes (SDS), se determinó que esta estructura está compuesta de una gama de polipéptidos cuyos pesos moleculares fluctuaron entre 10.000 y 68.000. Mediante "Western blot", se demostró que algunos de ellos son reconocidos por los sueros anti-Sm y ANA-M. La presencia de polipéptidos reconocidos por el suero anti-Sm y la existencia de pequeños RNAs ya mencionados demuestran la presencia de U-RNP en el CC. Estos resultados se confirmaron por inmunocitoquímica al microscopio óptico y electrónico, donde además el CC reaccionó con un anticuerpo anti-DNA nativo (A-NDNA-A).

El presente trabajo constituye la primera caracterización de los componentes moleculares del CC de testículo de rata, que por su naturaleza sugieren que el rol de esta estructura podría ser el almacenamiento y transporte de RNA, en forma de ribonucleoproteínas.

Financiado por los Proyectos S-85-10 DID-UACH, I/61 457 Stiftung Volkswagenwerk, Alemania.

Patrocinio: L. O. Burzio.

TRANSFERENCIA DE PLASMIDO MEDIADA POR FUSION DE PROTOPLASTOS A Clostridium acetobutylicum. (Plasmid transfer mediated by protoplasts fusion to C. acetobutylicum strains). Floccari, M., Schijman, A. y Méndez, B.

Departamento Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Buenos Aires- Ciudad Universitaria, Pab. II, 1428, Bs. As., Argentina.

Clostridium acetobutylicum posee importancia industrial por su uso en fermentaciones anaeróbicas para la producción de solventes: acetona, butanol. El mejoramiento de su actividad biológica por manipulaciones genéticas conduciría a una mayor eficiencia en el proceso industrial. Nuestro objetivo es desarrollar sistemas de transferencia de material genético que permitan ulteriores ensayos con moléculas recombinantes.

En este trabajo se fusionaron protoplastos de una cepa nativa de C. acetobutylicum con los de distintas cepas de Bacillus subtilis portadoras de plásmidos con resistencia a antibióticos.

La fusión se realizó en presencia de polietilenglicol y la regeneración de los fusionantes tuvo lugar en anaerobiosis en medio sólido de crecimiento, hipertónico, suplementado con diversos nutrientes. Las colonias portadoras de plásmidos se detectaron por réplica en medio de crecimiento suplementado con el antibiótico correspondiente. La presencia de plásmidos en los fusionantes fue confirmada por electroforesis en geles de agarosa.

Este método de transferencia de material genético podrá ser aplicado a plásmidos recombinantes de interés.

REGULACION DE LA SECRECION DEL FACTOR TIMICO SERICO: EFECTO DE UN ESTIMULO SENSORIAL. (Regulation of the secretion of thymulin: Effect of sensorial stimulus). Folch, H., Bahre, R., Kunik, M. Instituto de Medicina Experimental, Universidad Austral de Chile.

El Factor Tímico Sérico (FTS) es una de las hormonas producidas por el estroma tímico cuya función es regular la diferenciación de las células inmunocompetentes. Recientemente hemós reportado que la secreción del FTS por parte de las células retículo epiteliales depende de un estímulo hipotalámico. En el presente trabajo se estudia el efecto del ruido en los niveles de FTS circulante en animales de experimentación.

En todos los experimentos se usaron ratones RK de 2 meses de edad, los que fueron sometidos a un ruido puro de 100 Db a 1000 Hertz, por una hora, distribuido en 30 aplicaciones de un minuto cada una. Posteriormente los animales fueron sangrados, el suero filtrado y el FTS evaluado mediante la técnica de inhibición de rosetas.

Los resultados demuestran que el estímulo acústico aplicado eleva en dos a cuatro veces los niveles de FTS circulante en todos los ensayos realizados, el aumento de la hormona se observa unas horas después de aplicado el estímulo y el máximo se detecta entre las 6 y 24 horas después de la exposición al ruido para decaer posteriormente. Junto con lo anterior es posible evidenciar un aumento del número de timocitos cercano al 30%.

Financiado por Proyectos UACH S-85-12 y FONDECYT N° 1072.

EL TRANSPORTE OVIDUCTAL DE EMBRIONES SE RETARDA EN RATAS HIPOESTROGENICAS. (Delayed oviductal transport of embryos in hypoestrogenic rats). Forcellado, M.L. - Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El paso de embriones al útero se produce en la tarde del 4° día de preñez en la rata, pero se adelanta si el estradiol (E<sub>2</sub>) plasmático sobrepasa los niveles normales por administración de E<sub>2</sub> exógeno. Se investigó si la disminución de E<sub>2</sub> circulante tiene un efecto opuesto, reduciendo la síntesis de E<sub>2</sub> mediante la administración de un inhibidor de la estrógeno sintetasa, la 4-OH-Androstenedione (4-OH-A). Se inyectó 4-OH-A, 10 mg/día, desde el día 2, 3 ó 4 hasta el día 5 de preñez, en el cual se autopsiaron las ratas para determinar la distribución de los embriones en el tracto genital. En otras ratas se determinó producción ovárica de E<sub>2</sub> y progesterona (P) y niveles sistémicos de testosterona (T). Sólo en las ratas tratadas con 4-OH-A desde el día 2 ó 3, se encontró embriones retenidos en el oviducto en el día 5 (50 y 20% respectivamente). 4-OH-A disminuyó la secreción de E<sub>2</sub> a un 20% de lo normal, no modificó la producción de P y elevó los niveles de T. Implantes de T produjeron cambios hormonales y en el transporte de embriones semejantes a los observados con 4-OH-A. E<sub>2</sub> exógeno normalizó el transporte de embriones en las ratas tratadas con 4-OH-A o con T, por lo tanto, la retención de embriones observada con ambos tratamientos, se correlaciona con disminución de E<sub>2</sub> y no con aumento de T.

Se concluye que la secreción de E<sub>2</sub> durante los 3 primeros días de preñez en la rata, es necesaria para asegurar el paso de embriones al útero en la tarde del 4° día.

Financiado por RF-86020

PURIFICACION DE UNA PROTEASA Y SU INHIBIDOR DE MUSCULO ESQUELETICO DE PESCADO. (Purification of one protease and its inhibitor from skeletal muscle of fish).

Folco, E., Busconi, L., Martone, C., Trucco, R., Sánchez, J. J.

INTI. Centro de Investigaciones de Tecnología Pesquera. Mar del Plata. ARGENTINA.

Previamente habíamos informado de la presencia en el músculo de corvina de una proteasa tipo serina y demostrado su acción sobre distintas proteínas miofibrilares aisladas y miofibrillas intactas, como así también la acción del inhibidor endógeno al prevenir la degradación producida por la proteasa.

Con el fin de conocer la interacción entre la enzima y su inhibidor endógeno se realiza la purificación de ambos.

La enzima fue purificada por: cromatografía en DEAE-Sepharcel, octil-Sepharose, hidroxipatita y arginil-Sepharose y al inhibidor por DEAE-Sepharcel, hidroxipatita y tripsina-agarosa.

Las fracciones activas de la columna de octil-Sepharose al ser cromatografiadas en hidroxipatita eluyen como un solo pico de actividad, pero si esas fracciones son previamente incubadas y luego cromatografiadas en hidroxipatita se convierten en otras dos formas enzimáticas diferentes.

Esta conversión es afectada por la presencia de sustratos e inhibidores de la enzima.

HORMONAS Y GABA COMO POTENCIALES MODULADORES DE SISTEMAS NEUROTRANSMISORES EN EL OVIDUCTO DE RATA. (Hormones and GABA as potential modulators on neurotransmitters systems of rat oviduct). Forray, M. I., Galleguillos, X., Pizarro, J., Poblet, N. y Belmar, J. Laboratorio de Farmacología Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

En oviducto de rata se han descrito diferentes sistemas de neurotransmisores (NTs): acetilcolina (ACh), nora-drenalina (NA) y recientemente el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Algunas propiedades dependerían del estado endocrino del animal y/o de interacciones entre ellos. En nuestro laboratorio hemos encontrado que la liberación de <sup>3</sup>H-Noradrenalina (<sup>3</sup>H-NA) cambia a lo largo del ciclo estral, y que la progesterona (P) la inhibe tanto *in vitro* como *in vivo*. En este trabajo se presentan los efectos de estradiol (E) y de GABA sobre la liberación de <sup>3</sup>H-NA y de GABA sobre la actividad mecánica espontánea e inducida del oviducto.

En los estudios de liberación, los oviductos preincubados con <sup>3</sup>H-NA fueron superfundidos en presencia de diferentes concentraciones de GABA, de E o de P, y luego estimulados con K<sup>+</sup> (80 mM). La actividad mecánica del órgano se estudió en cámara de perfusión y se registró con transductores de tensión, GRASS 03.

E aumentó la liberación de <sup>3</sup>H-NA durante estro y diestro y la inhibió en proestro, siendo su efecto dosis dependiente. Con P se observó nuevamente inhibición de la liberación de <sup>3</sup>H-NA. Lo mismo ocurrió con GABA aunque solo durante el estro. GABA modificó además la actividad espontánea del oviducto y potenció el efecto de ACh. Curvas dosis-respuesta de ACh realizadas en presencia de GABA a distintas concentraciones sugieren que este NT modificaría la sensibilidad del oviducto a ACh.

Estos resultados indican a GABA como modulador de sistemas de NTs del oviducto de rata, pero su efecto dependería del ciclo estral.

Financiado por Proyecto DIUC 75/86.

ASOCIACION DE LA ACETILCOLINESTERASA NEURONAL A LA MEMBRANA PLASMÁTICA. (Association of the Neuronal Acetylcholinesterase to the Plasma Membrane). Fuentes M.E. e Inestrosa, N.C. Grupo de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

Estudios recientes han demostrado que ciertas proteínas de superficie se asocian a la membrana a través de dominios lipídicos ricos en fosfatidilino sitol. Entre ellos se encuentran los dímeros de acetilcolinesterasa (AChE) presentes en Torpedo.

En este trabajo se ha estudiado como se asocia la AChE neuronal a la membrana plasmática en el núcleo caudado de bovino. Para ello hemos usado un reactivo de afinidad, que se asocia a regiones hidrofóbicas de proteínas de membrana, el 3-(Trifluoremetil)-3-m-(<sup>125</sup>I) Iodofenil Diazirina (<sup>125</sup>I-TID).

Con el <sup>125</sup>I-TID se ha establecido que: (i) la AChE contiene ácidos grasos marcados, (ii) la electroforesis PAGE-SDS, sin reducción muestra marca sólo en dímeros y tetrameros de la enzima, (iii) al reducir, el 40% de la marca se ubica en una región de 20Kd, la cual es difícilmente teñida con plata. (iv) Fosfolipasa C, que hidroliza fosfatidilinositol no afecta la movilidad de la banda de 20Kd, (v) Digestión con Proteinasa K genera a partir de la banda de 20Kd, un fragmento de 13Kd, sin alterar la actividad de la AChE, (vi) el fragmento de 13Kd no se une a Con-A y, puede ser purificado en columnas de LH-60 con solventes orgánicos.

Podemos concluir que un fragmento de 20Kd unido por enlaces disulfuro al tetramero de subunidades catalíticas de la AChE está involucrado en la unión de la enzima a la membrana neuronal. En este fragmento está contenido uno menor de 13Kd de estructura lipídica que no contiene fosfatidilinositol.

Financiado por DIUC (77/86) y FONDECYT (1015/85).

ACTIVIDAD DE CATALASA HEPÁTICA Y CATABOLISMO DEL COLESTEROL. (Liver catalase activity and cholesterol catabolism). Fuentes O.R., Departamento de Ciencias Básicas, División Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

A partir de estudios in vitro se ha propuesto un rol del peroxisoma y su sistema de  $\beta$ -oxidación en la degradación del colesterol a ácidos biliares, pero su importancia funcional no está bien establecida.

Con el objeto de evaluar el rol funcional que el peroxisoma pueda tener en el catabolismo de colesterol se investigó si la inhibición de la catalasa hepática por 3-amino-1,2,4-triazol (A.T.) bloquea el catabolismo del colesterol inducido por colestestamina (CUEMID) en ratas machos Sprague-Dawley. Diez días de ingesta de CUEMID en la dieta (2%, p/p) produce hipocolesterolemia y aumenta la actividad de la catalasa hepática. La inyección i.p. de A.T. (1g/Kg peso) cada 12 h. por 7 días, reduce a un 15% la actividad de la catalasa hepática y produce hipercolesterolemia e hipotrigliceridemia. La administración simultánea de A.T. y CUEMID por 7 días produce un 77% de inhibición de la actividad de catalasa hepática y una hipocolesterolemia mayor que con CUEMID, manteniéndose el efecto hipotrigliceridémico observado con A.T. solo. Los resultados sugieren que el catabolismo de colesterol inducido por CUEMID no requiere actividad de catalasa y ocurriría por otra vía (mitocondrial) o bastaría la actividad de catalasa remanente a la vía peroxisomal.

EFFECTO DE MALATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PIRUVATO DEHIDROGENASA DE MITOCONDRIAS DE HIGADO Y "TIPO ESPERMA" DE RATA Y RATÓN (Effect of malate on pyruvate dehydrogenase of liver and "sperm type" mitochondria from mouse and rat) Gallina, F.G., Gerez de Burgos, N.M., Burgos, C. y Blanco, A. Cátedra de Química Biológica, Facultad de C. Médicas, Univ. Nac. de Córdoba, Argentina.

Utilizando sistemas reconstituidos in vitro se ha demostrado en este laboratorio que la isozima de lactato dehidrogenasa específica de espermatozoide (LDH X) de ratón participa en un sistema conmutador de hidrógeno que utiliza la cupla redox  $\alpha$ -OH-ácido/ $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada. La cupla lactato/piruvato parece no operar, ya que con ella se produce un incremento en los niveles de NADH extramitocondrial en el sistema. Este efecto es aun mayor en presencia de malato, el cual forma parte de la lanzadera malato/aspartato.

A fin de aclarar el mecanismo de acción del malato, se estudió comparativamente el efecto del mismo sobre la actividad de piruvato dehidrogenasa en mitocondrias de hígado y "tipo esperma" de ratón y de rata. (Las mitocondrias "tipo esperma" se aíslan de testículo y son idénticas a las organelas que forman la vaina mitocondrial de la pieza media de espermatozoides). Los resultados obtenidos en las dos especies indican que, con mitocondrias de hígado, el malato no presenta efecto alguno sobre la actividad de la enzima, mientras que con mitocondrias "tipo esperma" malato 1mM incrementa la actividad enzimática en un 70% en las de rata y en un 200% en las de ratón; lo cual sugiere que la piruvato dehidrogenasa de espermatozoide posee diferentes propiedades regulatorias que la de hígado.

INFLUENCIA DEL ZINC SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA CROMATINA DE ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS (Zinc action on the chromatin stability of human spermatozoa). Gamboa, M. y Leiva, S. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La presencia de zinc en el espermatozoide y el plasma seminal estaría relacionada con la estabilidad nuclear y en consecuencia con una adecuada decondensación de la cromatina en el citoplasma ovular.

El zinc ejercería un rol estabilizador de macromoléculas y éste dependería del estado físico-químico de la cromatina presente en espermatozoides normales (oval) y teratospérmicos.

Con el objeto de conocer y evaluar la acción del zinc sobre los gametos presentes en el semen humano, se incubaron las células "in vitro" en medio con Zn SO<sub>4</sub> (3.2 mM) a diferentes tiempos, determinando la presencia intracelular del ión previa y post incubación y evaluando el efecto estabilizante por tratamiento de decondensación "in vitro" con un reductor de S-S.

Se observó que más células ovales captan zinc respecto a las anómalas ( $p < 0.001$ ), siendo a los 25 minutos más evidente ( $p < 0.01$ ). Se detectó que el efecto estabilizador favorece a la población oval ( $r = 0.49$ ) en relación a la de teratospérmicos ( $r = -0.52$ ). En condición nativa los anómalos fueron más afectados por acción del reductor (mayor % de decondensados), pero también un porcentaje alto de ovales (40%).

Se concluye que el zinc ejerce una acción protectora de la decondensación nuclear, y ésta es selectiva, siendo ejercida sobre espermatozoides cuyos núcleos han alcanzado una adecuada diferenciación y maduración espermática. Se discute el significado que tendría la acción del zinc "in vivo", al asegurar un estado transitorio de mayor estabilidad como un mecanismo biológico que asegure el éxito en la transferencia del genoma paterno. (Proyecto 1978/8523 D.I.B., Universidad de Chile).

EFFECTO ACTIVADOR DE PEPTIDOS RICOS EN LISINA SOBRE LAS PROTEINA QUINASAS DE LA MEMBRANA DE OOCITOS DE *Xenopus laevis*. (Activating effect of lysine-rich peptides on the protein kinases of *Xenopus laevis* oocyte membranes.) Marta Gatica. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La membrana plasmática contiene proteínas y lípidos que intervienen en la transducción de señales extracelulares que regulan el metabolismo y la proliferación celular. Un sinnúmero de datos experimentales indican que la fosforilación y desfosforilación de proteínas de membrana afectarían la actividad de los mecanismos transductores. Esto justifica nuestro interés en estudiar las proteínas quinasas presentes en membranas de oocitos de *Xenopus laevis*.

Nosotros hemos determinado que la polilisina, en concentraciones de 0,5 mg/ml, produce una notoria estimulación de la fosforilación de varias proteínas de la membrana de oocitos realizada por quinasas endógenas. El mayor incremento se presenta en proteínas de Mr menor a 30.000 daltons. Efectos similares se obtienen con copolímeros lisina:alanina y lisina:serina y con poliornitina, pero poliarginina produce más bien una inhibición de la fosforilación de estas proteínas. Dentro de las proteínas naturales que contienen secuencias ricas en lisina se encuentran la histona H1 y la proteína del oncogen Kirstein ras (Ki-ras). Al usar la histona H1 y un péptido sintético que reproduce la secuencia de los últimos 14 aminoácidos de Ki-ras, se obtiene estimulación de la fosforilación de proteínas de membranas de oocito y de células de tejido nervioso NG-108-15. Actualmente estamos estudiando la solubilización de la actividad fosforilante presente en las membranas de oocito.

[Este trabajo es apoyado por un proyecto DIB de la Universidad de Chile y por la OEA.]

ACTIVIDAD MICROSOMAL HEPATICA DE OCTODON DEGUS TRATADOS CON FENOBARBITAL. (Hepatic microsomal activity of *Octodon Degus* with phenobarbital treatment).

Gaule, C., Vega, P. y Del Villar, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Experimentalmente se ha comprobado que el *Octodon Degus* (OD.), un caviomorfo chileno, posee una capacidad detoxicante microsomal superior a la rata Wistar. De acuerdo a esto, parece interesante evaluar la capacidad de inducción del sistema microsomal hepático (oxidación de función mixta, UDPGA transferasas) de estos animales.

Se estudia el efecto de la administración de fenobarbital, en relación al metabolismo oxidativo *in vitro* de la testosterona, naftaleno, aminopirina y morfina; además la actividad de conjugación con UDPGA de la morfina y parantrofenol. En todos ellos se utiliza OD. inducidos y controles; para testosterona adicionalmente se emplean ratas Wistar inducidos y controles.

En los animales controles, la cantidad de proteína microsomal y el contenido de cit. P-450 total es mayor en OD. y la inducción del contenido de cit. P-450 es mayor en la rata Wistar. En el metabolismo de la testosterona se observan diferencias en la producción de androstenediona y 2 $\alpha$ , 16 $\alpha$  y 7 $\alpha$  hidroxitestosterona entre OD. y Wistar controles.

Al comparar OD. controles con inducidos, se observa en estos últimos aumento del contenido de cit. P-450 y de la proteína microsomal. Sin embargo, la capacidad oxidativa no experimenta variación, con excepción de la testosterona cuyo metabolismo se observa disminuido mientras que el de la morfina aumenta moderadamente. La conjugación con UDPGA, en OD. inducido, no muestra variación para el parantrofenol, como sustrato, mientras que la morfina se aprecia una inhibición significativa.

Se relacionan los resultados obtenidos con el fenómeno de resistencia a drogas presentado por este caviomorfo. Proyecto N° B-1526-8634. DIB Universidad de Chile.

Proyecto 8025 CONICYT.

LA CUBIERTA FOLICULAR DE OOCITOS DE ANFIBIOS: SITIO DE SINTESIS DE RNA DURANTE LA OVOGENESIS. The follicular envelope of amphibian oocytes: a site of RNA synthesis during oogenesis. Genta H.; Sánchez Riera, A.; Sánchez, S. y Cabada, M. Departamento de Biología del Desarrollo (INSTITUTO). CONICET-Universidad Nacional de Tucumán.

La relación funcional entre el oocito de anfibio y la monocapa de células foliculares que lo rodean no está totalmente dilucidada.

Las células foliculares han sido implicadas en numerosos procesos tales como esteroidogénesis, síntesis de proteínas, participación en la formación de la envoltura vitelina, etc.

En trabajos previos hemos demostrado que en los oocitos ováricos totalmente crecidos de *Bufo arenarum*, esta capa celular es activa en la síntesis de RNA manifestando un comportamiento metabólico diferente según que se encuentre aislada o adherida al oocito. En este último caso se observó que las macromoléculas recientemente sintetizadas son transferidas al oocito. En la presente comunicación confirmamos mediante técnicas autorradiográficas que la vesícula germinal de los oocitos es muy activa en la síntesis de RNA especialmente en los estadios más jóvenes. Por otra parte encontramos que las células foliculares son también muy activas en la síntesis de estas macromoléculas durante todo el proceso de ovogénesis. Mediante experimentos de pulso y chase se observa transferencia de material radioactivo desde las células foliculares al oocito en crecimiento. Este pasaje presenta características distintas al observado en los oocitos totalmente crecidos, probablemente debido a la ausencia total o parcial de la cubierta vitelina.

ESTUDIOS SOBRE UNA MUTANTE DE RHIZOBIUM MELILOTI QUE INDUCE LA FORMACION DE PSEUDONODULAS INACTIVAS EN ALFALFA. (Studies on a *Rhizobium meliloti* mutant that elicits pseudonodule formation in alfalfa). R. Geremia, A. Zorreguieta, S. Cavaignac and R. Ugalde. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, F.C.E. y N., Universidad de Buenos Aires, CONICET, Buenos Aires, Argentina.

The presence of exopolysaccharide and  $\beta$ 1-2 glucan in the GRT 21S mutant of *R. meliloti* was studied. This strain was obtained by growing *R. meliloti* GR4 at 37.5°C. It elicits pseudonodule formation in alfalfa roots and produces twice more exopolysaccharide than the parental strain. The sugar, pyruvic acid and acetyl content is the same in the exopolysaccharide obtained from both strains.

$\beta$ 1-2 glucan is not present in cells or in the culture supernatant fluid of the mutant, but the parental strain accumulates it normally. Further studies demonstrate that the isolated internal membranes of GRT 21S could not synthesize  $\beta$ 1-2 glucan due to the lack of the 235 kD protein intermediate. In addition, the mutant was non-motile because it has no flagella. This phenotype is identical to that of the *chv B* mutants of *A. tumefaciens*, moreover GRT 21S strain harbouring a plasmid containing the *A. tumefaciens chv B* region synthesized the glucan. Thus, the genetic defect of this strain seems to be the same as that of the *A. tumefaciens chv B* mutants. Characteristics of the  $\beta$ 1-2 glucan synthesized by the complemented mutant will be reported.

TRANSFERENCIA PASIVA DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD (NPH) MEDIANTE SOBRENADANTES DE CELULAS INMUNES. (Passive transfer of Hypersensitivity Pneumonitis with immune cell supernatants). Gimpel, S., Miranda, D., Fernández, E., Vega, E., Zelaya, J. y Quezada, A. Lab. de Inmunología. Deptos. de Cs. Básicas y Med. Experimental, Fac. de Med. Div. Sur. Universidad de Chile.

La participación de hipersensibilidad celular en un modelo de NPH en ratas, ha sido sugerida por la reproducción de lesiones mediante transferencia pasiva de células inmunes y por activación de células pulmonares, detectada en alteraciones citomorfológicas. Para estudiar el papel de mediadores de hipersensibilidad en la génesis de estas lesiones, se transfirieron sobrenadantes del cultivo de linfocitos de sangre periférica (LSP) y de células broncoalveolares (CBA) inmunes a receptores normales por vía intratraqueal, realizando morfometría de las lesiones y estudio ultraestructural del tejido pulmonar. Como controles se transfirieron sobrenadantes de LSP y de CBA de ratas no inmunizadas. Las lesiones pulmonares inducidas por sobrenadantes de LSP inmunes fueron significativamente mayores que los controles. Con sobrenadantes de CBA no hubo diferencias. Al igual que en el modelo, la ultraestructura de neumocitos II demostró cambios morfológicos consistentes con activación celular. La transferencia pasiva de sobrenadantes inmunes ha inducido lesiones pulmonares y fenómenos de activación en células no inflamatorias. Las lesiones observadas en los controles pueden atribuirse a la participación de otros mediadores.

Proyecto M.1904-8633 DIB Universidad de Chile.

METABOLISMO DE RADICALES DEL OXIGENO EN TRYPANOSOMA CRUZI. (Metabolism of oxygen radicals in Trypanosoma cruzi). Giulivi, C., Turrens, J.F. y Boveris, A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas. (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

La deficiencia para metabolizar  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , intermedios de la reducción parcial del  $O_2$ , como resultado de la ausencia de catalasa y del bajo contenido de superóxido dismutasa, hacen del T. cruzi un excelente sistema para el estudio del metabolismo de estas especies. La adición de aminotriazol no tuvo efecto sobre la quimioluminiscencia (QL) espontánea de epimastigotes de T. cruzi ( $70 \pm 10$  cps/mg protefina) de acuerdo con la ausencia de catalasa; el dietilditiocarbamato produjo un aumento de 4 veces de la QL entre 2 a 3 mM y la concentración necesaria para el 50% de la estimulación de la QL ( $C_{50}$ ) fue del orden del  $K_i$  de la superóxido dismutasa (1,40 mM); el CNK produjo un aumento de 7 a 10 veces la QL requiriendo una  $C_{50}$  similar al  $K_i$  de la superóxido dismutasa (0,35 mM); la iodoacetamida aumentó la QL en 3 a 4 veces con una  $C_{50}$  de 10  $\mu$ M como consecuencia de la disminución del glutatión reducido. Las medidas de la QL y de las actividades enzimáticas demostraron que las alteraciones de las concentraciones del estado estacionario de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el espacio citosólico-peroxisomal son las responsables de los aumentos de la emisión de luz, ya que las drogas utilizadas no fueron capaces de alcanzar el espacio mitocondrial. La medida de la QL demostró ser altamente sensible comparada con la acumulación de malondialdehído (producto terminal de la cadena lipoperoxidativa) y resultó coincidente con las modulaciones de las concentraciones de las especies derivadas del  $O_2^-$ .

EFFECTO IN VIVO E IN VITRO DE LA ACTH SOBRE LA BIOSINTESIS DE LOS ACIDOS GRASOS POLINSATURADOS ADRENALES Y HEPATICOS. (In vivo and in vitro effect of ACTH on adrenal and liver biosynthesis of polyunsaturated fatty acids). Gómez Dumm, I.N.T.de, Mandon, E.C., Marra, C.A. y Alaniz, M.J.T.de. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

Los microsomas suprarrenales y hepáticos de rata poseen una activa  $\Delta 6$  desaturasa para los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico y una  $\Delta 5$  desaturasa para el ácido eicosa-8,11,14-trienoico. La administración de adrenalina al animal entero produce una significativa disminución de la biosíntesis de los ácidos polinsaturados y promueve la liberación de ACTH. En vista de estos datos, el propósito de este trabajo es estudiar in vivo e in vitro la acción de la ACTH sobre la biosíntesis de los ácidos grasos polinsaturados en la glándula suprarrenal y en el hígado. La administración de ACTH a ratas intactas produce una disminución en la desaturación de los ácidos 1-14C linoleico a  $\gamma$ -linolénico, 1-14C  $\alpha$ -linolénico a octadeca-6,9,12,15-tetraenoico y 1-14C eicosa-8,11,14-trienoico a araquidónico en microsomas suprarrenales y hepáticos. Las células adrenocorticales aisladas y los hepatocitos aislados tratados con ACTH muestran una disminución de la incorporación y de la desaturación del ácido eicosa-8,11,14-trienoico agregado al medio de incubación. La adición de ACTH al medio de incubación de células adrenocorticales aisladas de ratas no tratadas produce una inhibición de la biosíntesis del ácido araquidónico. Estos resultados son mimetizados por el dibutilil AMP cíclico. Se postula que el efecto de la ACTH sobre la biosíntesis del ácido araquidónico podría producirse a través de un aumento de los niveles intracelulares de AMP cíclico.

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO INHIBE ACTIVIDAD SECRETORA INDUCIDA POR FORSKOLIN EN GLANDULAS GASTRICAS DE RATA. (EGF inhibits forskolin-induced secretion in rat gastric glands). González, A., Reinicke, K. Fac. de Medicina y Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El forskolin, un diterpeno activador no-hormonal de la enzima adenilato-ciclasa, fue capaz de aumentar varias veces los niveles intracitoplásmicos de AMPc en las glándulas gástricas de estómagos de rata, y de estimular la secreción gástrica de HCl y de pepsinógeno en ratas in vivo. Este efecto secretorio no fue inhibido por atropina, metiamida ni por ablación quirúrgica del antro, en cambio, fue inhibido efectivamente por EGF. Sin embargo, esta hormona no alteró el incremento de la síntesis de AMPc inducida por forskolin en glándulas gástricas aisladas.

Como era de esperar por reportes previos, el EGF también provocó una inhibición de la secreción gástrica de HCl y de pepsinógeno evocada por estímulos tales como histamina, pentagastrina y colinérgicos. En todas las circunstancias estudiadas la respuesta secretoria a los diferentes estímulos fue detectada en ambas secreciones casi simultáneamente, lo cual refleja un funcionamiento de las células oxínticas y zimógenas altamente acoplado en la rata.

Los resultados que presentamos aquí apoyan la hipótesis del rol del AMPc como mensajero intracelular en el proceso secretorio de estas células. Sugieren, además, que el EGF interfiere con el mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción gástrica en etapas posteriores a las que involucran a los receptores de los secretagogos en la membrana plasmática y a los sistemas generadores de AMPc.

**METABOLIZACION BACTERIANA DE COMPUESTOS DIMERICOS MODELO DE LIGNINA.** (Bacterial metabolism of dimeric lignin-model compounds). González, B., Merino, A. y Olave, L. Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

La lignina, junto a la celulosa y hemicelulosa, es un componente fundamental de las estructuras vegetales. Esta molécula es un polímero complejo, amorfo e insoluble formado por monómeros fenilpropanoicos unidos por distintos tipos de enlace. Estas características confieren a la lignina una estructura muy estable y difícil de degradar. En la naturaleza la biodegradación de la lignina es un proceso oxidativo lento llevado a cabo principalmente por hongos. Se ha demostrado recientemente que un hongo, el *Phanerochaete chrysosporium*, posee una ligninasa que cataliza la ruptura de algunos enlaces intermonoméricos. En contraste, la acción que las bacterias tienen sobre la lignina es menos conocida. Por otra parte, para estudiar la biodegradación de lignina es necesaria la utilización de compuestos modelo como monómeros, dímeros, etc. Estos últimos poseen enlaces típicos de la lignina, como arilglicerol- $\beta$ -ariléter ( $\beta$ -O-4) y 1,2-diarilpropano ( $\beta$ -1).

En este trabajo se presenta un estudio microbiológico y bioquímico de la metabolización bacteriana de compuestos modelo de lignina. Se aislaron de suelos cercanos a una industria de la madera, cepas bacterianas capaces de utilizar diversos modelos de lignina como única fuente de carbono y energía. Se las clasificó parcialmente y se determinó la capacidad de crecer en modelos distintos de los utilizados en su aislamiento, midiéndose la turbidez máxima alcanzada por el cultivo en el estado estacionario. Se seleccionaron cepas de buen crecimiento en dos dímeros: guaiacilglicerol- $\beta$ -guaiaciléter ( $\beta$ -O-4) y anisofina ( $\beta$ -1). Se confeccionaron con ellas curvas de crecimiento en diámetro y se determinó, por espectroscopia UV y HPLC, la formación de intermediarios producidos por la ruptura del enlace intermonomérico. En esta presentación se describen también estudios *in vitro*, que demuestran que en un extracto preparado a partir de una cepa bacteriana, existen enzimas que catalizan reacciones de modificación y ruptura de compuestos dimericos. Se ha identificado la presencia de una deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> que modifica el grado de oxidación del carbono alfa de estos dímeros. Un análisis preliminar indica que en el extracto existe, además, una actividad que cataliza la ruptura del enlace intermonomérico.

Financiado por: DIUC y CELULOSA ARAUCO Y CONSTITUCION

**INDUCCION DE SINTESIS DE DNA VIA RECEPTOR BETA ADRENERGICO EN PAROTIDA DE RATON** (Induction of DNA synthesis via  $\beta$ -adrenergic receptor in mouse parotid). González Burgos, M.J. y López Solís, R.O. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Isoproterenol, agonista beta adrenérgico, induce secreción, síntesis de DNA y crecimiento celular en glándula parótida de ratón. El mecanismo molecular involucrado en la inducción de secreción incluye al sistema receptor beta adrenérgico-cAMP. Sin embargo, la inducción de síntesis de DNA ha sido correlacionada con la desialilación de componentes de la membrana plasmática de células acinares y no con el incremento en los niveles de cAMP. Con el fin de establecer si la vía conducente a síntesis de DNA se inicia en el receptor beta adrenérgico, se estudió mediante el bloqueo con propranolol la eventual relación entre receptor beta adrenérgico, desialilación de la membrana plasmática y replicación del DNA nuclear. Los resultados muestran que propranolol bloquea competitivamente la inducción de síntesis de DNA y que aún cuando existe una fracción de ácido siálico de la membrana plasmática que es siempre removida cuando se induce síntesis de DNA, su remoción es independiente de la intensidad de la respuesta. Estos resultados sugieren que la síntesis de DNA requiere de la mediación del receptor beta adrenérgico y que la desialilación de la membrana plasmática es un proceso necesario pero no suficiente para la inducción de síntesis de DNA.

(Proyectos D.I.B. B-2366/8113 y Fondo Nacional de Ciencias).

**ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA PROTEINAS DE MEMBRANA DE GRANULOS NEUROSECRETORIOS** (Polyclonal antibodies against membrane proteins of neurosecretory granules). González, C.B.; Caorsi, C.E.; Berríos, O.T. Instituto de Fisiología, Universidad Austral de Chile.

El transporte, liberación y degradación del material neurosecretorio implica interacciones altamente específicas de la membrana del gránulo neurosecretorio (GNS) con otras estructuras subcelulares. El estudio de la estructura de la membrana podría dar información sobre estas interacciones y su regulación. Una aproximación a este problema es la generación de anticuerpos contra proteínas de la membrana del GNS. En el presente trabajo se purificaron GNS los cuales fueron lisados y las membranas repurificadas por ultracentrifugación. Como marcador de membrana se usó citocromo  $b_{561}$ , el cual es una proteína integral de la membrana del GNS. Se obtuvo una fracción altamente enriquecida en citocromo  $b_{561}$ , que al microscopio electrónico mostró vesículas sin contenido electrodensio. Electroforesis en geles mostró en esta fracción 25 a 30 proteínas de pesos moleculares entre 150 K a 25K. Anticuerpos generados contra un par de 120K dalton fueron por inmunocitoquímica, selectivamente el sistema hipotálamo neurohipofisario, tanto en mamíferos como vertebrados inferiores. Nitrocelulosa conteniendo las proteínas de membrana de gránulos, los cuales habían sido purificados en ausencia de inhibidores de la proteólisis, mostró bandas inmunoreactivas de menor peso molecular que aquella contra los cuales se generó el anticuerpo. Cuando los GNS y membranas fueron purificados en presencia de inhibidores se observó la inmunoreacción en el par de 120 K desapareciendo la reacción en bandas de menor peso molecular. Estos resultados sugieren que los GNS tienen proteínas específicas a este sistema y que éstas están ampliamente distribuidas en la escala filogenética. Por su sensibilidad a enzimas, algunas de estas proteínas estarían expuestas al lado citoplasmático de la membrana del gránulo.

Financiado por proyecto S-83-44 DIUACH.

**OLIGOMERIZACION DE LA PEP CARBOXILASA DE MAIZ INDUCIDA POR NaCl.** (Oligomerization of maize PEP carboxylase induced by NaCl). González, D.H., Wagner, R., Podestá, F.E. y Andreo, C.S. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

Se estudió el efecto de NaCl sobre la actividad y la estructura cuaternaria de la fosfoenolpiruvato carboxilasa de hojas de maíz.

La enzima disuelta en Tris-ClH 50 mM fue sometida a un tratamiento con 200 mM NaCl, y su estructura cuaternaria estudiada por filtración en gel mediante cromatografía líquida de alta presión. A pH 7 se observó una rápida transición de la forma tetramérica nativa hacia la dimerica; mientras que a pH 8 tanto el dímero como el monómero fueron obtenidos, aunque el proceso fue más lento. La disociación observada fue dependiente de la concentración de enzima, aumentando su grado con la dilución de la carboxilasa.

La actividad de la enzima también fue afectada por NaCl en forma dependiente del tiempo, disminuyendo tanto por preincubación con la sal como por el agregado de NaCl al medio de reacción. Se observó una respuesta parcial y rápida a pH 7, mientras que a pH 8 se llegó a valores muy bajos de actividad luego de un tratamiento prolongado. Cuando se ensayó el efecto de NaCl sobre la PEP carboxilasa en presencia de todos los sustratos, se observó una protección dependiente de la concentración de PEP.

El activador glucosa-6-fosfato protegió contra la caída de actividad, pero no se observaron cambios en la sensibilidad a este efector.

COLÁGENOS FIBRILARES Y SU REACCIÓN CON EL N-METIL BENZO TIAZOLIDON HIDRAZONA (MBTH). (Fibrillar collagens and its reaction with N-methyl benzothiazolone hydrazone). González, E., Adames, H. y Guajardo, R. Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias Pecuarias, Universidad de Chile.

El reactivo N-Metil benzotiazolidon hidrazona (MBTH), específico para grupos aldehídos, se ha usado para desarrollar una reacción de tinción del colágeno, molécula que posee estos grupos químicos libres o formando entrelazos intra o intermoleculares. En tinciones de tejidos congelados se ha observado una asociación entre color y tipo genético de colágeno, dada probablemente por diferentes estructuras reaccionantes. Como una aproximación al esclarecimiento de estas estructuras se estudia la reacción con colágenos extraídos.

Se realizaron extracciones de los colágenos tipo I, II y III de piel fetal y cartílago nasal bovino, obteniéndose los liofilizados correspondientes; éstos se caracterizaron como colágenos por determinaciones de grupos aldehídos, prolina, hidroxiprolina y electroforesis en poliacrilamida-SDS, con y sin reductor DTT. Se realizó la reacción de tinción con MBTH y el color fue registrado fotográficamente.

Se observa una reacción con un producto de color característico en los liofilizados de colágenos de distinto tipo genético, caracterizados así por su comportamiento electroforético. El estudio espectrofotométrico posterior de esta reacción, así como la separación de los distintos componentes coloreados, permitirá una caracterización de las estructuras que constituyen los entrelazos de los colágenos de distinto tipo.

Financiamiento Proyecto A-2027, DIB.

PIRUVATO QUINASA DE LEVADURA: ROL DE UN RESIDUO DE LISINA ANALIZADO POR MUTAGÉNESIS SITIO-ESPECÍFICA. (Yeast pyruvate kinase: role of a lysine analyzed by site-specific mutagenesis). González, E., Gómez, I., Imaizumi, M., Guixé, V. y Venegas, A. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

La piruvato quinasa cataliza una etapa clave de la vía glicolítica: la conversión de PEP en piruvato y de ADP en ATP. Numerosa evidencia señala la participación esencial de una lisina específica en el sitio de unión de nucleótido de las piruvato quinasa aisladas de músculo (tipo M<sub>1</sub>). La comparación de la estructura primaria de la enzima de levadura con las determinadas para varias enzimas tipo M<sub>1</sub> sugieren un rol análogo para Lys<sup>337</sup> de la piruvato quinasa de levadura (YPK). La aplicación de la metodología de mutagénesis sitio-específica por oligonucleótidos sintéticos, conjuntamente con manipulaciones *in vitro* del gen que codifica para YPK, nos ha permitido obtener mutantes para esta enzima, en los que Lys<sup>337</sup> ha sido reemplazada por Glu, Leu o Arg.

En extractos crudos de cepas mutantes, la actividad de YPK corresponde a aproximadamente un 20% de la detectada en la cepa control. Tal disminución en la actividad no es debida a una modificación de la respuesta de las enzimas mutadas al efector alostérico fructosa-1,6-bisfosfato. Las mutantes de YPK mencionadas presentan una alteración en su comportamiento cromatográfico, la que se puede correlacionar con la drasticidad de la modificación introducida en la estructura primaria de YPK. Las enzimas han sido purificadas y se han determinado algunos parámetros cinéticos tales como S<sub>0.5</sub> para PEP y ADP, coeficiente de Hill (n<sub>H</sub>), activación por fructosa-1,6-bisfosfato. Los valores obtenidos para las mutantes de YPK, no son significativamente diferentes a los determinados para la enzima tipo silvestre. Los resultados obtenidos en este estudio establecen que Lys<sup>337</sup> no es un residuo esencial para la actividad catalítica de YPK y abre un paréntesis de duda acerca de lo ya determinado para las enzimas tipo M<sub>1</sub>.

Financiado por DIUC 66/84, FNUD-UNESCO y Fondecyt.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA ESPERMATOZOIDES EN INDIVIDUOS VASECTOMIZADOS (Characterization of immune response against spermatozoa in vasectomized men) Fernando González y Luz P. Blanco Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: María I. Becker)

Uno de los problemas fundamentales en el estudio de la infertilidad humana con causa inmunológica, es el desconocimiento de la estructura y función de la mayoría de los antígenos espermáticos. Los espermatozoides, normalmente, se encuentran secuestrados del sistema inmune por la barrera hematotesticular, la cual es rota en el procedimiento quirúrgico usado en la vasectomía, esto libera espermatozoides que estimulan la producción de anticuerpos contra ellos.

En este trabajo hemos utilizado como herramienta para identificar y caracterizar auto-antígenos espermáticos suero de pacientes vasectomizados.

El análisis por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en espermatozoides, con muestras de suero provenientes de individuos vasectomizados con data quirúrgica de hasta 3 meses indicó, que el 28% del total de sueros probados son positivos por este criterio y además presentan mayoritariamente un patrón de fluorescencia en la región acrosomal y/o ecuatorial de los espermatozoides.

Con el propósito de identificar el blanco molecular de dichos anticuerpos, las muestras de suero consideradas positivas por IFI, se ensayaron por la técnica de *Western Blotting* contra polipéptidos presentes en un extracto de proteínas de membrana de espermatozoides. Se observaron bandas inmunoreactivas entre 30 y 90 K, y además, se observaron bandas inespecíficas.

En resumen aproximadamente un tercio de los individuos de hasta tres meses después de vasectomizados desarrollan anticuerpos contra sus propios espermatozoides; además, la metodología empleada permite observar diferencias individuales cualitativas y cuantitativas en la respuesta anti-espermática.

Financiado por Grant IDRC 3-P-83-1006-01.

INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA EN PRODUCTOS NATURALES DE LA FLORA AUTOCTONA DEL NORTE CHILENO (Investigation of tripanocidal activity in natural products of the autochthonous flora of the North of Chile). González, J., Sagua, H., Estrada, M., Pereira, J., Araya, J., Morales, G. y Loyola, L. Grupo de Parasitología y Laboratorio de Productos Naturales. Universidad de Antofagasta (Patrocinio: M. Cikutovic)

Actualmente, se acepta que *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, puede ser transmitido mediante transfusión sanguínea, constituyendo éste el principal mecanismo de infección en sectores urbanos de áreas endémicas. Por ello, es necesario valorar antiguas y nuevas drogas que aparte de su efecto tripanocida, reúnan otras características que avalen su uso en la quimioprofilaxis de esta zoonosis, como ser de bajo costo, solubles, no presentar efectos adversos al ser transfundidas y no provocar efectos deletéreos en la serie roja.

Con el propósito de evaluar "in vitro", la actividad tripanocida de compuestos orgánicos aislados de especies de la flora autóctona del norte chileno, se presenta un "screening" practicado sobre 25 compuestos, los cuales fueron valorados según el método descrito por Cover y Gutteridge (1982).

Una marcada actividad tripanocida, se observó en dos derivados de *Bacharis boliviensis*, PN-3 y PN-58 y en un derivado de *Parastrephia cuadrangularis*, Pq-B5A. Efecto tripanocida moderado pudo constatarse en dos derivados de *Senecio graveolens*, SG-IV y SG-V; dos derivados de *Chersedoma jodopappa*, Chj-A y Chj-B, y en derivados de *Bacharis boliviensis* BB7-12; *Molinum crasifolium*, MC-2; *Senecio rosmarinus*, SR-I y *Chondrus canaliculatum*, Ch-CI. Leve actividad tripanocida se observó en un derivado de *Senecio phylloleptus*, SP-I.

La eventual posibilidad que derivados orgánicos vegetales, se utilicen en la quimioprofilaxis de la enfermedad de Chagas post-transfusional, es aquí discutida.

**FOSFORILACION DE PROTEINAS Y SECRECION DE HCl.**  
(Protein phosphorylation and HCl secretion).  
González, P.R. Lab. de Bioquímica, Universidad de Santiago de Chile y Lab. de Histología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La fosforilación es uno de los mecanismos regulatorios de la función de proteínas incluyendo aquellas que forman parte del citoesqueleto.

Durante la secreción del HCl, en las células oxínticas, los cambios topográficos que ocurren en el polo apical, dependen de modulares que, a cierto plazo modifican las interrelaciones de proteínas citoesqueléticas. Hemos implementado un sistema *in vitro* que nos permite estudiar si la fosforilación de proteínas es una instancia primaria en la regulación de este fenómeno.

Glándulas o células de estómago de rata son homogeneizadas con tampón de gelificación. 1 mL del sobrenadante de 100.000 g por 60 min. es incubado con 500 microCuries de ATP-gamma P(32) en presencia de 2uL de membranas suspendidas en el mismo tampón. Luego de incubar a 37 grados C se forma un gel que puede recogerse por centrifugación. Este gel, operacionalmente, está definido como citoesqueleto.

Una proteína de 43 KDa, muy similar a la actina es fosforilada por una quinasa endógena de las membranas de las células gástricas. Esta quinasa, al parecer, es típica de estas membranas ya que en experimentos de reconstitución heterólogos usando membranas de hepatocitos o de cerebro, no se fosforila la actina; sin embargo las membranas de glándula fosforilan actina exógena. Hemos caracterizado esta proteína por electroforesis, HPLC e inmunodetección. La proteína de 43 KDa fosforilada, residiría en la fracción de membrana.

Financiado por DICYT, DIUC y apoyo especial de Merck Química Chilena S.L.

**ATRIBUTOS DEMOGRAFICOS DE MIGRANTES EN AKODON OLIVACEUS Y ORYZOMYS LONGICAUDATUS EN ZONA BOSCOSEA DEL SUR DE CHILE.** (Dispersers demographic attributes of *A. olivaceus* and *O. longicaudatus* populations in southern Chilean forest). González, L.A., Murúa, R. y Jofré, C. Instituto de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La migración es un fenómeno de importancia en la micro y macro distribución geográfica de las especies y de fuertes consecuencias demográficas en la población.

El presente estudio pretende establecer las relaciones entre la densidad y el número de migrantes y los atributos demográficos de residentes y migrantes en poblaciones de *A. olivaceus* y *O. longicaudatus*.

El área de estudio se localiza en el Bosque Experimental San Martín, Valdivia, Chile entre Marzo de 1982 y Abril de 1984. El diseño comprendió un retículo central (1,2 has, 12x12 trampas Sherman) y 12 retículos de dispersión (0,09 has de 4x4 trampas) agrupados de a tres en línea en dirección de los 4 puntos cardinales.

*O. longicaudatus* muestra una asociación significativa entre la densidad y el número de migrantes en su ciclo anual, en cambio *A. olivaceus* sólo en algunas fases del ciclo.

En *A. olivaceus* los migrantes presentaron un mayor peso tanto en machos como hembras con predominio de machos en 1982; en cambio en 1983 no hubieron diferencias significativas de peso con los residentes, y la proporción de sexos fue cercana a 1:1. En *O. longicaudatus* se observó un mayor peso en las hembras inmigrantes y machos emigrantes sin diferencia en la proporción de sexos en el año 1982; en cambio en 1983 se observa una mayor proporción de machos, no mostrándose diferencias significativas en el peso.

(Financiado por Proyecto RS-82-17 de la D.I.D., U.A.CH.)

**RAICES PROTEIFORMES EN LA FLORA CHILENA.** (Proteoid roots of the Chilean flora). Grinbergs, J., Valenzuela, E., Contreras, D. y Ramírez, C. Institutos de Microbiología y Botánica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Las raíces proteiformes son una proliferación anormal de raicillas en Proteáceas, que aumentan así su superficie de absorción. El presente trabajo da cuenta de estudios realizados en material chileno, tendientes a delimitar el fenómeno y dilucidar su origen.

Se prospectaron las especies chilenas de Proteáceas, cuantificando la frecuencia y el tamaño de los nódulos. Se realizaron estudios morfológicos e histológicos en raíces proteiformes de *Gevuina avellana*, cuya germinación fue previamente investigada.

Este fenómeno está presente en todas las especies de Proteáceas chilenas, aunque no siempre en todos los individuos. El tamaño y la forma de los nódulos es un carácter específico. Sin pericarpo y en condiciones estériles se logró más de un 90% de germinación de *Gevuina avellana*. En las plántulas la formación de nódulos se inicia una vez que han caído los cotiledones y se hace abundante después de los 140 días. Se constató una enorme variación en el número de nódulos, que depende de la naturaleza del sustrato y de la edad de la planta. El tamaño de los nódulos y su disposición difieren considerablemente en individuos juveniles y adultos de la misma especie. Los nódulos presentan una vida activa corta y después de envejecer se disgregan perdiendo su capacidad de aglomerar suelo.

Proyectos: FONDECYT Nº 1038/85 y DID-UACH Nº S-85-27.

**SINGLE CHANNEL FLUCTUATIONS FROM BONE CELLS: EVIDENCE FOR Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> AND K<sup>+</sup> PERMEABILITIES.** Guggino, Sandra, E. and Sacktor, B. National Institute on Aging, NIH, Baltimore Maryland 21224, U.S.A. (Patrocinio: Elisa Marusic).

The influence of hormones on the electroconductive properties and Ca<sup>2+</sup> metabolism of bone has only recently received attention but the ion channels which are responsible for cell conductances remain to be investigated. The patch-clamp technique was used to characterize the channels present in an osteoblast-like cell culture, the clonal rat osteosarcoma cell line R5 17/2. The most frequently occurring channel in excised patches from R5 cells is a Na<sup>+</sup> conducting channel with a single channel conductance of 12 pS which decreases to 4 pS in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions which also alter channel kinetics. D888-verapamil, 1 uM, decreases the fractional open time. A larger channel of 30 pS conducting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> equally well is observed less frequently and probably accounts for the 35 pS inward currents observed in cell-attached patches with K<sup>+</sup> Ringer in the pipette. Under these conditions, and inward current of 51 pS is also observed. However, channels which are solely K<sup>+</sup> selective are not observed in excised patches suggesting inactivation upon excision. We conclude that R5 cells display channels which can contribute to monovalent cation conductances. In addition, R5 cells possess a small channel resembling the Ca<sup>2+</sup> channels found in excitable tissues. Future studies will determine if these channels are involved in hormonally regulated Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

FOSFOLIPIDOS DEL SISTEMA RETINO-TECTAL DEL POLLO EN RE-LACION A LA ESTIMULACION LUMINOSA. (Changes in chicken retina and optic tectum phospholipids by light stimulation). Guido, M.E. y Caputto, B.L.  
 Dto. Química Biológica, CIQUIBIC, Fac. de Ciencias Químicas, CONICET, Universidad Nac. Córdoba, Córdoba, Arg.

La luz incrementa la síntesis in vivo de los gangliósidos del sistema retino-tectal del pollo. Se estudió la marcación de fosfolípidos (FL) de dicho sistema en animales en luz (L) y oscuridad (O) luego de inyectar  $^{32}P$  intraocularmente. Se encontraron los siguientes resultados 5 h posteriores a la inyección: FL de células ganglionares de retina (cpm/mg prot): L:6067(32); O:4017(34),  $\Delta\%51, p < 0,001$ . Frac. ácido soluble ( $^{32}P$ -precursores) (cpm/mg prot) L:594762(30); O:612599(35)  $\Delta\% -3$ , n.s. FL de tectum contralateral (cpm/tectum): L:1555(35); O:1005(32),  $\Delta\%55, p < 0,001$ . No se encontraron diferencias significativas en la marcación en L y O de los FL del tectum ipsilateral al ojo inyectado ni en la fracción ácido soluble del tectum de los 2 grupos de animales. Para saber si las diferencias encontradas son debidas a un aumento en la radiactividad específica de los precursores en las células ganglionares, se estudió la captación de los mismos a 30 min en L y O. No se encontraron diferencias ni en los FL ni en los precursores (FL: L:858(32) O:834(29); fracción ácido soluble: L:176199(38); O:171480(38). Las diferencias L-O a 5 h no estarían determinadas por cambios tempranos en los precursores. Para saber si la marcación de FL en tectum llega por transporte axonal se determinó la relación: FL tectum contralateral - FL tectum ipsilateral/FL tectum ipsilateral en animales en L y O encontrándose: L:5,1(33); O:2,8(32),  $\Delta\%80, p < 0,001$  indicando que la marcación de los FL proviene fundamentalmente de la retina. Se está estudiando si todos los FL son responsables de los cambios observados o solo alguno de ellos.

ACERCA DE LAS RELACIONES ENTRE VELOCIDAD, LONGITUD Y TIEMPO EN BIOLOGIA (On the relationships between velocity, length and time in biology). Günther, B. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

El espacio y el tiempo "absolutos" (Newton), así como el espacio-tiempo cuadrídimensional (Einstein), se contraponen al concepto de espacio y de tiempo "relacionales" (Leibniz), que es aplicable a los seres vivos.

En el presente análisis se postula, que en Biología la velocidad ( $v=L/T$ ) es el parámetro principal, y que longitud ( $L=vT$ ) y tiempo ( $T=L/v$ ) son variables "relacionales" en función de la velocidad ( $v$ ). En la selección natural priman las velocidades relacionales -entre predador y presa- como factor de supervivencia. El carácter "relacional" de las tres variables ( $L, T, v$ ) también es aplicable a la métrica espacio-temporal de cada ser vivo, la que a su vez es función de la masa ( $M$ ) o del peso ( $W$ ) corporal. El análisis empírico de estas relaciones se puede expresar por medio de la ecuación alométrica de Huxley ( $Y=aw^b$ ), siendo  $Y$ = variable espacio-temporal;  $a$ = parámetro empírico,  $b$ = exponente, que se puede calcular a priori para cada función, de acuerdo a tres teorías de similitud biológica (Arch. Biol. Med. Exper. 19: 67-75, 1986), siendo el exponente alométrico ( $b$ ) para un "período biológico" igual a 1/6 para la similitud gravitacional,  $b=1/4$  para la electrodinámica, y  $b=1/2$  para la cuántica.

NUCLEOPARTICULAS OBTENIDAS POR LA ACCION DE NUCLEASAS SOBRE NUCLEOS DE GAMETOS Y EMBRIONES DE ERIZO DE MAR *Tetrapygus niger*. (Nucleoparticles derived from nucleases digestion of nuclei from gametes and embryos of the sea urchin *Tetrapygus niger*). Gutiérrez, S., Inostroza, D., Imshenetzky, M., Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Durante los primeros estados de embriogénesis de erizo de mar ocurren cambios en la población de nucleosomas, que han sido puestos en evidencia por digestión con nucleasa micrococcal, observándose diferentes tamaños de fragmentos de ADN comprometidos en nucleopartículas en los diferentes estados de desarrollo.

Con el objeto de obtener evidencias sobre las nucleopartículas presentes en los diferentes estados embrionarios, se digirió nucleos de espermatozoides, ovocitos y larvas pluteus con nucleasas micrococcal y endógena respectivamente, los productos de digestión fueron analizados en geles de agarosa. Se aisló las partículas nucleoproteicas de ovocitos y de espermatozoides investigándose las proteínas que las conforman por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS.

Los resultados obtenidos indican que las nucleopartículas presentes en ovocitos difieren de las existentes en larvas pluteus y espermatozoides, tanto en su migración electroforética como en las proteínas que las conforman. En espermatozoides se observaron las cinco histonas fundamentales en cambio en ovocitos se detectó la presencia de siete fracciones proteicas que comigran en geles PAG/SDS con las siete variantes tipo CS obtenidas de cromatina por extracción directa.

Proyectos: 20.31.06 DI Universidad de Concepción  
1082/85 FONDECYT

EFFECTOS HEMODINAMICOS DE LA INFUSION RAPIDA DE SUERO FISIOLOGICO EN TAPONAMIENTO CARDIACO EXPERIMENTAL. (Hemodynamic effects of rapid intravenous saline infusion on experimental cardiac tamponade). Gyhra, A., Torres, P., Prieto, L., Bravo, M.C. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina y Laboratorio Cirugía Experimental, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Con el objeto de estudiar los efectos hemodinámicos de la infusión rápida de suero fisiológico (SF) intravenoso (I/V), se inyectaron 1500 cc de SF en 3 grupos de perros (20-30 kgs.) en 40 minutos.

Grupo A(n=4) perros normales, control; Grupo B(n=4) tapados con SF intrapericárdico a una presión de 9 mmHg; Grupo C(n=9) taponamiento producido por herida estandarizada en ventrículo derecho. Se monitorizaron en forma continua durante la infusión, los siguientes parámetros: Presión venosa central (PVC), Presión arterial media (PAM), Presión pericárdica (PP) y Débito Cardíaco (DC). En los Grupos A y B el comportamiento hemodinámico es relativamente similar, comprobándose un incremento significativo de la PVC, PAM y DC ( $p < 0,01$ ), la PP no varió significativamente de sus valores iniciales. En el Grupo C en cambio, DC y PAM no aumentan en forma significativa ( $p > 0,05$ ) y sólo lo hacen la PVC y PP de 11.6±2.9 a 25.6±2.2 cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,001$ ) y de 8.5±3.2 a 18±3.1 mmHg ( $p < 0,01$ ) respectivamente. Un perro muere durante la infusión con 750 cc de SF I/V a los 25 minutos. La infusión rápida de volumen en taponamiento cardíaco producido por herida ventricular no mejora significativamente la hemodinamia, pudiendo agravar el cuadro de taponamiento, lo que puede traducirse en paro cardíaco por incremento exagerado de la presión pericárdica.

Financiamiento Proyecto N° 21.01.03.  
Proyecto Dirección de Investigación. Universidad de C.

ACCION TERATOGENA DEL DDT EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Caudiverbera caudiverbera* (LINNE, 1758) (ANURA, LEPTODACTYLIDAE). (Teratogenic action of DDT on the development of *C. caudiverbera* (Linné, 1758). (Anura, Leptodactylidae). Hermosilla, I. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

El DDT es un insecticida organoclorado de metabolismo muy lento, de elevada liposolubilidad y alta persistencia en el ambiente. Estas características lo convierten en un compuesto altamente tóxico. La propiedad de evaporarse directamente desde las plantas o del suelo para ser transportado a grandes distancias, determina un radio de acción extraordinariamente amplio, que puede contaminar el aire, el agua y los alimentos, razón por la cual la perturbación de ecosistemas puede ser notablemente dañina y perdurable.

A la vista de estos antecedentes y motivados por la discusión mundial sobre la convivencia o no del uso del DDT y otros organoclorados, y dado que el DDT es el único organoclorado que está prohibido en Chile a contar de Enero de 1985, en el presente trabajo se evalúa el efecto embriotóxico del DDT en estados embrionales de *C. caudiverbera*, anfibio endémico chileno. Los resultados indican que el DDT en proporción a las concentraciones ensayadas de 0,1; 1; 5 y 10 ppm, es altamente embriotóxico en estados de Placa Neural a Circulación Caudal.

Se analiza la modalidad de malformaciones aparecidas en el tiempo a las concentraciones de DDT ensayadas y se establece el efecto del insecticida sobre el crecimiento promedio de los embriones respecto a los controles.

Proyecto 20.31.13 Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

TOXICIDAD DEL ETIL-PARATHION Y CARBARILO SOBRE ESTADIOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO DEL ERIZO DE MAR. (Toxicity of ethyl-parathion and carbaryl on early stages of the development of sea urchin). Hernández, D.A., Lombardo, R.J., Ferrari, L., Tortorelli, M.C. Departamento de Cs. Básicas, Universidad Nacional de Luján y Departamento de Cs. Biológicas, Universidad de Buenos Aires.

La restricción en el uso de compuestos clorados para el control de plagas ha conducido a la aplicación intensiva de fosforados y carbamatos, siendo el etil-parathion (ETP) y el carbaryl (CARB) los más frecuentemente usados. Este trabajo forma parte de una serie de estudios de los efectos de insecticidas sobre los estadios más sensibles del desarrollo de organismos acuáticos de consumo humano, tales como el erizo de mar *Pseudochinus magellanicus* (Philippi).

Los animales de prueba fueron colectados en el canal Beagle (Argentina). Las gametas fueron obtenidas por el método del CLK. Se realizó un ensayo estático de toxicidad, hasta alcanzar el estadio pluteus (P1). Se probaron 5 concentraciones de cada plaguicida puro (5.6, 10, 18, 32 y 56 ppb). Se efectuaron simultáneamente ensayos control con acetona (1-5 ppb). Todos los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura, salinidad y pH y por duplicado. La CE50 se determinó por el método probit.

Se observó un marcado efecto tóxico de estos plaguicidas. Para el ETP las CE50 de los estadios blástula (Bl) y gástrula (Gs) fueron similares (38.8 y 34.6 ppb), mientras que para el estadio prisma (Pr) fue significativamente menor (2.8 ppb). En el caso del CARB los estadios Bl y Gs fueron más sensibles (6.3 y 10.6 ppb) que Pr y P1, donde la CE50 fue significativamente mayor (hasta 157 ppb). Esta diferencia en la respuesta a los plaguicidas ensayados probablemente esté asociada a la penetración y los procesos de biotransformación, relacionados con el sistema de citocromo-oxidases.

ECOTOXICOLOGIA DE HERBICIDAS: TOXICIDAD AGUDA DE UN FORMULADO DE PARAQUAT SOBRE JUVENILES DE BAGRE SAPO. (Ecotoxicology of herbicides: Acute toxicity of formulated paraquat on South American catfish). Hernández, D.A., Ferrari, L., Tortorelli, M.C. y Salibián, A. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Bs.As.

El paraquat (PQ) es uno de los herbicidas de amplio espectro que más se utilizan, tanto en agroecosistemas como en ambientes acuáticos.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la toxicidad de un formulado líquido de PQ ("Osaquat") con 27.6% de principio activo sobre juveniles de 10 días de bagre sape (BS), teleosteo dulceacuicola cuyo cultivo semi-intensivo se propicia actualmente en la Argentina. Se realizó un ensayo semi-estático de toxicidad aguda de 120 hs de duración, probando las siguientes concentraciones: 2.2, 4.4, 8.8 y 11.0 ppm. Simultáneamente se realizaron ensayos control. Todos los ensayos se efectuaron por duplicado a  $17 \pm 1$  °C, en agua dulce artificial. Los valores de CL50 fueron estimados con el método probit. El formulado de PQ mostró ser tóxico para los juveniles de Bs en concentraciones entre 4.4 y 7.3 ppm. Los resultados mostraron que la toxicidad del PQ seguiría un modelo similar en el período 48-96 hs; a las 120 hs se registró un descenso importante en la CL50 (4.4 ppm). Considerando las dosis de aplicación recomendadas para ambientes acuáticos, el tiempo de disipación y las CL50 halladas, se considera que las aplicaciones intensivas del PQ podrían constituir un riesgo ecotoxicológico para poblaciones naturales no destinatarias, tales como el bagre sape.

CARACTERIZACION PARCIAL DEL SITIO DE UNION DE ADP DE LA PIRUVATO QUINASA DE LEVADURA. (Partial characterization of the ADP binding site of Yeast pyruvate kinase). Hinrichsen, P. y Ezaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

La piruvato quinasa cataliza la transferencia de un grupo fosfato desde el fosfo-enol piruvato hasta el ADP, generando ATP y piruvato, etapa regulatoria clave en la vía glicolítica.

Estudios previos en nuestro laboratorio han sugerido que el residuo de Lys<sup>337</sup> de la enzima de levadura estaría relacionado con la unión del ADP. En este trabajo se amplía el análisis de este tipo de residuos mediante el uso de un reactivo bifuncional, sintetizado en el laboratorio a partir de fosfato de piridoxal (PLP), el bis-PLP. Estos compuestos presentan la ventaja de ser capaces de generar reacciones inter o intramoleculares, lo que puede aportar importante información estructural.

El PLP sus derivados producen una inactivación rápida y estable, reversible al agregar lisina-HCl al medio, reversion que no se observó al estabilizar la base de Schiff intermediaria con un agente reductor, como NaBH<sub>4</sub>. El ADP-Mg<sup>2+</sup> protegió casi totalmente a la enzima de la inactivación, no así el PEF. La enzima, inactivada hasta un 15% de actividad residual, mostró una estequiometría de marcación de 2 moles de bis-PLP/mol de tetramero y en estas condiciones no se observaron reacciones de entrecruzamiento de subunidades. Además, el bis-PLP se unió sólo por uno de sus extremos. Estos datos, más el efecto de otros derivados de piridoxal, con distintos tamaño y carga, sugieren que la inactivación observada se debe a un "bloqueo" del sitio activo, dado conjuntamente por impedimento estérico y repulsión electrostática. Finalmente, la caracterización de un péptido producto del digerido triptico de la enzima modificada, permitieron concluir que el residuo Lys<sup>337</sup> está relacionado con el sitio de unión del ADP.

Por otra parte, se determinó que al modificar un único residuo de arginina la enzima perdía toda capacidad catalítica. Esta inactivación se previno usando ADP-Mg<sup>2+</sup>, por lo que sería de gran interés ubicar su posición en la secuencia, debido a la necesaria proximidad espacial que debiera existir con la Lys<sup>337</sup>.

Financiado por Proyecto DIUC 75-84.

**NIVELES TOTALES DE SUBCLASES DE IgG Y RESISTENCIA A LA INFECCION POR T. CRUZI EN EL RATON.** (IgG subclass serum level and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice). Hoecker, G., Juri, M. A., Alonso, P. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Un factor mayor de resistencia contra la infección aguda por *T. cruzi* en el ratón está ligado a H-2 (Trischman, et al, 1982; Gajardo et al, 1983). Los animales resistentes, B10(H-2<sup>k</sup>) y A.SW (H-2<sup>s</sup>), sobreviven 60 días o indefinidamente a la inoculación i.p. de 10<sup>4</sup> trypomastigotes sanguíneos. Su respuesta en anticuerpos anti *T. cruzi* aumenta continuamente y la parasitemia muestra en forma concomitante una disminución después del día 8 p.i. En iguales condiciones las cepas congénicas, susceptibles correspondientes, B10.Br (H-2<sup>k</sup>) o A.CA (H-2<sup>f</sup>) y los ratones susceptibles no congénicos C3H (H-2<sup>k</sup>), muestran un nivel total de IgG menores y aumentos continuos de la parasitemia hasta su muerte entre 14 y 20 días p.i. Los ratones B10 y A.SW tienen cantidades significativamente mayores de IgG2b que sus pares congénicos susceptibles B10.Br y A.CA respectivamente. C3H también tiene un nivel bajo de IgG2b.

Trabajo apoyado por Grant UNDP/World Bank/WHO/TDR ID 820599.

**EFFECTO DE LA ESTREPTOMICINA EN LA N-GLICOSILACION DE PROTEINAS EN EL SNC.** (Effect of streptomycin on protein glycosylation in the SNC). Idoyaga-Vargas V., Alperin M., Rossi S. y Carminatti H. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" Antonio Machado 151, /1405 Buenos Aires, Argentina.

La estreptomycin es un amino-glicósido que se ha usado en la terapéutica de infecciones provocada por diferentes agentes bacterianos. En algunos casos se ha descrito lesiones localizadas en el SNC (por ejemplo lesión del nervio acústico y del nervio óptico). Aunque se conoce su mecanismo de acción en procariotes, a nivel molecular su efecto en eucariotes es hasta el presente desconocido.

Para encarar este problema, se midió el efecto del antibiótico en la velocidad de glicosilación de proteínas en corteza cerebral de ratas de distintas edades dentro del primer mes del desarrollo. Se utilizó el micrométodo de incubación de partículas, anteriormente desarrolladas en este laboratorio (PAABS-1984), usando manosa (2-<sup>3</sup>H) como precursor. Se observó una marcada inhibición, dosis dependiente, en las partículas de corteza cerebral proveniente de ratas de 0 y 5 días. Este efecto inhibitorio es menor en las ratas maduras (30 días). A continuación se midió la incorporación de leucina (<sup>3</sup>H) a proteína. Se observaron resultados similares a los obtenidos en el estudio de la glicosilación. Además se midió en animales de 5 y 30 días el efecto de este antibiótico en la síntesis de proteínas en partículas de corteza cerebral y de hígado. Aunque en el hígado de 5 días se observó una cierta inhibición, en el de 30 días la síntesis de proteína no se ve afectada.

**Balace de energía de un bosque adulto de Pinus radiata.** (The heat balance of a adult *Pinus radiata* forest). Huber, A., Oyarzún, C., Instituto de Geociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La mayor parte de la energía solar que llega y queda en un bosque (balance de radiación) se utiliza en la evaporación (flujo calor calor latente) y el calentamiento del aire (flujo del calor sensible). Cantidades menores son utilizadas para el calentamiento del suelo y de la cubierta vegetal.

Se determinó para 2 días de verano, 19, 20 enero 1986, el curso diario de los diferentes componentes del balance de energía para un bosque adulto de *Pinus radiata*. Para ello se utilizó el método de Sverdrup y Bowen y disponiendo de la información del perfil vertical de la temperatura y tensión de vapor de agua del aire, perfil vertical de la temperatura del suelo, balance de radiación y ventilación por hora.

La radiación retenida por el bosque para los 2 días estudiados fue de 486,3 y 489,7 cal cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup>, utilizándose 286,1 cal cm<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup> (59%) y 308 cal cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup> (63%) para el flujo de calor latente, 180,8 cal cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup> (37%), 172,9 cal cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup> (35%) en el flujo de calor sensible respectivamente. Por los cambios de temperatura del suelo y de la biomasa se utilizaron 8,2 y 6,8 cal cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup> y 11,2 y 2,2 cm<sup>-2</sup>día<sup>-1</sup> respectivamente, montos que no sobre pasaron el 4% de la energía total disipada.

El bosque disipó la mayor cantidad de energía a través de los fenómenos evapotranspirativos con montos que alcanzaron los 4,8 y 5,3 mm/día para los dos días.

Proyecto RS-83-14 Dirección de Investigación y Desarrollo. U.A.CH.

**EFFECTO DEL FOSFATO DE PIRIDOXAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ALA-D DE HIGADO PORCINO.** L.E. Ifigo, A.M. Ferramola de Sancovich y H.A. Sancovich. Laboratorio de Porfirinas, Dpto. de Qca. Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Nat. U.B.A. Argentina.

La enzima 5-amino levúlico dehidrasa (ALA-D) (E.C.4.2.1.24) cataliza la formación de porfobilinógeno (PBG) primer intermediario pirrólico en la biosíntesis del hemo, clorofilas y otros tetrapirroles.

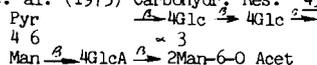
El estudio de la ALA-D en diferentes tejidos ha demostrado la intervención de residuos de amino ácidos tales como cisteína, histidina y lisina en su mecanismo de reacción.

En esta investigación se muestran los efectos de la presencia del 5' Fosfato de Piridoxal (PPy) sobre la actividad de la ALA-D de hígado porcino. Se encontró que concentraciones de PPy superiores a 1,5 mM producen un 100% de inhibición de la actividad de la enzima tratándose esta de una inhibición competitiva con un Ki: 0,01 mM.

Se encontró además que la inhibición por PPy es revertida por eliminación del mismo por diálisis ó pasaje a través de una columna de Sep.G-25. Pero esta inhibición resulta permanente si previa a la diálisis, en presencia de PPy la ALA-D es tratada con NaBH<sub>4</sub>. La presencia de PPy disminuyó casi totalmente la unión estable de ALA-<sup>14</sup>C a la ALA-D cuando está mezcla fue tratada con NaBH<sub>4</sub>. Todos estos datos proveen evidencias de la presencia esencial de un residuo lisina en la actividad de la ALA-D de hígado porcino y que estaría involucrado en la formación de una base Schiff con el sustrato, ALA.

SINTESIS IN VITRO DE XANTANO. AISLACION DE OLIGOMEROS. (Xanthan gum biosynthesis, Isolation of oligomers). Iñón de Iannino, N. y Dankert, M.A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y CONICET, Buenos Aires, ARGENTINA.

El xantano es un exopolisacárido (EPS) de gran interés industrial producido por Xanthomonas campestris. La estructura de su unidad repetitiva es la siguiente (Jansson et. al. (1975) Carbohydr. Res. 45, 275-282).



En nuestro laboratorio, utilizando los respectivos nucleótido azúcares, se ha logrado la síntesis in vitro de este EPS, y se ha demostrado que ocurre en dos etapas (Ielpi et al. (1981) FEBS Lett 130, 253-256): en la 1.ª el pentasacárido que constituye la unidad repetitiva se forma secuencialmente, unido a un lípido a través de un puente difosfato. Los restos acetil piruvato y acetato provienen de PEP y Ac-CoA respectivamente y también se incorporan a este nivel (Ielpi et al. (1981) Biochim. Biophys. Res. Commun. 102, 1400-1408 y (1982) Biochem. Internat. 6, 323-333). Todos estos compuestos son solubles en cloroformo-metanol-agua 1:2:0,3 (extracto 1203). En una segunda etapa la unidad repetitiva se polimeriza para formar el EPS que libera al medio acuoso. Se está estudiando ahora este 2.º proceso. En los extractos 1203 se han detectado pequeñas cantidades de compuestos de mayor tamaño, presumiblemente deca-sacáridos difosfato-lípido. Análogamente, en la fracción soluble en agua, por filtración por geles se han encontrado dos grupos de compuestos. Una de alto PM que comprende al xantano formado; y otra de bajo PM. En esta última fracción por cromatografía, electroforesis, filtración por geles, eliminación de acetil piruvatos, etc. se han detectado oligosacáridos similares a los obtenidos del extracto 1203: la unidad repetitiva y deca-sacáridos con diferente grado de piruvilación.

CITOQUIMICA DEL ORGANOSUBCOMISURAL DE PERRO. (Citochemistry of the dog subcommissural organ). Irigoin, C.; Vallejos, J.; Rodríguez, E. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Debido a la presencia de células secretoras que establecen contacto con vasos sanguíneos. Se ha inferido que: en el órgano subcomisural (OSC) de perro, además de la secreción al ventrículo hay secreción a la sangre.

Se analizó comparativamente el material que se libera al ventrículo y el material en contacto con vasos sanguíneos. Se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica (utilizando anticuerpos anti-Fibra de Reissner, AFRU) y diversas lactinas.

Los gránulos secretorios ventriculares mostraron afinidad por AFRU concentrado y diluido y por las lectinas WGA, y WGA, RCA y SBA después de hidrólisis ácida; en cambio, el material secretorio del polo vascular mostró afinidad por AFRU concentrado y por la lactina Con A.

Los resultados obtenidos sugieren que; la composición del material secretorio vascular es de naturaleza proteica, similar a la secreción ventricular, pero el grado de maduración es diferente, siendo fundamentalmente material secretorio inmaduro el que contacta con los vasos sanguíneos.

Llama extraordinariamente la atención el hecho que células en la comiura posterior cercanas al OSC, contengan un material secretorio con características citoquímicas e histoquímicas similares al contenido en los gránulos ventriculares.

Financiado por: Proyecto S-85-39, Dir. Investigación, U.A.CH. y Grant I/38 259 Stiftung Volkswagenwerk.

ANTICUERPOS MONOCLONALES COMO REACTIVOS DE TIPIFICACION SANGUINEA. (Monoclonal Antibodies as human red blood cells typing reagents) Macarena Irigoyen, Andro Vojkovic y Alfredo E. De Ioannes. Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. Instituto de Biotecnología BIOS CHILE.

Las crecientes necesidades clínicas en la tipificación de grupos sanguíneos, justifican la aplicación de los anticuerpos monoclonales en el Banco de Sangre. Estos, por su fácil producción en escala industrial, alta especificidad y homogeneidad, presentan ventajas sobre los reactivos convencionales. Estas características, más la disminución en el costo de producción, permitirán su uso como reactivos de rutina en la tipificación sanguínea.

La aplicación de los anticuerpos monoclonales ha permitido esclarecer, en parte, la complejidad y variación de los determinantes ABH de grupo sanguíneo en los eritrocitos humanos, permitiendo distinguir las diferentes cadenas oligosacáridas según su longitud y grados de ramificación. Esta variabilidad dentro de los grupos sanguíneos, complica su tipificación mediante los anticuerpos monoclonales, ya que, una pequeña variación en la cadena glicosilada, puede afectar la reactividad con el anticuerpo monoclonal, lo cual puede inducir a errores en la tipificación.

Para solucionar este problema, nuestro enfoque ha sido estudiar la utilización de combinaciones de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes determinantes de los antígenos de grupos sanguíneos, los cuales se potencian dando mayor seguridad en la tipificación.

Con el fin de obtener una mayor diversidad de anticuerpos monoclonales, se inmunizaron ratones de la cepa Balb/c con eritrocitos pertenecientes a los grupos sanguíneos A y B. La fusión de los linfocitos esplénicos de estos animales con células mieloides de la línea NS0/2, permitió seleccionar anticuerpos monoclonales por su capacidad de aglutinar eritrocitos en forma específica y con alta afinidad.

Hemos logrado producir una cantidad adecuada de anticuerpos monoclonales para seleccionar aquellos que reaccionan contra distintas cadenas oligosacáridas, requisito indispensable para ser usados como reactivos de rutina en la tipificación sanguínea.

EFFECTO INHIBIDOR DE COBRE Y ARSENICO SOBRE EL TRANSPORTE INTESTINAL EN RATA Y PALOMA (Inhibitory effect of copper and arsenic on intestinal transport in rat and pigeon). Iturrri, S. Peña, A., Iturrri, S.E. y Soto, R. Depto. Cs. Ecológicas, Fac. Ciencias, Univ. de Chile.

Evidencias experimentales demuestran que la capacidad de absorción del intestino se resiente en presencia de iones metálicos, dependiendo de la concentración de ellos. El presente trabajo se realizó con el objeto de estudiar el efecto de Cu (II) y As (III) sobre el transporte de azúcares (glucosa) y aminoácidos (tirosina) en el epitelio intestinal de rata y paloma tanto *in vitro* como *in vivo*.

Sacos de intestino (yeyuno) evertido de rata y paloma, sacrificados por decapitación, se incubaron a 37° y 41°C respectivamente en un baño con solución Krebs-Henseleit (K-H). En experimentos *in vivo*, trozos de intestino de animales anestesiados con nembutal (3,5mg/100g peso) se perfundieron (0.1ml/min) con sol. K-H. En ambos casos la sol. K-H contenía D-glucosa (5mM) y L-tirosina (2mM). El transporte de estos dos compuestos se evaluó determinando el aumento de ellos en el interior del saco al cabo de 60 minutos o la disminución de concentración en el líquido de perfusión durante 1.5 hora por períodos de 30 minutos.

Los resultados demuestran que As y Cu (10<sup>-6</sup> 10<sup>-4</sup>) inhiben el transporte de glucosa y tirosina en experimentos *in vitro* en rata y paloma, aumentando el efecto inhibitorio con el aumento de concentración de estos iones. En experimentos de perfusión se observa un efecto similar, siendo el efecto de As mayor que el producido por cobre.

Financiado por Proyecto DIB N-2447 U. de Chile

**FORMACION Y REGENERACION DE ESFEROPLASTOS DE *C. thermocellum* (Spheroplasts formation and regeneration of *C. thermocellum*). Ivanier S. y Méndez B.  
Genética Bacteriana, Facultad de Cs.Exactas y Naturales-UBA- Ciudad Universitaria Pab II, 1428 Buenos Aires, Argentina.**

*Clostridium thermocellum* es un microorganismo anaerobio celulolítico, formador de esporas y termófilo que degrada celulosa a etanol, ácido acético, ácido láctico, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>. Dado que la celulosa es la principal componente de la bio masa secundaria, y por ventajas que derivan de su carácter termófilo, estos microorganismos presentan interés biotecnológico. Su actividad biológica puede mejorarse mediante la aplicación de técnicas genéticas. En cepa *C. thermocellum* ATCC 27405 hemos desarrollado condiciones de formación y regeneración de esferoplastos, herramientas fundamentales para desarrollar sistemas de recombinación mediante manipulaciones genéticas. Cultivos exponenciales de *C. thermocellum* se trataron con lisozima y glicina en medio hipertónico. El control de las células no esferoplastizadas se verificó por resistencia al shock osmótico y por observación microscópica, siendo la eficiencia de un 99%. La regeneración se llevó a cabo en medio completo suplementado con distintos nutrientes y refinosa como estabilizador. Diferentes experimentos indicaron una frecuencia de regeneración aproximada al 5%. Se han establecido así las bases necesarias para lograr el desarrollo de recombinantes genéticos de *C. thermocellum* mediante fusión y transformación por plásmidos.

**ROL DE COMPONENTES DE MEMBRANA CELULAR EN EL DESARROLLO INICIAL DE MAMIFEROS (Role of cell membrane components in early mammalian development).**  
Izquierdo, L.; Becker, M.I.; Fernandez, M.S.; Sepulveda, M.S.; Ahumada, A. & Fey, R. Fac. Ciencias, U. de Chile.

Hemos estudiado el rol de componentes de la membrana celular en el desarrollo del ratón in situ e in vitro, desde el comienzo de la segmentación hasta la implantación, por medio del desordenamiento de los blastómeros, la demostración citoquímica de actividad enzimática y la distribución de antígenos de superficie detectados con anticuerpos monoclonales.

El desorden de los blastómeros se regula sin restablecimiento del orden original aunque con mantención del tiempo de compactación y blastulación. Este proceso de regulación depende de contactos celulares que inducen regionalización de la membrana con algunas propiedades de capping. Los 4 antígenos estudiados se observan desde el oocito preovulatorio hasta el blastocisto implantado in vitro y ninguno de los monoclonales correspondientes interfiere con la compactación o blastulación. Tres antígenos se encuentran preferentemente en masa celular interna y uno se encuentra preferentemente en trofoblasto.

En conclusión: se reconocen componentes de membrana, cuyo origen y distribución dependería del contacto celular, que son agentes o indicadores de regulación embrionaria y además, se reconocen componentes, originados en el oocito, que no se modifican por el contacto celular aunque se redistribuyen en la diferenciación celular. Financiado por U. de Chile (DIB) y Fondecyt.

**ANALOGOS FOSFOROTIOATOS DEL ATP EN EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA. (Phosphorothioate analogs of ATP in the mevalonate 5-diphosphate decarboxylase reaction). Jabalquinto, A.M., Cardemil, E. E. Iyengar, R. y Frey, P.A. Depto. Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile y Department of Biochemistry, University of Wisconsin, EE.UU.**

Los fosforotioatos del ATP son análogos del ATP en los cuales uno de los oxígenos no puente de un grupo fosfato se ha reemplazado por un átomo de azufre. Si este reemplazo se efectúa en el fosfato  $\alpha$  o  $\beta$  del ATP se produce quiralidad en el fósforo y se da origen a un par de diastereoisómeros.

Se determinó el curso estereoquímico de la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica llevando a cabo la reacción en presencia del isómero (Sp) adenosina-5'-0-(3-1702, 180)-tiotriofosfato en lugar de ATP. El análisis del tiotriofosfato producido en la reacción enzimática indicó que éste tenía configuración Rp, con lo que se demuestra que la reacción ocurre con inversión de la configuración en el P.

Con el objeto de determinar la estructura del complejo MgATP catalíticamente activo se efectuó una comparación de la preferencia estereoquímica por los diastereómeros de ATP $\alpha$ S y ATP $\beta$ S al ser utilizados como sustratos en presencia de Mg(II) y de Cd(II). Los resultados indican que el metal no se une al fosfato  $\alpha$  del ATP y sugieren que el sustrato es el complejo  $\beta$ - $\gamma$  bidentado del ATP.

Financiado por DICYT, USACH, Fondo Nacional de Ciencia y PNUD-CHI-84/006.

**ESTUDIO ANATOMO-HISTOLOGICO DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO DE *CHORUS GIGANTEUS*. (Anatomo histological study of female genital tract of *Chorus giganteus*). Jaramillo, R., Jorquera, B. Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile.**

Se estudió la anatomía e histología del aparato reproductor femenino (ARF) de *Chorus giganteus*. Hembras maduras e inmaduras colectadas en Puerto Claro (Lat. 39°53'Sur; Long. 73°22'Oeste), Valdivia, fueron procesadas para microscopía óptica.

El ARF presenta un ovario desde el cual se origina el oviducto renal (OR), revestido por un epitelio columnar simple. Al alcanzar el techo del manto el OR se ensancha y recibe el nombre de oviducto paleal (OP), el cual se divide en una porción glandular (PG) y otra porción aglandular (PA). La PG presenta dos regiones: la glándula de la albúmina (epitelio de células columnares) y la glándula de la cápsula (epitelio de células cuneiformes y cluster de células glandulares). La PA está formada por el receptáculo seminal (epitelio simple glandular), bolsa copulatrix (epitelio cúbico simple) y poro genital (epitelio cilíndrico ciliado).

Estos resultados son similares a los observados en: *Colus stimpsoni*, *Colus gracilis* y *Nucella lapillus*, con diferencias en la estructura histológica de la glándula de la albúmina.

Se discute el lugar de fertilización en relación con la formación de las envolturas del huevo.

Financiado por D.I.D. UACH. Proyecto I-85-44.

ESTUDIO CINÉTICO DEL CONTENIDO HEPÁTICO Y BILIAR DE GLUTATIÓN Y MALONILDIALDEÍDO EN RATAS TRATADAS CON LINDANO. (Time course study of hepatic and biliary glutathione and malondialdehyde levels following acute lindane administration to rats). Junqueira, V.B.C., Barros, S.B.M., Simizu, K., Van Halsema, L. y Videla, L.A.\*\*\* Universidade de S. Paulo, Instituto de Química\* Faculdade de Ciências Farmacéuticas\*\*, S. Paulo Brasil. Universidad de Chile, Facultad de Medicina\*\*\*, Santiago, Chile.

Lindane, a pesticide metabolized in the liver endoplasmic reticulum, given ip to rats, increases the level of hepatic lipid peroxidation (LP) which seems to be dependent on  $O_2^-$  formation-cytochrome-P<sub>450</sub> linked. An increase of hepatic and biliary GSSG content was also observed. The aim of this work is to determine whether early changes in the liver and biliary GSH/GSSG content or other factors, as the induction of cytochrome-P<sub>450</sub> and the related production of oxidative species, are responsible for the high levels of LP. Fed rats received a single ip dose of 60 mg of lindane/Kg b.w. and were used from 1 to 24 h after injection. LP indexes were measured as malondialdehyde (MDA) and glutathione estimated by conventional methods. The main results are: (i) liver cytochrome-P<sub>450</sub> levels increase after 6 h, whether LP increases just after 1 h of injection; (ii) liver GSSG increases 2 h after injection, with consequent decrease in GSH/GSSG; (iii) biliary content and release of GSSG are markedly decreased after 4 h injection. The results obtained are indicative that in the early lindane intoxication of rats, liver glutathione changes contributes more to the oxidative stress determined by lindane, than the other factors mentioned.

GLICOPROTEÍNAS DEL LIQUIDO OVIDUCTAL Y DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO. (Oviductal fluid glycoprotein and early stages of embryonic development).- Kaltwasser, G., Ortiz, M.E. Laboratorio de Endocrinología, Depto. Ciencias Fisiológicas, Facultad Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El oviducto es la estructura en la que tienen lugar las primeras etapas del desarrollo en mamíferos, sin embargo, no han sido descritas interacciones específicas entre oviducto y gametos o embriones. Hemos identificado mediante PAGE/SDS proteínas específicas del líquido oviductal de coneja después de inducir ovulación con GnRH. Al fraccionarlo con lectinas-concanavalina-A y aglutinina de germen de trigo- se han identificado distintas glicoproteínas. Este mismo líquido ha sido incubado con blastocistos de ratón y se ha medido la incorporación de 3-H uridina en RNA. La incorporación es entre un 50-60% mayor cuando se usa líquido oviductal comparado con suero del mismo animal del que se obtuvo el líquido oviductal. Cuando el líquido oviductal es denaturado (65° C/30 min) no hay estimulación en la incorporación a macromoléculas. La incorporación de uridina es lineal en concentraciones de  $10^{-8}M - 10^{-6}M$  y también con respecto al número de huevos. En el tiempo hay una incorporación lineal durante la primera hora, luego se estabiliza entre 2-4 horas y luego un incremento en las 4-8 horas siguientes que se corresponde con un aumento en el número de células en los blastocistos. En ensayos preliminares hemos visto que el incremento en la incorporación de uridina es mayor cuando se utilizan fracciones glicoprotéicas que cuando se utiliza líquido oviductal sin fraccionar.

Estos resultados sugieren que existe una interacción de algunas proteínas del líquido oviductal con embriones en estados tempranos del desarrollo que no es específica.

Financiado por RF 86020

CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ARGINASA DE HIGADO DE GENYPTERUS MACULATUS (CONGRIO NEGRO). (Characterization and subcellular location of arginase from *Genypterus maculatus* liver). Kessi, E., Ainol, L. y Carvajal, N. Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biol. y de Rec. Nat. Universidad de Concepción (Patrocinio: R. González).

Se purificó parcialmente la arginasa de hígado de *Genypterus maculatus*. Para ello, un homogenizado de hígado se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio (0-30% saturación) calentamiento a 60°C en presencia de ornitina y  $MnCl_2$ , filtración en Sephadex G-200 y cromatografía de intercambio iónico en columnas de DEAE-celulosa. La preparación enzimática obtenida presenta un pH óptimo de 9.5 y un Km de 15-20 nM para arginina; además es inhibida en forma no competitiva por el producto ornitina y por los aminoácidos prolina, leucina e isoleucina. La enzima presenta un peso molecular de 120.000, y el tratamiento con EDTA se acompaña de pérdida de actividad y disociación de la enzima.

El fraccionamiento subcelular reveló que la enzima se encuentra localizada exclusivamente en la mitocondria del hígado de *Genypterus maculatus*. En base a esta distribución y los bajos niveles de urea endógena medidos en tejidos de esta especie se sugiere que la función de la arginasa es aportar la ornitina necesaria para la síntesis de prolina.

EFFECTO DEL URETANO EN LA MARCACION DE GANGLIOSIDOS Y GLICOPROTEÍNAS Y SU DISTRIBUCION SUBSINAPTOSOMAL EN EL TRACTO OPTICO DE POLLO. (Effect of urethane in the labeling of gangliosides and glycoproteins of chicken optic tract and their subsynaptosomal distribution in optic tectum). Kivatinitz, S. y Domowicz, M. CIQUIBIC-Dto. Química Biológica, Fac. C. Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Se estudió la marcación de gangliósidos y glicoproteínas en pollos anestesiados una hora antes de una inyección de 3H-NACMan. Se midió 3H-gangliósidos y 3H-glicoproteínas en capa ganglionar de retina y tectum óptico. Cinco horas después de la inyección se encontró una disminución en la marcación de ambos compuestos tanto en retina como en tectum óptico de los animales anestesiados. Sometidos los tectum ópticos a un fraccionamiento subsinaptosomal se encontró que tres horas después de la inyección la fracción que tiene mayor actividad específica de ácido siálico de gangliósidos (c.p.m. 3H-NANA gangliósidos/mol de NANA gangliósidos) es la fracción enriquecida en vesículas sinápticas tanto en animales control como en los anestesiados, siendo los valores de todas las fracciones obtenidas de animales anestesiados menores que las de los controles. Transcurridas cinco horas de la inyección las actividades específicas de las fracciones enriquecidas en mielina, microsomas, membrana plasmática, sinaptosomas y mitocondrias aumentan sobrepasando el valor de la fracción de vesículas sinápticas el cual permanece constante entre las tres y cinco horas. En las fracciones provenientes de los animales anestesiados los valores se mantienen siempre similares a los de la fracción de vesículas sinápticas y por debajo de los controles correspondientes. Se discute la posibilidad de que el anestésico interfiera tanto en la síntesis como en la translocación de estos glicocompuestos desde su sitio de síntesis hacia la membrana plasmática y en el reciclado de membranas.

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ISLOTES DE LANGERHANS FUNCIONANTES.** (Isolation and culture of functional Langerhans' islets) Koppmann, A., Huerta, G., Salas, K., Caviedes, R. Laboratorio Cultivo de Tejidos Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina U. de Chile.

Una de las limitaciones del trasplante de páncreas endocrino radica en que las actuales técnicas de aislamiento y cultivo no son eficientes.

Se trabajó con dos especies animales.

El páncreas de rata es de fácil acceso y canulación, procediéndose luego a la disección, trituración, digestión enzimática y cultivo de los islotes obtenidos.

En el perro este procedimiento es básicamente el mismo, pero se dificulta por sus condiciones anatómicas.

En ratas el rendimiento es de 200-400 islotes, obteniéndose adherencia a la placa de cultivo (criterio de vitalidad en cultivo), microscopía electrónica e inmunocitoquímica de célula secretoria típica (RER, gránulos de secreción, mitocondrias y complejo de Golgi), fluorescencia (+) con paraformaldehído-glioxilato, RIA de insulina en secreción basal y respuesta sobre carga de glucosa (90-153 uUI/ml respectivamente).

En perros se observa adherencia a la placa, RIA de secreción basal de insulina (137 uUI/ml en tres días) y respuesta sobre carga de glucosa con mayor secreción de hormona (de 32 uUI/ml basal a 53 uUI/ml post estímulo).

Se comprobó preservación en condiciones de cultivo de propiedades morfofuncionales histioespecíficas de páncreas endocrino por períodos prolongados de tiempo (1 mes).

Financiamiento: DIB B 2124-8623

**BIOSINTESIS DEL GLUCÓGENO EN CEREBRO DE RATA** (Rat brain glycogen biosynthesis).

Clara R. Krisman, Marcia Mendonça, Diana S. Tolmasky.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires, ARGENTINA

El glucógeno es un homopolisacárido de glucosas altamente ramificado con uniones glucosídicas  $\alpha$  1,4 y  $\alpha$  1,6. Todas las enzimas glucógeno sintetasas independientemente de su origen, presentan un requerimiento absoluto por un glucano del tipo  $\alpha$  1,4 como aceptor.

Los trabajos realizados en nuestro laboratorio con hígado y corazón de rata, así como también *Esch. coli* conducen a proponer que el glucógeno se sintetiza "de novo" sobre una proteína.

En este trabajo presentamos evidencias que también en cerebro, el glucógeno se inicia vía formación de una glucoproteína. La enzima que cataliza la transferencia de glucosas del UDP-Glc a la proteína es diferente de la enzima que transfiere las glucosas al glucógeno.

Esta afirmación se basa en que a través de las distintas etapas de purificación empleadas, se logró separar las enzimas: fosforilasa, ramificante y UDP-Glucosil transferasa a proteína y UDP-Glucosiltransferasa a glucógeno.

**MECANISMO DE ACCION DE ANTIVIRALES LISOSOMOTROPICOS: ESTUDIOS CON VIRUS IPN.** (Mechanism of antiviral lysosomotropic agents: Studies in IPN virus). Kuznar, J., Fariñas, J., Kiss, J. y Navarrete, E. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

La sensibilidad de algunos virus, a la acción de los agentes lisosomotrópicos, ha sido empleada como argumento para definir su vía de penetración a la célula. Estos inhibidores afectarían la internalización de los virus a través de la neutralización del pH de endosomas y lisosomas. La relación entre penetración viral y sensibilidad a agentes lisosomotrópicos está siendo cuestionada debido a que algunos virus son afectados por estas drogas incluso después de haber penetrado. Con objeto de aportar información respecto a lo que sucede con virus sin membrana, hemos ensayado el efecto de la Cloroquina y el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sobre el ciclo infectivo del virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN).

Ambos agentes inhiben la producción de virus IPN, sin embargo, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  es más efectivo. Contrariamente a lo esperado, el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inhibe la multiplicación viral incluso si se agrega después que se ha iniciado la síntesis de nuevas proteínas virales. Para visualizar un posible efecto sobre la replicación del genoma del virus, se estudió la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-uridina a células infectadas. El  $\text{NH}_4\text{Cl}$  reduce en un 43% la síntesis de RNA viral. En cambio, la producción de virus decae en un 95%. La disminución en la síntesis de RNA viral, detectada en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , es, en principio, insuficiente para explicar la acción del inhibidor, sin embargo, estudios preliminares de inmunofluorescencia, sugieren que además el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  inhibe la penetración del virus.

**CANALES IONICOS DE RETICULO SARCOPLASMATICO DE MUSCULO ESQUELETICO DE RANA.** (Ionic channels in sarcoplasmic reticulum from frog skeletal muscle). Ladrón de Guevara, R. y Bull, R. Depto. Fisiología Normal y Patol., Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso y Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Con el objeto de estudiar los canales iónicos presentes en el retículo sarcoplasmático de *Caudiverbera caudiverbera*, hemos fusionado dos preparaciones diferentes de fragmentos aislados de éste, con membranas artificiales planas de fosfolípidos.

El canal más frecuentemente encontrado con una de las preparaciones es catiónico, tiene una conductancia de 574 pS en sulfato de potasio 100 mM y la probabilidad de estar abierto crece al aumentar el potencial eléctrico en el lado que se agregaron las vesículas. Con la otra preparación detectamos diversos tipos de canales, entre ellos uno aniónico y otro catiónico. El aniónico es poco dependiente de potencial, y presenta en cloruro de colina 250/50 mM una conductancia de 100 pS. El canal catiónico presenta en cloruro de potasio 200/100 mM una conductancia de 74 pS, y se abre para potenciales positivos.

Estos canales podrían participar en la prevención de la polarización del retículo sarcoplasmático cuando éste libera calcio.

Financiado por la Universidad de Chile DIB B.2123, Muscular Dystrophy Association y NIH GM 35981-01.

GABA ENDOGENO SE ENCUENTRA PRESENTE EN VESICULAS SINAPTICAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. (Endogenous GABA is present in rat brain cortex synaptic vesicles). Lagos, N. y Orrego, F. Depto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En la literatura se encuentran descritos intentos negativos para asociar aminoácidos (AA) a fracciones de vesículas sinápticas (VS) aisladas. Esto podría indicar que los AA postulados como neurotransmisores, entre ellos el ácido gama-aminobutírico (GABA), no se encuentran almacenados en vesículas sinápticas. Una explicación alternativa pudiera ser que los AA difundieran desde el compartimiento intravesicular hacia el citosol durante el proceso de aislamiento, así la concentración de AA dentro de la vesícula debería ser directamente proporcional a la duración y complejidad del procedimiento utilizado en el aislamiento de vesículas sinápticas.

En este trabajo se presentan evidencias de contenido de GABA endógeno en vesículas sinápticas de corteza cerebral de rata obtenidas por tres métodos diferentes.

Se caracteriza la fracción vesicular utilizando marcadores bioquímicos y controles de microscopía electrónica y se determina el contenido de GABA intravesicular.

Financiado por DIB Proyecto B.1590 Universidad de Chile y Proyecto PNUD UNESCO CHI-84/003, ayuda a Tesis de Doctorado.

CARACTERIZACION DEL ESTADO DE PLASMIDIO DEL BACTERIOFAGO P4, Y SU USO COMO VECTOR DE CLONAMIENTO Y EXPRESION. (Characterization of phage P4 plasmid state, and its use as a cloning and expression vector). R. Lagos y R. Goldstein. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Boston University School of Medicine, Boston.

P4 es un bacteriófago defectivo que depende del colifago P2 para su desarrollo lítico. En ausencia de P2, P4 puede propagarse como un plasmidio. Se caracterizó la replicación, control de número de copia, estabilidad y expresión del plasmidio P4 (pP4).

El número de copias (n), determinado por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio-yoduro de propidio, puede ser manipulado por alteraciones en las condiciones de crecimiento, oxigenación y temperatura, permitiendo la inducción de estados con diferentes número de copias: bajo (n=1-3), intermedio (n=10-15) y alto (n=30-40). Este efecto es a nivel de la replicación del DNA. El estudio de la estabilidad de pP4 se realizó con derivados de P4 que llevan insertado un gen de resistencia a kanamicina (Km), determinándose que la estabilidad depende de la función int.

Mediante la adición de P2, se puede encapsidar el genoma de pP4 en una partícula viral, y si se emplea la mutante pP4sid1 es posible encapsidar el genoma de pP4 que contenga una inserción de DNA foráneo de hasta 25000 pares de bases.

Se ha construido un vector de expresión usando el derivado pP4sid1, al cual se le ha insertado el promotor híbrido tac y un gen de resistencia a ampicilina. Este vector cuenta con un sitio PstI único que está distal al promotor y a la secuencia SD.

Se discutirán las ventajas del uso de pP4 como vector de clonamiento y expresión.

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE rRNA EN HOJAS SENESCENTES DE TRIGO. (Changes rRNA content in senescing wheat leaves). Lemittina, L., Pinedo, M., Pont Lezica, R. y Conde, R.D. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

La primera hoja de trigo en su máxima expansión pierde velozmente RNA cuando es cortada y colocada en la oscuridad. Esta investigación se llevó a cabo con el objeto de evaluar las características de la desaparición del RNA, cuya mayor proporción es rRNA. Se midieron, inicialmente, las velocidades de síntesis y degradación del rRNA total mediante procedimientos de marcación con [<sup>3</sup>H]-orotato. Los resultados indicaron que la síntesis se mantiene hasta 48 hs posteriores al corte. La degradación se incrementa y es responsable de la pérdida de rRNA total.

Luego, a distintos tiempos de iniciado el proceso, se aislaron las especies moleculares de rRNA que componen los ribosomas de citoplasma y cloroplastos mediante ultracentrifugación en gradientes exponenciales de densidad de sacarosa. Se estimó así, el contenido neto de dichos componentes. Los resultados indicaron que la hoja contiene inicialmente 69% y 21% de rRNA de citoplasma y cloroplastos respectivamente. La pérdida ocurre preferentemente en el rRNA de cloroplastos, y cae el 60% de su valor inicial en 48 hs. A continuación se midió la capacidad de transcripción de las especies moleculares mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-ácido orótico. La degradación se evaluó marcando el rRNA al inicio del proceso con [<sup>32</sup>P] y observando la desaparición de la marca. Los resultados obtenidos indicaron que la caída de marca está incrementada en el caso del rRNA de cloroplastos y es de la misma magnitud que el cambio de masa observado.

Financiado por CONICET, CIC y FIBA.

ASPECTOS BIOLÓGICOS Y CITOGENÉTICOS DE DOS GRILLOS ESCAMOSOS: Microgryllus pallipes (PHILIPPI) Y Hoplosphyrum griseus (PHILIPPI) (GRYLLIDAE: MOGOPLISTINAE).

[Biological and Cytogenetic aspects of two scaly crickets: Microgryllus pallipes (Phil.) and Hoplosphyrum griseus (Phil.) (Gryllidae: Mogoplistinae)].

Lambrot, M., Barrera, H. y Fan, C.\*. Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, \*U. Metropolitana de Cs. de la Educación.

Microgryllus pallipes y Hoplosphyrum griseus grillos escamosos, endémicos, de amplia distribución geográfica, son fácilmente distinguibles por su morfología de huevo a imago. Tienen importancia económica, ya que ambos acompañan los productos vegetales que Chile exporta, figurando M. pallipes como plaga cuarentenaria. Este trabajo caracteriza: la historia estacional de las especies; la constitución cromosómica obtenida por suspensión celular de tejido gonadal y tinción Giemsa para diversas localidades; y la conducta sexual determinada por observación directa de machos y hembras vírgenes.

Los resultados indican que ambas especies presentan un ciclo univoltino, pero con características propias. Todas las poblaciones analizadas poseen un número cromosómico diploide 2n= 18 autosomas mas sistema sexual XO; el cromosoma X es metacéntrico y grande. Algunas poblaciones de H. griseus presentan individuos con cromosomas B. Las pautas de conducta sexual, son en general coincidentes con otras especies de Gryllidae, sin embargo, existen diferencias notables: H. griseus da emisiones sonoras (canto de llamada) en tanto que M. pallipes es sordo y mudo; el tipo de espermátforo es bipartito y de gran tamaño en H. griseus, siendo de menor tamaño en M. pallipes. La conducta de postcópula también es diferente.

Se discute la importancia evolutiva de algunos de los parámetros presentados.

Financia Proyecto DIB 2007-8634

LA PLACENTA EN MALNUTRICION MATERNA 1. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS VELLOSIDADES CORIONICAS. (An ultrastructural study of the chorionic villi in Human Placentas in maternal malnutrition). Las Heras J., Ponce C., Gómez E., y Renere R. Departamento Ciencias Médico Biológicas y Básicas y Carrera de Obstetricia y Puericultura. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. (Patrocinio : S. Gimpel F.)

Se analizaron ultraestructuralmente las características de las vellosidades coriónicas en la placenta de 30 pacientes con malnutrición materna y se compararon con un número similar de placentas de pacientes con embarazo normal.

El estudio ultraestructural de las vellosidades coria les terminales de las placentas de madres desnutridas de mostró las siguientes alteraciones: excesiva dilatación del retículo endoplasmático rugoso y vacuolas subnucleares con material electrodens en el sincitiotrofoblasto; engrosamiento de la membrana basal, con interdigitación excesiva del sincitiotrofoblasto; aumento del colágeno en el estroma vellositario entre la membrana basal y la pared capilar; vacuolización de pericitos; moderada proliferación de células vellositarias y edema del estroma.

Aunque las causas que pueden haber originado los cambios estructurales, arriba mencionados, en las placentas de madres desnutridas aún no están establecidas se podría pensar en dos factores determinantes: insuficiente circulación utero placentaria y/o maduración vellositaria inadecuada.

PROYECTO : M2135 - 8622 DIB UNIVERSIDAD DE CHILE

ANALISIS ISOENZIMATICO DE ALCOHOL Y ALDEHIDO DESHIDROGENASAS Y ONTOGENESIS DE LAS ACTIVIDADES METABOLIZANTES DEL ETANOL EN HIGADO DE HAMSTER. (Isoenzymatic analysis of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases and ontogeny of ethanol metabolizing activities in hamster's liver) Lazo, O. y Jorquera R. Departamento de Biología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción. (Patrocinio: C. Cea)

Las isoenzimas de Alcohol Deshidrogenasa (ADH) se clasifican, según sus formas moleculares, en tipos I, II  $\delta$  y III  $\delta$  y las de Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) según sus Km para acetaldehído, en I ( $\mu$ M) y II (mM), siendo ADH I y ALDH I las principales isoenzimas involucradas en el metabolismo de etanol.

En este trabajo analizamos las actividades ADH y ALDH, sus patrones isoenzimáticos y la ontogénesis postnatal de ADH I y ALDH I en hígado de hamster.

Las actividades se midieron espectrofotométricamente, separadas y detectadas en geles de poliacrilamida y analizadas por densitometría.

En hamster adulto se detectan tres ADH I, una ADH III y tres ALDH II (dos NAD y una NADP dependientes). En neonato sólo se detecta una isoenzima de ADH I y, predominantemente, una de ALDH II. Las actividades ADH I y ALDH I, al nacimiento, representan menos del 20% de la actividad máxima respectiva alcanzada al mes de edad, decreciendo luego ALDH I hasta un 35%.

Estos resultados demuestran que en hígado de hamster las actividades ADH y ALDH están representadas por, al menos, cuatro y tres isoenzimas, respectivamente. Las isoenzimas que metabolizan el etanol, ADH I, ALDH I presentan diferentes ontogénesis post-natal y el incremento de la actividad ADH I se correlaciona con una modificación de su patrón isoenzimático.

ESTUDIO GENETICO POBLACIONAL EN CHUQUICAMATA. (Genetic population study in Chuquicamata). Lazo, B., Velasco, C., Campusano, C. y Figueroa, H. Laboratorio de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Introducción: Estudios poblacionales realizados en Chile, señalan diversidad de frecuencias en características definidas como marcadores genéticos y variables antropológicas. Esto se ha explicado por la particular mixtura étnica racial de cada población, debido a flujos migratorios distintivos en cantidad y origen de los migrantes. Como parte de un estudio más amplio, relacionado con la estructura genética de la población de Chuquicamata, la presente comunicación es un análisis preliminar que procura caracterizar dicha población desde un punto de vista genético antropológico.

Metodología: Se encuestaron 300 estudiantes de Enseñanza Media, en 1984, en proporción sexual 1:1, con promedio de edad de 14,44  $\pm$  0,32 años. De ellos se obtuvo: su lugar de nacimiento, el de sus padres y abuelos, grupos sanguíneos de sistemas ABO y Rh, presencia de tubérculo de Carabelli y de diente en pala, gustación a la feniltiocarbamida, etc.

Resultados: Se observa alta frecuencia de migrantes nacionales, principalmente de las regiones I, II, III y IV. Pero el número de abuelos extranjeros es de un 6%. En los grupos sanguíneos ABO el valor de r = 0,7602 y el de p = 0,1893. En Rh hay un 92,94% positivos. Presencia de tubérculo de Carabelli es de 13,47% y de diente en pala 25,35%.

Conclusiones: Los datos indican que la población básica es inmigrante (padres y abuelos). Los valores de las frecuencias génicas señalan que se está en presencia de una población mixta menos caucásica que otras poblaciones chilenas, lo que se explicaría, en parte, por la baja inmigración extranjera.

FACTOR HIPOTALAMICO QUE INHIBE LA SECRECION DE LH ESTIMULADA POR GnRH: RELACION CON EL FRAGMENTO GnRH (1-5). (Hypothalamic factor that inhibits GnRH-stimulated LH secretion: Relationship with GnRH (1-5). Leal, J., De la Lastra, M.- Laboratorio de Endocrinología, Depto. de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se ha obtenido de eminencia media de vaca (EM) un material peptídico soluble en ácido acético 0.5M y en metanol, que inhibe la secreción de LH, pero no de FSH, estimulada por 200 ng GnRH en ratas machos inmaduros. El efecto inhibitorio fue observado con dosis equivalentes a 0.33-1 EM, pero no con dosis mayores. El material inhibitorio tiene reacción cruzada con un anticuerpo monoclonal anti-GnRH y tiene un peso molecular estimado aproximadamente en 750 daltons.

Estas características sugieren que pudiese ser un fragmento de la molécula de GnRH producido por acción de endopeptidasas hipotalámicas, cuyo principal producto de hidrólisis es GnRH (1-5), con un peso molecular de 739 daltons.

Basándonos en estos hechos ensayamos la secuencia GnRH (1-5) sobre la secreción de LH estimulada por 200 ng de GnRH en ratas machos inmaduros. La liberación de LH, pero no la de FSH, fue inhibida significativamente con 50 y 100 ng de GnRH (1-5), pero no con dosis mayores. No se observó efecto sobre los niveles plasmáticos de LH en situación basal, no estimulada.

Sobre la base de estos resultados proponemos que el péptido inhibidor de la secreción de LH, aislado de EM de vaca, es el fragmento GnRH (1-5) y que este péptido podría desempeñar un rol regulador fisiológico en la secreción de LH.

Investigación financiada por Proyectos DIUC 69/86, CONICYT 1186/85 y Rockefeller 86020.

CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE *Salmo gairdneri* EN EL BACTERIOPAGO LAMBDA CHARON 4A (Construction of a *Salmo gairdneri* genomic library in bacteriophage Lambda Charon 4A).

Leighton, V., Winkler, F. Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile; Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto Profesional de Osorno.

La trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) se ha constituido como una de las especies de gran relevancia económica para el hombre, lo que explica el creciente interés por conocer diversos aspectos relacionados con su crecimiento y desarrollo. Como una etapa inicial de un estudio molecular que hemos iniciado acerca de la fisiología génica de este organismo, hemos construido una genoteca en el vector Lambda Charon 4A a la cual recurriremos para desarrollar futuras investigaciones tanto básicas como biotecnológicas.

El DNA cromosomal, obtenido de eritrocitos de trucha proveniente de la piscicultura de Rupanco, fue digerido parcialmente con la enzima de restricción Eco RI y fraccionado en gradientes de sacarosa. Los fragmentos de alrededor de 20 Kpb se ligaron a los "brazos" del bacteriófago Lambda Charon 4A mediante la enzima T4 DNA ligasa.

Los productos del ligamiento se sometieron a empacamiento *in vitro* utilizando extractos preparados a partir de las cepas *E. coli* BHB 2688 y *E. coli* BHB 2690. Los fagos recombinantes se identificaron mediante la aparición de placas de lisis incoloras al ser propagados en la cepa *E. coli* 1090 cultivada en medios sólidos que contenían isopropil -B-D tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-bromo -4-cloro -3-indolil -B-D-galactopiranosido (X - gal).

Financiado: Proyecto "Ingeniería Genética en Peces". Centro de Biotecnología Marina, Instituto Profesional de Osorno, Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

OVOGENESIS Y FOLICULOGENESIS EN EL OCTODON DEGUS (Ovogenesis and Folliculogenesis in the *Octodon degus*). Leiva, J; y Morales B. Depto de Fisiología U. Metropolitana; Depto. de Morfología Exp. Fac. Medicina, U. de Chile.

La ovogénesis es un proceso contínuo que comienza con las células Germinales Primordiales (CGP) en la vida embrionaria y culmina con el óvulo durante la fecundación. El ingreso de la ovogonia en la primera división meiótica, la fase de meiosis en que queda detenido el ovocito I y la organización de los folículos primordiales es variable de especie en especie.

Nuestro objetivo fue estudiar la ovogénesis y foliculogénesis en el *Octodon degus* pre y postnatal. Se utilizaron las gónadas de embriones de 0,7-1,2-1,5 cm y fetos 1,8-2,0-2,9-3,4 y 4,0 cm de LAC. Hembras de 25-35-40 y 90 días de edad y 10 hembras adultas en período activo y 10 en reposo sexual. Fueron procesadas para técnica histológica corriente. Se realizó un análisis evolutivo, mediciones de las células de la línea germinal y de los distintos tipos de folículos (F) normales y atrésicos y cuerpos luteos (CL) y además un recuento de ellos en ambos períodos de actividad sexual.

En embriones de 0,7 cm las CGP se encuentran en migración; a los 1,2 cm se reconoce la gónada indiferenciada. A los 1,5 el ovario por el inicio de la meiosis. Los primeros F. primordiales (con el ovocito en Paquiteno), se observan en fetos de 2,9 cm. Los ovocitos crecen lentamente hasta alcanzar su máximo tamaño en F. primarios de 12 capas de células foliculares. En el período de reposo hay un aumento relativo de los F. atrésicos y una disminución notable de los C.L.

La ovogénesis y Foliculogénesis se inician en el período prenatal. A diferencia de otros roedores el ovocito detiene la meiosis en la etapa de Paquiteno al organizarse el F. primordial. El crecimiento del ovocito y de los F. sigue un patrón muy similar a otros roedores. La disminución de la actividad ovárica en el período de reposo puede ser explicado por un descenso de las gonadotropinas hipofisarias.

EFFECTO DEL COLESTEROL DE LA DIETA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DESATURANTES DE ACIDOS GRASOS Y LA COMPOSICION LIPIDICA DE RETICULO ENDOPLASMICO DE HIGADO DE RATA. (Effect of dietary cholesterol on fatty acid desaturase activities and lipid composition of rat liver endoplasmic reticulum). Leikin, A.L y Brenner, R.R. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INBIOLP), CONICET-UNLP, Fac.de Cs.Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

El colesterol posee una reconocida capacidad rigidizante. Es de gran interés conocer cómo afecta la actividad de enzimas de membrana y su entorno lipídico. Con este fin se midió su efecto sobre la actividad enzimática desaturante del retículo endoplásmico hepático por radiocromatografía gas-líquido. La composición lipídica y de ácidos grasos se estudió por cromatografía en capa fina y cromatografía gas-líquido. Las propiedades físico dinámicas se estudiaron por medición de anisotropía de fluorescencia. Las ratas fueron alimentadas con dietas suplementadas con 5% colesterol- 2% ácido cítrico y 1% colesterol-0,5% ácido cítrico durante 6 y 21 días, respectivamente. El retículo endoplásmico se enriqueció en colesterol. El contenido de fosfatidil colina y fosfatidil etanolamina aumentó y disminuyó el de esfingomielina. Luego de 6 días de dieta  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa no modificaron su actividad. Luego de 21 días,  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa disminuyeron su actividad, la primera en forma más significativa que la segunda.  $\Delta 9$  Desaturasa aumentó su actividad en forma muy significativa. Estos cambios se tradujeron en la composición de ácidos grasos totales con disminución de 16:0 y 18:0 y 20:4 y aumento de 16:1 y 18:1. La anisotropía de fluorescencia de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno aumentó así como también la del ácido trans-parinárico. Los resultados revelan una rigidización de la membrana cuyo efecto sobre las actividades enzimáticas depende de la desaturasa en estudio.

MARCAJE DE AFINIDAD DE METIONIL-tRNA SINTETASA DE *E. coli*. (Affinity labeling of *E. coli* methionil-tRNA sintetasa). León, O. y Schulman, L. Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biol. y de Rec. Nat. Universidad de Concepción y Department of Developmental Biology and Cancer. Albert Einstein College of Medicine.

La interacción específica del tRNA con aminoacil-tRNA sintetasa es un modelo atractivo para el estudio de las bases moleculares de reconocimiento proteína-ácidos nucleicos. Las estructuras primaria y terciaria de t-RNA y de un fragmento de metionil-tRNA sintetasa (MetRS) de *E. coli* han sido resueltas.

Experimentos de entrecruzamiento utilizando el compuesto bifuncional dithiobis (succinimidil-propionato) (DTSP) unido a cuatro regiones de la estructura de tRNA, han sido llevados a cabo en este laboratorio y cuatro péptidos reaccionantes fueron identificados.

En este trabajo los péptidos identificados han sido asignados a sus respectivos sitios de reacción en el tRNA. Los resultados indican que Lys 640 reacciona con el extremo 5' del tRN, Lys 402 y Lys 439 están unidos al D-loop y el más importante Lys 465, reacciona con la región que contiene el anticodon.

La estructura del fragmento de MetRS está siendo refinada a 1.8 Å de resolución. La combinación de resultados directos como son los obtenidos por entrecruzamiento y la estructura de la enzima permitirá construir el primer modelo detallado de un complejo proteína-RNA.

## INTERACCION RHIZOBIM MELILOTI-ALFALFA

Viviana C. Lepek, Luis R. Maréchal  
Instituto de Investigaciones Bioquímica "Fundación  
Campanar", Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires

Resultados previos de este laboratorio demostraron que la aglutinina de alfalfa a la que se adjudicó un papel importante en el reconocimiento de *R. meliloti*, era inespecífico en cuanto a su interacción con esta bacteria. Ello llevó a que experimentáramos otro ensayo para intentar dilucidar el problema relacionado con el reconocimiento de *R. meliloti*-alfalfa. Intentamos así desarrollar la técnica de obtención de anticuerpos monoclonales contra la superficie de *R. meliloti* para poder identificar y estudiar las estructuras responsables de tal interacción.

La fusión se realizó (según Milstein) entre células de mieloma de ratón NSO y linfocitos de bazo de ratones Balb/c inyectados 3 días antes intraesplénicamente (M. Spitz y E. Eugui) con una suspensión de bacterias enteras cosechadas en fase logarítmica a una dilución de  $2 \times 10^7$  bact/ml.

La presencia de anticuerpos en los sobrenadantes de los hibridomas se detectó con la aplicación del ensayo de inmunoadsorción ELISA con anticuerpo unido a peroxidasa. La selección de los anticuerpos se realizó en base a su capacidad de unión a las bacterias enteras fijadas mediante poli-L-lisina y glutaraldehído a la superficie de las placas de "multiwell" de poliestireno. Se obtuvieron así un 10% de hibridomas positivos. Actualmente nos encontramos en la etapa de clonado y caracterización de estos anticuerpos.

HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE ESTERES FOSFORICOS EN TRYPANOSO MA CRUZI. (Enzymatic hydrolysis of phosphoric esters in *Trypanosoma cruzi*) Letelier, M.E., Morello, A. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Casilla 70086 Santiago-7 Chile.

Las fosfatasa (E.C.3.1.3) pueden remover fosfato de importantes compuestos celulares y xenobióticos. Varios de los compuestos-fosfato endógenos están involucrados en procesos de transferencia de energía bioquímica (ATP) y procesos regulatorios (proteínas fosforiladas). Se ha sugerido también para la fosfatasa ácida un rol en la nutrición del *T. cruzi*.

Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen una actividad fosfatásica lisosomal (pH 4.0) y dos citosólicas (pH 5.5 y 8.0). Se han descrito además tres ATPasas unidas a membrana: dos  $Mg^{2+}$ -ATPasa, una oligomicina-sensible y la otra ouabaina u oligomicina insensible; y una  $Ca^{2+}$ -ATPasa. Mayor conocimiento sobre la hidrólisis de ésteres fosfato en este parásito podría ser útil para el desarrollo de nuevas drogas tripanosomicidas. En este trabajo se presentan la hidrólisis de varios compuestos-fosfato fisiológicos y proteínas fosforiladas, catalizada por las fosfatasa ácidas y alcalinas presentes en fracciones subcelulares de *T. cruzi*. Las fracciones subcelulares se obtuvieron por centrifugación diferencial de homogeneizados de *T. cruzi*. La actividad fosfatásica se determinó midiendo el fosfato inorgánico producido en la reacción. La fosfatasa lisosomal preferencialmente hidroliza ésteres fosfato de bajo peso molecular; las fosfatasa citosólicas alcalinas actúan primariamente sobre proteínas fosforiladas. El parásito también contiene una glucosa-6-fosfatasa microsomal y ATPasas activadas por  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  derivadas de membrana plasmática y mitocondrial. Se discute en el texto el posible rol que estas diferentes actividades fosfatásicas podrían tener en procesos regulatorios u otros procesos fisiológicos.

Financiado por CONICYT-CHILE, UNDP/WB/WHO/TDR, Departamento de Desarrollo de la Investigación. Universidad de Chile. Grant B-1854.

## ESTUDIO DE LA FUNCION Y LOCALIZACION HISTOLOGICA DE ACROSINA POR ANTICUERPOS MONOCLONALES. (Functional and histological studies on acrosin by monoclonal antibodies) \*Leyton, L., \*\*Elce, J.

\*Laboratorio de Inmunología. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile y \*\*Department of Biochemistry, Queen's University, Ontario-Canada.

Anticuerpos monoclonales dirigidos contra acrosina bovina fueron utilizados para estudiar la participación de acrosina humana en el proceso de fecundación y su localización histológica. Los anticuerpos fueron obtenidos inmunizando ratones híbridos CB6F1/J con acrosina bovina purificada y fusionando los linfocitos esplénicos con células de la línea mielóide Sp2/0. Se seleccionó el hibridoma Acr-C2E5, secretor de IgG, porque presenta reacción cruzada, por inmunofluorescencia indirecta, con la región acrosomal de espermatozoides humanos, murinos y bovinos.

El análisis inmunohistoquímico en cortes de epidídimo y testículo de ratón indica que el antígeno se expresa desde estados muy tempranos de la espermatogénesis. Para estudiar la participación de la enzima en la fecundación, se investigó el efecto inhibitorio de Acr-C2E5 en bioensayos. La penetración de ovocitos de hamster sin zona pelúcida por espermatozoides humanos no fue interferida por el anticuerpo monoclonal.

La administración pasiva de Acr-C2E5 por vía intraperitoneal en hembras de ratón de la cepa CF1, previo al cruzamiento con machos fértiles, no impidió la fecundación y desarrollo de los embriones. Sin embargo, este anticuerpo monoclonal es capaz de inhibir específicamente la disolución de la zona pelúcida de hamster por acrosina humana purificada. Este efecto ha demostrado ser dependiente de la dosis de anticuerpo empleada en el ensayo.

La falta de inhibición de Acr-C2E5 en el ensayo de fertilización *in vivo* podría explicarse ya sea porque la enzima no es esencial para la fecundación o porque el epítipo reconocido, no está expuesto en el espermatozoide fertilizante.

Financiado por grant IDRC: 3-P-83-1006-01.

## LUMINISCENCIA VISIBLE ASOCIADA A LIPOPEROXIDACION (Visible chemiluminescence from Lipoperoxidation). Lissi, E.A. y Videla, L.A. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile y Unidad de Bioquímica, Fac. de Medicina Occidente, Universidad de Chile (Patrocinio: E. Gardemil).

Los procesos de lipoperoxidación son acompañados de luminiscencia. El origen de este proceso no ha sido aún clarificado, pero se acepta generalmente que una de sus principales fuentes son reacciones entre radicales peroxidados que producirían carbonilos excitados. A fin de contribuir a la dilucidación de este problema, nosotros hemos realizado un estudio sistemático del efecto de antioxidantes sobre la luminiscencia. El sistema seleccionado fue la autooxidación de homogenizado de cerebro. Los resultados obtenidos muestran que la luminiscencia emitida correlaciona con otros indicadores de lipoperoxidación. Sin embargo cuando los antioxidantes son agregados a muestras pre-incubadas a concentraciones tales que el proceso de lipoperoxidación se detiene, se observa solo una disminución parcial de la luminiscencia. A partir de los perfiles de decaimiento puede concluirse que aproximadamente el 50% de la luz proviene de un intermedio que decae con una cinética de primer orden y que posee una vida media de aproximadamente 40 seg a 32°C y que procesos bimoleculares en radicales, tales como la recombinación de radicales peroxidados, no contribuyen significativamente a la luminiscencia observada.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATA-TASA. (Purification and characterization of ferro- and cobaltochelata-tase). Llabias, E.B.C. y Cánepa, E.T. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Ferro- y cobaltoquelatasa catalizan la incorporación de  $Fe^{2+}$  y  $Co^{2+}$  en mesoporfirina, respectivamente. En Reuniones anteriores, presentamos estudios de purificación de ambas actividades enzimáticas a partir de hígado de cerdo. En el presente trabajo, se determinan las propiedades de las fracciones purificadas aproximadamente 400 veces, para determinar si una sola enzima está involucrada en ambas catálisis. Se incuban los sustratos y la proteína purificada en atmósfera de  $N_2$  por 90 min a  $37^\circ C$  y se determina la metalporfirina formada por el complejo piridínico. El peso molecular de ambas actividades es 240000. El pH y temperatura óptimos, y las energías de activación son similares para ferro- y cobaltoquelatasa. Los valores de  $K_m$  son, para la inserción del  $Fe^{2+}$ ,  $23,3 \mu M$  para el metal y  $30,3 \mu M$  para mesoporfirina; para la actividad de cobaltoquelatasa son  $27 \mu M$  y  $45,5 \mu M$ , respectivamente. Cada metal protege contra la inactivación por calor.  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  inhiben ambas actividades enzimáticas, mientras que el  $Mn^{2+}$  activa;  $Mg^{2+}$  no tiene efecto en las concentraciones probadas. Los grupos sulfhidrilo están involucrados en la inserción del metal. Los lípidos activan en correlación creciente con su grado de insaturación, mientras que distintos fosfolípidos tienen efectos similares. Se concluye que una sola proteína cataliza la inserción de  $Fe^{2+}$  y  $Co^{2+}$  en mesoporfirina.

RELACION ENTRE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y QUIMIOLUMINISCENCIA EN RATAS HIPERTIROIDEAS (Relation between antioxidant enzymes and chemiluminescence in hyperthyroid rats) Llesuy, S., Solari, L., González Flecha, B. y Boveris, A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El hipertiroidismo produce un aumento del metabolismo basal, con un aumento del consumo de oxígeno por parte del organismo. Este efecto está relacionado con la ca lorigénesis característica de animales hipertiroides, la cual se asocia a un aumento de la respiración celular en corazón, hígado, riñón y otros tejidos. Se estudió: a) la quimioluminiscencia in vivo; b) la quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido de ter-butilo y c) los niveles de enzimas antioxidantes en hígado de ratas Long Evans (140-200 g. de peso) a la que se les administra intraperitonealmente Na-L-triiodo tironina durante 1, 3, 5 y 7 días consecutivos. Los valores obtenidos muestran un aumento de la quimioluminiscencia in vivo e in vitro, hasta el 3º día de tratamiento, mostrando una saturación para los demás días. El incremento fue de un 150% en la quimioluminiscencia in vivo para el día 3 de tratamiento y de un 60% para la quimioluminiscencia de homogeneizado iniciada por hidroperóxido de ter-butilo  $3 \text{ mM}$ ., respecto de los valores controles. Se observó una disminución de los niveles de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa para el mismo período. Aparentemente estos resultados indicarían que la triodo tironina produciría un incremento en la velocidad de producción de anión superóxido, con el consecuente aumento de la concentración en estado estacionario de dicha especie en el citosol de la célula hepática de los animales hipertiroides. Esto llevaría a un aumento de la lipoperoxidación, y el consumo celular extra de oxígeno, debido a dicho de equilibrio, contribuiría a la elevación del consumo global de oxígeno y del metabolismo basal, característico del hipertiroidismo.

ASOCIACION ENTRE MARCADORES GENETICOS Y CARDIOPATIA CHAGASICA. (Correlation between gene markers and chagasic cardiopathy). E. Llop, M. Acuña, F. Rothhammer y W. Apt. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Div. Norte y Depto. de Parasitología, Facultad de Medicina, Div. Sur de la Universidad de Chile.

Con el objeto de evaluar la relación existente entre varios sistemas de marcadores genéticos y la susceptibilidad a desarrollar cardiopatía chagásica, se estudió una muestra de 104 individuos serológicamente positivos para enfermedad de Chagas, residentes en las ciudades de Combarbalá e Illapel, localizadas en el área chilena más endémica. Esta muestra se tipificó para una batería de marcadores genéticos que incluyeron los sistemas ABO, Rh, Duffy y HLA.

Los resultados revelaron diferencias significativas para los alelos cDE, A3, B18, B40 y Cw2. También se encontraron diferencias significativas para los haplotipos B40Cw3, A28Cw4 y A3B5. Nuestros resultados son de naturaleza preliminar, sin embargo, dada la antigüedad de la enfermedad en el Norte de Chile, estos pueden indicar la existencia de una adaptación genética de las poblaciones aborígenes chilenas a I. cruzi.

(Financiado por Proyecto B-1891-8635, D.I.B. y Grant 82599/UNDP/World Bank/ Who special Programme for Research and Training in Tropical Diseases).

FITOPLANCTON DEL RIO RECONQUISTA (PCIA BS.AS., ARGENTINA): RESULTADOS PRELIMINARES. (Phytoplankton of the Reconquista River (Bs.As., Argentina): preliminary results.) Loez, C.R., Tell, H.G. y Saibian, A. Univ. Nac. Luján, Univ. Buenos Aires, CIC y CONICET.

El Río Reconquista nace en una zona rural al O de la Pcia de Bs.As. y fluye al E atravesando centros urbanos muy industrializados, resultando muy contaminado en sus tramos finales, y desemboca en el estuario del Río de la Plata. Su recorrido se extiende unos 85 km; su caudal varía de 69000 a  $1700000 \text{ m}^3/\text{día}$  el que se incrementa significativamente después de grandes lluvias.

Se muestrearon mensualmente, durante un año, cuatro puntos seleccionados según el gradiente de contaminación. Se evaluaron algunas de sus características abióticas, relacionándolas con la estructura y dinámica del fitoplancton superficial y con las fluctuaciones de los pigmentos fotosintetizadores. Se contaron diatomeas pennadas, diatomeas céntricas, clorofitas, cianofitas y euglenofitas. Las primeras revelaron ser el grupo dominante (30-70%) en todos los casos y fueron seguidas por las clorofitas (21-33%); su densidad osciló entre

$10^4$  y  $10^6$  ind/litro. La clorofila "a" varió entre 0,22 y 38,73  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Las condiciones físico-químicas del río estudiado podrían considerarse extraordinarias por los valores atípicos que alcanzan algunos parámetros (p.ej. pH, 10,13; Sólidos totales, 1200 mg/l; Oxígeno disuelto, 0,15 mg/l; Conductividad, 2000 S/cm); no obstante se encontraron con regularidad y abundancia poblaciones de Micractinium pusillum, Actinastrum hantzschii, Closterium moniliferum, Eudorina elegans, Scenedesmus quadricauda y Melosira granulata.

$\gamma$ , $\delta$ -DIOXOVALERICO TRANSAMINASA EN *Euglena gracilis*: CINÉTICA Y MECANISMO DE ACCIÓN. (*Euglena gracilis*  $\gamma$ , $\delta$ -dioxoaleric acid-transaminase: Kinetics and mechanism of action) Lombardo, M. E., Araujo, L. S., Rossetti, M. V. y Batlle, A. M. del C.  
Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias CIPYP- (FCEN,UBA y CONICET),

Todas las porfirinas se caracterizan por comenzar su síntesis a partir del ácido  $\delta$ -aminolevulónico (ALA). En la actualidad se acepta que este precursor específico puede ser sintetizado por dos vías enzimáticas distintas. En una de ellas interviene como sustrato Succinil-CoA y Glicina (vía del ALA-Sintetasa); mientras que en la otra, precursores de cinco átomos de carbono llegan a ácido  $\gamma$ , $\delta$ -dioxoalérico (DOVA) el cual es convertido en ALA por una transaminasa (vía de la DOVA-Transaminasa).

Para la DOVA-T de *Euglena gracilis* caracterizamos la forma enzimática presente y establecimos el aminoácido específico que participa en la reacción (L-glutamato). Con DOVA y L-glutamato como sustratos realizamos estudios de velocidades iniciales; definimos la afinidad de la proteína por los distintos sustratos ( $K_m$  DOVA=0.99mM,  $K_m$  Glutamato=12.60mM) y para concentraciones de DOVA mayores de 6mM encontramos que se produce una marcada inhibición ( $K_i$  DOVA=14.74mM). También analizamos la posible inhibición por productos y sustratos análogos, tratando de justificar la forma de interactuar de cada uno de ellos.

Como conclusión, en base a los resultados obtenidos confirmamos el mecanismo de acción (tipo ping-pong) característico de las transaminasas y en el mismo identificamos los puntos en los cuales interactúan los distintos componentes de la reacción.

AUMENTO EN LA RESPUESTA DEL ENSAYO DE MICRONUCLEOS MEDIANTE FENOBARBITAL O CAFEINA. (Enhancement of micronucleus test response using phenobarbital or caffeine). Lopez, J.C., Inostroza, M.E., Orellana, M., Lafuente-Indo, N., Tab. Genética Toxicológica, Fac. de Odontología, Universidad de Chile.

El ensayo de micronúcleos es uno de los más usados para detectar sustancias químicas potencialmente mutagénicas y/o carcinogénicas. Aunque este ensayo es bastante sensible, algunas sustancias tienen una baja acción mutagénica, que hace difícil su detección.

En el presente trabajo, se estudia el posible efecto de fenobarbital y cafeína en el aumento de la respuesta clastogénica inducida por ciclofosfamida (CFA), un conocido agente mutagénico que necesita ser activado enzimáticamente en el hígado para ejercer su acción.

Se someten ratones *Mus musculus* a una inyección i.p. de 100 mg/kg de CFA, otros dos grupos reciben un pre-tratamiento con fenobarbital o cafeína. Los grupos controles reciben un único tratamiento con suero fisiológico, fenobarbital o cafeína.

Los resultados indican un aumento en la respuesta positiva, tanto con fenobarbital como con cafeína, lo que indicaría dos maneras de aumentar la genotoxicidad: una aumentando la metabolización del compuesto mediante fenobarbital y otra inhibiendo la reparación del daño mediante cafeína.

Se discuten el método y los posibles mecanismos involucrados.

ESTABILIDAD DE MICROTUBULOS ASOCIADOS A ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS (Stability of microtubule associate to membrane structures) Lopez, L.A., Berón, W., Bertini, F. IHEM-CONICET, U.N. Cuyo, Mendoza, Argentina

Anteriormente separamos microtúbulos (MT) de un homogenizado de cerebro de rata por centrifugación diferencial en cuatro sedimentos (1). Los sedimentos de menor velocidad están enriquecidos en microtúbulos libres (MTL) y los de mayor velocidad en microtúbulos asociados a estructuras membranosas (MTA). También vimos que en las fracciones ricas en MTA la tubulina es más resistente a la depolimerización en medios pobres en glicerol que la de las fracciones ricas en MTL.

Con el propósito de comprobar si esto se debe a que los MTA son más estables que los MTL, desarrollamos estos experimentos: a) depolimerizar en forma parcial los MT del sedimento P3 por resuspensión en medios deficientes en glicerol (G), 25%, 10% y 0%. b) determinar el % de tubulina depolimerizada. c) medir por morfometría la longitud media y el % de MTU y MTL.

La tubulina se depolimerizó en los medios en la forma siguiente: G25 (8,3%), G10 (40,5%) y G0 (51,7%), mientras que la longitud media de los microtúbulos decreció en los siguientes porcentajes: G25: MTA 3% y MTL 7,5%; en G10: MTA 10,3% y MTL 23%; en G0: MTA 20% y MTL 30,7%. Los resultados apoyan la interpretación de que en medios deficientes en glicerol los MTA son más estables que los MTL. Por lo tanto, la labilidad está directamente relacionada al porcentaje de MTA en los sedimentos.

(1) Separation of microtubule population in rat brain homogenates by differential centrifugation. Lopez, L.A.; Bertini, F. - BRAIN RES. (1986) in press.

SÍTIOS LIGANTES TIPO II OCUPADOS Y DESOCUPADOS DE ESTRÓGENO EN CÁNCER DE MAMA HUMANO. (Occupied and unoccupied type II estrogen binding sites in human breast cancer). Lopes, M.T.P.\*, Liberato, M.H.\*\*, Widman, A.\*\*\* y Brentani, M.M.\*\*

\* Fundação Centro de Pesquisa de Oncologia

\*\* Laboratório de Oncologia Experimental da FMUSP

\*\*\* Departamento de Cirurgia do H.C. da FMUSP

Using a saturation analysis over a wide range of ( $^3$ H) estradiol at two temperatures 4°C and 22°C we have determined unoccupied (4°C) and total (22°C) type II estrogen binding site (EBS) levels in individual cytosols of 100 patients with breast cancer (50 post and 50 premenopausal). Exchange was found to be complete after 18h at 22°C and receptor degradation was negligible during this treatment. Steroid specificity and affinity determined by Scatchard and Rosenthal plot analysis were not altered at 22°C. Carcinomas presented a higher total type II EBS level as compared to unfilled type II binding sites or the classical ER, independently of menopause status, phase of the menstrual cycle or positivity of ER. On the other hand, unoccupied type II EBS level was strongly correlated to the concentration of type I ER, being higher on the post-menopausal group and older patients.

VARIACION ESTACIONAL DE LA ZONACION DE ESPECIES SESILES EN EL INTERMAREAL ROCOSO DE VILLA COCHOLGUE, BAHIA DE CONCEPCION, CHILE. (Seasonal zonation changes of sessile species in the rocky intertidal of Villa Cocholgúe. Concepcion Bay, Chile). López, M.T.; G. Lara y A. Quezada. Depto. de Oceanología y Zoología. Universidad de Concepción y Depto. Biología. Pontificia Universidad Católica - Temuco.

Estudios comunitarios en el intermareal rocoso han confirmado la existencia de una estructura comunitaria tipo, que queda en evidencia por el esquema de zonación en franjas de organismos. Investigaciones realizadas en la zona litoral de la Bahía de Concepción han caracterizado este esquema fundamentalmente desde el punto de vista faunístico (Alvarez, 1964) notándose una falta de estudios integradores de los componentes faunístico y florístico.

En el presente trabajo, se describen los cambios estacionales en la abundancia de las especies intermareales sésiles (algas e invertebrados) de Villa Cocholgúe. Para ello durante 1978 y 1979, se realizaron muestreos mensuales en las franjas e interfranjas de la zona litoral rocosa en un área de 6 x 8 m, extrayendo mensualmente al azar muestras de 100 cm<sup>2</sup> mediante denudación de área.

El análisis de la abundancia mediante índices de similitud, de la riqueza y de la diversidad específica permiten concluir que existe un esquema de zonación característico conformado por 22 especies sésiles así como una variación estacional, a pesar de observarse una estructura aparentemente sin cambios.

Financiado por Proyecto 2.08.69; Universidad de Concepción.

COMPRESION DE NERVIOS PERIFERICOS: ASPECTOS MORFOLOGICOS. (Compression of peripheral nerve: morphologic aspects). Lutz, A. y Fritsch, R. Lab. Neurocitología, Fac. Ciencias Biológicas, Univ. Católica de Chile, Santiago, Chile. (Patrocinio: V. Valdivieso.)

La densidad microtubular es una función inversa bastante rígida del calibre axonal. Como una compresión del nervio disminuye el calibre axonal, se estudiará, si la correlación entre microtúbulos y calibre se afecta.

Se usó nervio sural de gatos adultos. Se colocó alrededor de él un tubo de silastix con una ligadura. A los 45 días se extrajeron y se usó los nervios contralaterales como control. Se procesó para microscopía electrónica. Se midieron las áreas y se contaron los microtúbulos de axones mielínicos en zonas distal y proximal del nervio. En el control las áreas de los axones en ambas zonas no difirieron significativamente. En la zona distal a la compresión, todos los axones mielínicos degeneraron. En las zonas proximales a la compresión disminuyó el área de los axones. El espectro de áreas es semejante al del lado control, pero con un desplazamiento hacia la izquierda. El número de microtúbulos también disminuyó por encima de la compresión, sin embargo la correlación entre densidad microtubular y calibre se mantuvo normal.

Concluimos que número de microtúbulos, densidad y área son variables estrechamente dependientes.

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA FLORA TERCIARIA EN LA ZONA CARBONIFERA DE ARAUCO-CONCEPCION CHILE. (Contribution to the knowledge of the Tertiary Flora in the Carboniferous zone of Arauco-Concepción, Chile). López, P., Rondanelli, M. Departamento de Geociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción. (patrocinio: O. Matthei).

El presente estudio, basado en el análisis palinológico y de improntas permite hacer consideraciones sobre la paleoflora del Terciario Carbonífero de Arauco-Concepción.

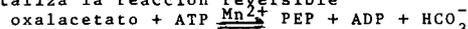
Para el análisis de las muestras se utilizaron métodos analíticos-experimentales, estadísticos, de correlación estratigráfica y estudios comparativos con las especies vegetales actuales; determinando con ello, la afinidad fitosistemática actual de palinomorfos e improntas.

En este estudio, se han encontrado desde esporas de hongos hasta granos de polen de Gymnospermas y Angiospermas. Las improntas determinadas corresponden a las Magnoliatae. La tafloflora observada indica para el Eoceno de Arauco-Concepción un ambiente subtropical a templado y muy húmedo y para el Mioceno un ambiente templado a frío, persistiendo las condiciones de alta humedad.

Este estudio paleobotánico forma parte de una serie de investigaciones que se llevan a cabo actualmente en el Departamento de Geociencias de la Universidad de Concepción y cuyo objetivo fundamental es contribuir al conocimiento paleobotánico de Chile y Sudamérica.

RESIDUOS DE ARGININA CATALITICAMENTE IMPORTANTES EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE LEVADURAS. (Essential arginyl residues in yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase). Malebrán, L.P. y Cardemil, E. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile. (P: S. Bazáes).

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK), cataliza la reacción reversible



Estudios realizados sobre la participación de residuos de arginina en diversas enzimas, han establecido que ellos tienen un papel esencial en enzimas cuyos sustratos son aniónicos. Dada la naturaleza de los sustratos y productos, se consideró interesante el estudiar la presencia de dichos residuos en el sitio activo de la enzima. Para ello se usaron dos reactivos, fenilglicoxal y 2,3-butanodiona. Los resultados preliminares nos permitieron sugerir la presencia de residuos de arginina en el sitio activo de la enzima.

En el presente trabajo, se presentan resultados de la cuantificación química de ellos, donde se da evidencia de la presencia de un residuo esencial de arginina por subunidad activa de enzima.

El hecho que el efecto protector de los sustratos y  $\text{Mn}^{2+}$  sea función de su concentración, permitió determinar las constantes de disociación de algunos complejos enzima-ligando, encontrándose valores de  $168 \pm 44 \mu\text{M}$  para E-ADP,  $244 \pm 54 \mu\text{M}$  para E-PEP y  $23 \pm 3 \mu\text{M}$  para E- $\text{Mn}^{2+}$ . Se encontró que  $\text{Mn}^{2+}$  y ADP protegen totalmente a la enzima de la inactivación en tanto que PEP sólo lo hace en forma parcial.

Financiado por DICYT, USACH.

PURIFICACION DE UNA PROTEINA ACTIVADORA DE TUBERCULO DE *S. tuberosum*. (Purification of activating protein from *S. tuberosum* tuber). Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Kettlun, A.M., Fanta, N., Traverso-Cori, A. Depto de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La apirasa es una difosfohidrolasa que al parecer cumple un rol relevante durante el desarrollo del tubérculo. Esto se deduce por dos razones: a) Se ha demostrado un aumento en masa en un período determinado del desarrollo, b) Se han identificado dos proteínas que regulan su actividad (activador e inhibidor).

Se ha intentado purificar la proteína activadora a partir del tubérculo de *S. tuberosum* tanto de var. *Ultimus* como var. *Desirée*, con el fin de poder caracterizar algunos parámetros. El esquema de purificación propuesto consiste en una precipitación 0-50% con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en un extracto de papas seguido de calentamiento y concentración por liofilización. A partir de esta fracción semipurificada se han intentado diferentes tipos de columnas consistentes en separaciones por carga y por peso molecular, las cuales no han dado resultados concluyentes por la gran inestabilidad de las fracciones obtenidas.

Finalmente, se ha intentado una columna de afinidad de CM-Celulosa a la cual se le ha unido covalentemente apirasa.

Se propone que esta proteína podría ser inducible ya que desaparece en tubérculos envejecidos o almacenados por un tiempo prolongado.

Proyecto B-2079-8624 D.I.B., Universidad de Chile.

PROTEINAS SERICAS EN LAS ENVOLTURAS VITELINAS DE OVOCITOS DE BUFO ARENARUM. (Serum proteins in the vitelline envelope of *Bufo arenarum* oocytes.) Mansilla, Z.C., Perdigón, G. Fernández, S.N. y Miceli, D.C. Inst. Sup. de Inv. Biol. (INSIBIO)- (CONICET UNT)- S.M. de Tucumán-Argentina.

Las secreciones oviduales en los anfibios están directamente involucradas en el proceso de la fecundación. Los ovocitos solo pueden ser fecundados después de atravesar la primera porción del oviducto denominada pars recta (PR)

Mediante técnicas inmunológicas y electroforéticas se demuestra que el fluido de secreción de PR está constituido por una fracción considerable de proteínas de origen plasmático.

Los anticuerpos contra las proteínas del fluido de secreción de PR permitieron detectar mediante inmunofluorescencia indirecta proteínas de dicha secreción en las envolturas vitelinas de ovocitos que no han atravesado el oviducto, lo que sugiere que las mismas son de origen plasmático. Observamos que los anticuerpos contra las secreciones de PR purificados mediante inmunoabsorbentes producen la disolución total de la envoltura vitelina de ovocitos de PR y que el suero de conejo normal inhibe el efecto biológico de las proteínas del fluido de secreción de PR. Dado que es conocido que: a) En *Bufo arenarum* no existe la vía clásica del complemento y en cambio se ha demostrado la vía alterna activable por enzimas proteolíticas similares a tripsina y plasmina. b) El fluido de secreción de PR posee actividad proteolítica similar a tripsina y plasmina y al contacto con las envolturas vitelinas produce la desorganización de la trama glicoproteica de la misma. c) En suero de mamíferos se encuentran múltiples inhibidores del complemento. d) La envoltura vitelina posee proteínas séricas englobadas en su trama glicoproteica. Surge entonces como interrogante si los factores del complemento están involucrados en el proceso de la fecundación.

EFFECTO DE LA ADRENALINA SOBRE LA BIOSINTESIS DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN CELULAS AISLADAS DE CORTEZA SUPRARRENAL DE RATA. (Effect of epinephrine on arachidonic acid biosynthesis in rat isolated adrenocortical cells). Mandon, E.C. y Gómez Dumm, I.N.T.de.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INBIOLP), CONICET-UNLP, Facultad de Cs.Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

La actividad de las desaturasas hepáticas de los mamíferos está regulada por varias hormonas. Recientemente nosotros hemos descrito la presencia de  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturasas activas en los microsomas de glándula suprarrenal de rata que se inhiben cuando se administra adrenalina *in vivo*. Teniendo en cuenta la diversidad de funciones de las distintas células que componen la totalidad de la glándula suprarrenal y las innumerables variables que intervienen en el animal entero, en este trabajo hemos restringido el estudio a las células aisladas de la corteza suprarrenal (zona fasciculata-reticularis) y hemos estudiado el efecto de la hormona *in vivo* e *in vitro*. Se trataron ratas con adrenalina (1 mg/1 kg peso corporal) y se sacrificaron a diferentes tiempos. Se aislaron las células de la corteza suprarrenal y se incubaron en presencia del ácido 1-14C eicosa-8,11,14-trienoico (20:3n6). Se observó que dichas células incorporan rápidamente el ácido 20:3n6 y lo desaturan a ácido araquidónico. La incorporación de este ácido y su transformación en ácido araquidónico disminuye en las células de animales tratados con adrenalina. En cambio, el agregado de adrenalina al medio de incubación de células obtenidas de animales no tratados no modifica significativamente la incorporación y desaturación del ácido 20:3n6. Se concluye que la adrenalina administrada al animal entero deprime la actividad de la  $\Delta 5$  desaturasa en la corteza suprarrenal de rata. El hecho que este efecto no haya podido ser reproducido *in vitro* hace presumir que la acción hormonal se realizaría indirectamente.

HISTOESPERMIOGENESIS TIPICA Y ATIPICA DE *Santochorus cassidiforme* (MURICIDAE: PROSOBRANCHIA). (Typical and atypical Spermiogenesis from *Santochorus cassidiforme* [Muricidae: Prosobranchia]).

Marín, O.E., López, M.I., Amín, M.F. y Delpín, M.E. Departamentos de Biología Molecular y Oceanología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

En muchas especies de Gastrópodos Prosobranquios se ha encontrado que el testículo produce dos tipos de espermatozoides durante la espermiogénesis: típicos y atípicos. Esta particularidad ha sido descrita en Meso gastrópodos, Neogastrópodos y en algunos Arqueogastrópodos.

La función propia de los espermatozoides típicos es la fecundación del óvulo, pero la función de los espermatozoides atípicos no ha sido claramente establecida.

El presente trabajo informa sobre la ocurrencia de espermiogénesis típica y atípica en *S. cassidiforme*. Se utilizaron técnicas habituales para microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Para la histoespermiogénesis típica se caracterizan las espermátidas en diferentes estados de maduración mostrándose la gradual condensación de la cromatina y el desarrollo del acrosoma. En la histoespermiogénesis atípica se describe la presencia de espermátidas de diámetro uniforme en toda su longitud y en corte transversal se observan múltiples axonemas ubicados de preferencia en la periferia de la célula y gránulos electrodensos en la región central.

Los espermatozoides atípicos son de un tamaño muy superior a los típicos. Se sugiere que en esta especie los espermatozoides atípicos juegan un rol nutritivo y no de transporte, como se ha sugerido para otras especies de gastrópodos, ya que esta especie tiene fecundación interna.

Proyecto 20.30.10 Dirección Investigación, U.Concepción

INDUCCION POR DEXAMETASONA DE UN MENSAJERO SOLUBLE QUE INHIBE DESATURASAS MICROSOMALES HEPATICAS. (Dexamethasone induction of a soluble messenger that inhibits microsomal desaturases). Marra, C.A. y Alaniz, M.J.I.de.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, Facultad de Cs. Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

La inyección de dexametasona (Dx) a ratas Wistar (1 mg/rata, vía intraperitoneal) produce al cabo de 12 hs una disminución significativa de las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturantes, en microsomas hepáticos.

Estos efectos se correlacionan con determinaciones cuantitativas del contenido de ácidos grasos microsomales. La acción inhibitoria sobre ambas desaturasas pudo ser reproducida agregando a microsomas hepáticos de ratas sin tratamiento hormonal, el sobrenadante obtenido a 105.000 g por lavado de microsomas hepáticos de animales inyectados con Dx. Esto probaría la existencia de un factor inhibitorio inducido por la hormona, lábilmemente unido a la membrana microsomal, pues se lo puede separar por lavado en frío con una solución de baja fuerza iónica. El tratamiento de la fracción soluble que contiene dicho factor, con tripsina, provoca la pérdida de su actividad biológica. La incubación de microsomas completos o lavados con diferentes cantidades de citosol de hígado de ratas inyectadas con Dx, demostró que este factor modulador de la actividad desaturante también está presente en la fracción citosólica. Este trabajo sugiere que la inyección del glucocorticoide a ratas, induce la biosíntesis de un factor de naturaleza proteica o peptídica capaz de inhibir a las actividades  $\Delta 6$  y  $\Delta 5$  desaturantes de microsomas hepáticos; actuando en forma directa o a través de la activación de un factor preexistente.

RETROVIRUS Y LA GENESIS DEL ADENOCARCINOMA GASTRICO HUMANO. (Retrovirus and the genesis of human gastric adenocarcinoma). Marshall, S., Muñoz, G., González, F., Horvat, A. Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Biología. Universidad Católica de Valparaíso.

Un análisis ultraestructural de tejidos gástricos neoplásicos humanos en estado terminal, así como el de subfracciones enriquecidas de los mismos tejidos, demuestran la presencia de estructuras tipo viral, idénticas a las descritas como retrovirus tipo D. Más aún, ultimamente hemos confirmado que en las fracciones enriquecidas con partículas, detectamos actividad endógena de RNA-dependiente-DNA polimerasa, mejor conocida como transcriptasa inversa. La evidencia de que no se trata de una DNA polimerasa contaminante se comprueba por las características de la reacción: Resistente a Actinomicina D, Sensible a pretratamiento con Ribonucleasas y, principalmente, porque el producto de la reacción se detecta como un híbrido RNA-DNA en gradientes isopícnicos de Sulfato de Cesio.

Gracias a las técnicas clínicas de detección temprana de la enfermedad, podemos obtener muestras en diferentes grados de evolución de la misma. Por ello, realizamos un estudio comparativo entre las muestras, analizando cada una de ellas por aparición de partículas tipo viral, y la detección de actividad endógena de transcriptasa inversa. Pretendemos correlacionar la aparición y asociación entre estos dos parámetros moleculares en la evolución de este tipo de neoplasia. Nuestras evidencias nos han permitido elaborar un modelo de hipótesis de trabajo, que podría explicar la génesis del adenocarcinoma gástrico humano.

ENALAPRIL Y HEXADIMETRINA:EFECTOS SOBRE MEDIADORES,LA ALGESIA Y EL EDEMA EN LA REACCION INFLAMATORIA AGUDA (Enalapril and hexadimethrine:Effects on mediators, algescia and oedema in the acute inflammatory reaction) Martín, N.; Vargas, M.; Van Rysselberghe, J.; Echeverría, M.E. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Las cininas son péptidos que se generan durante la respuesta inflamatoria. La bradisinina liberada en las primeras horas del edema inducido por carragenina en la rata, es potenciada por prostaglandinas (Ferreira y cols.). Sus efectos favorecen los signos nociceptivos y el incremento de permeabilidad, sin embargo su corta vida media hace difícil el estudio de estos parámetros.

En el presente trabajo estudiamos la acción de un inhibidor de la cininasa II (enalapril 1 y 2 mg/Kg), de hexadimetrina (25 mg/Kg) que reduce la formación de cininas y de indometacina (3 mg/Kg), sobre el edema y la respuesta nociceptiva inducidas por carragenina subplantar al 2%. Paralelamente se determinaron las concentraciones de histamina y serotonina (5-HT) en el exudado de las extremidades por espectrofluorimetría. Todos los controles fueron realizados a los 80 y 180 min. en grupos de a lo menos 6 ratas hembras, del mismo peso y origen.

El enalapril produjo un incremento del edema inducido por carragenina y una reducción de la respuesta nociceptiva a los 80 min., manteniéndose este último efecto a las tres horas y reduciéndose la histamina subplantar. La administración previa de hexadimetrina, si bien mantuvo el edema de la carragenina, éste fue significativamente menor que el obtenido con enalapril, siendo la respuesta hipalgésica más significativa. En esta experiencia la 5-HT se incrementó. El enalapril y la bradisinina 5 µg in situ potenció el edema y redujo relativamente la hipalgésia.

En nuestros tiempos de control si bien la bradisinina induce edema, presenta un efecto hipalgésico que se discute junto a los resultados obtenidos con indometacina. Proyecto 20.33.20. Direc. de Investigación.

EL 1,25-DIHIROXI-VITAMINA D<sub>3</sub> AFECTA LA DISTRIBUCION INTRACELULAR DE CALMODULINA EN MUSCULO ESQUELETICO. (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> affects intracellular calmodulin distribution in skeletal muscle). Massheimer, V., Fernández, L.M. y A.R. de Boland. Departamento de Biología. Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca. Argentina.

Estudios recientes han implicado al 1,25-dihidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) en la regulación del metabolismo de calcio en músculo esquelético. Se investigó la participación de calmodulina (CAM) en el mecanismo de acción de la hormona. Se utilizaron cultivos primarios de mioblastos de músculo esquelético de embrión de pollo y músculo diferenciado (soleus) de pollo deficiente en vitamina D tratados *in vivo* o *in vitro* con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. El transporte de Ca en mioblastos y músculo soleus fue estimulado por el esteroide e inhibido por flufenazina y compuesto 48/80. En presencia de los antagonistas de CAM no se observaron diferencias entre preparaciones control y tratadas con 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Se evaluaron los efectos de la hormona sobre los niveles de CAM en homogenizados y fracciones subcelulares. Se observó que el 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no afecta el contenido celular total de CAM mientras que produce un aumento en mitocondria, fracción microsomal (retículo sarcoplasmático y sarcolema) y miofibrillas (probablemente asociado con troponina c), y una disminución proporcional en citosol. Las variaciones fueron dependientes del tiempo de tratamiento con el metabolito. Los resultados sugieren que el 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> facilita la transferencia de CAM de citoplasma a membranas intracelulares y plasmática, lo cual podría resultar en cambios en la actividad de sistemas transportadores de Ca que son modulados por CAM. Se evaluó la posibilidad de que el esteroide afecte el ligando de CAM a proteínas de membrana mediante autorradiografía de geles SDS-PAGE incubados con <sup>125</sup>I-CAM.

**EL CITOESQUELETO DEL EMBRION DE RATON DURANTE LA COMPACTACION.** (The Cytoskeleton of mice embryos during compaction). Mayor, R. e Izquierdo, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hemos estudiado la organización del citoesqueleto del embrión preimplantacional de ratón; especialmente durante el proceso de compactación en el estado de 8 células cuando estas se asocian en un conjunto supracelular.

Después de extraer embriones en distintos estados con Triton X-100 hemos observado su citoesqueleto por microscopía electrónica de barrido y de transmisión en diversas condiciones.

Cada blastómero presenta un citoesqueleto cortical, formado por una malla densa de filamentos finos que probablemente corresponde a actina y un citoesqueleto interior formado por una malla laxa de filamentos gruesos que corresponden al material identificado como fibrilar el cual tiene una estructura periódica con hileras de ribosomas. A partir de la compactación se observan conexiones entre los citoesqueletos de células vecinas que probablemente corresponden a largas microvellosidades aparentemente continuas.

Se sugiere que estas conexiones entre citoesqueletos de células adyacentes son parte de la organización supracelular que se expresa en los fenómenos de regulación embrionaria y actividad génica diferencial.

**DISTRIBUCION SUBCELULAR Y ACTIVIDAD RELATIVA EN ORGANOS DE LA CIPROFIBROIL-COENZIMO A SINTETASA.** (Subcellular distribution and relative organ activity of ciprofibril CoA synthetase). Mc Elroy, M., Morales, M.N. y Bronfman, M. Departamento de Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

Trabajos recientes de nuestro laboratorio demuestran la presencia en hígado de rata de una acil-Coenzimo A sintasa capaz de activar ciprofibrato y otras drogas hipolipemiantes a tioésteres del Coenzimo A. En base a esos resultados hemos propuesto que esta activación sería la base de la acción farmacológica de estas drogas, que además de su efecto hipolipemiente producen diversos efectos metabólicos. Entre esos efectos, destaca una marcada proliferación de los peroxisomas hepáticos y de otros tejidos.

Con el fin de caracterizar esta actividad enzimática, se estudió su localización subcelular en hígado, encontrándose que un 65% de la actividad enzimática sedimenta en la fracción microsomal, siguiendo aproximadamente la distribución subcelular de la palmitoil-Coenzimo A sintetasa. Utilizando acil-Coenzimo A sintetasa purificada a partir de microsomas, se encontró que el Km de la enzima para ciprofibrato es dos órdenes de magnitud mayor que para palmitato como sustrato. El fraccionamiento subcelular permitió además demostrar la presencia de una activa ciprofibrato-Coenzimo A hidrolasa, presente en varias de las fracciones. Los estudios en otros tejidos revelaron que la mayor actividad específica de la ciprofibrato-Coenzimo A sintetasa se encuentra en hígado, seguido por miocardio y grasa epididimaria.

(Financiado por proyecto DIUC 82/86).

**FARMACOS MACROMOLECULARES: HEMISUCCINATO DE ALMIDON - DAPIRIDANOL.** (Molecular drugs: Dipyrindamole-starch-hemisuccinate) Medina, J.J., Sosa, R. y Muñoz de la Peña, A. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

El almidón es una macromolécula natural que se puede modificar para poder incorporar un fármaco, a través de formación de enlaces amídicos o éster, para lograr un efecto de liberación sostenida en el organismo. Se ha preparado el hemisuccinato de almidón (HS-A) sobre el que se ha incorporado el fármaco dipiridamol (DIP), el cual, por su acción vasodilatador coronaria sería de utilidad mantener, en forma sostenida, a niveles terapéuticos. Se ha incorporado GABA,  $\beta$ -alanina y glicina como brazos de unión del fármaco al HS-A, a objeto de favorecer la selectividad de un ataque enzimático.

En la metodología de obtención de estos derivados se ha utilizado almidón purificado y anhídrido succínico en piridina para el HS-A, y DCC y DMF para unir el fármaco al HS-A, se trabajó a 60°C. Identificación metódica se usó para unir los aminoácidos. Rendimientos: HS-A-DIP 81,4%, HS-A-GABA 88%, HS-A- $\beta$ -alanina 83%, HS-A-glicina 93,5% y HS-A-GABA-DIP 80%.

La incorporación de la droga y aminoácidos se controló mediante análisis de nitrógeno, y estudios de liberación del fármaco se siguieron mediante polarografía de pulso diferencial.

Proyecto DIB Q 1666-8634

**REGULACION DE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL MUSCULO UTERINO POR HISTAMINA Y SEROTONINA.** (Regulations of smooth muscle contractile activity by histamine and serotonin). Medina, J.L.; Neumann, V; Depto. Cs. Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

La bibliografía señala diferentes efectos de histamina (HIST) y serotonina (5-HT) sobre el músculo liso uterino en distintas especies. Sin embargo, aún no están bien dilucidadas ni la función ni los posibles mecanismos involucrados en la acción de estos mediadores.

Con el objeto de investigar un posible mecanismo regulador de estas aminas endógenas sobre la actividad uterina se procedió a determinar:

a) El efecto de HIST y 5-HT sobre la fuerza de contracción y sobre la liberación de catecolaminas en cuernos uterinos de ratón y b) la caracterización farmacológica de dicha respuesta.

Tanto HIST como 5-HT aumentaron la respuesta contráctil de los cuernos uterinos, efecto que se manifestó por un aumento tanto en el tono como en la altura, la amplitud y la frecuencia de la contracción registrada. Dicho efecto dependió de la concentración de la amina en el baño de incubación y del estado del ciclo estral (estro mayor que diestro).

Clorprimetón, pirilamina y nifedipina bloquearon el efecto estimulador de HIST. 5-HT no modifica la liberación de <sup>3</sup>H-NA previamente captada.

Se concluye que la actividad del útero es modificada por una acción sobre la fibra muscular lisa, efecto que podría jugar un rol importante en el aumento de las contracciones en el inicio del trabajo de parto.

Proyecto 20.33.28 Dirección de Investigación.

**DETECCION DE COMPLEJOS INMUNES EN PACIENTES CANCEROSOS**, (Detection of immune complexes in patients with cancer). Mercado, G., Silva, V. Depto. Bioquímica Aplicada, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Vega, R. Lab. Central. Hospital Higuera, Talcahuano.

En modelos tumorales animales se ha detectado la presencia de complejos inmunes circulantes (C.I.), demostrándose "in vitro" que ellos disminuyen la citotoxicidad natural contra células tumorales. Dada la importancia de la inmunidad celular en la respuesta anti-tumor, se ha estimado de interés detectar la presencia de C. I. en sujetos aparentemente sanos (controles) y pacientes cancerosos y determinar la composición parcial de los C.I. (clases de inmunoglobulinas-IgG y fracción C<sub>3</sub> del complemento).

Se precipita C.I. de suero de pacientes con cáncer y controles, utilizando polietilenglicol al 3.5% según Chia y col. Se determina el porcentaje de IgG y C<sub>3</sub> en los precipitados. Paralelamente, se realiza la separación de C.I. de cada uno de los pacientes, por cromatografía en Sephadex G-200 a pH ácido y se determina a cada fracción el contenido de proteína, clases de IgG y C<sub>3</sub>.

En los controles se observa diferencia cuantitativa en el perfil de elución según la edad. No se encuentra C.I. circulantes en pacientes cancerosos según criterio de Chia y col. Sin embargo, se observa diferencia cualitativa en los patrones de elución de los cancerosos con respecto a los controles.

Se discuten los resultados en relación a una posible diferencia cualitativa en la naturaleza de los C.I. de los pacientes cancerosos y su posible relación con el efecto inmunosupresor en la respuesta inmune antitumoral.

**CAMBIO EN LA BIOSINTESIS PROTEICA EN RAPS MEDIADOS POR TEMPERATURAS BAJAS**. (Changes in Protein Synthesis in rapeseed seedlings during a low temperature treatment) Meza-Basso, L., Berger, M.E., Raynal, M., Ferrero-Cadínanos, M.L., Delseny, M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Laboratorio de Physiologie Végétale, Université de Perpignan, Francia.

Se ha observado que en algunos vegetales resistentes al frío, se induce como respuesta compensatoria, la síntesis de proteína específicas. Se entregan antecedentes que apoyan la hipótesis que estos vegetales contendrían genes responsables de la tolerancia al frío y que los ajustes metabólicos observados configurarían una serie de estrategias adaptativas diversas.

Para el análisis de la síntesis proteica se germinaron semillas de raps de una variedad de invierno. Las plántulas fueron crecidas por tiempos variables a 18° o a 0°C, incubándolas con <sup>35</sup>S metionina durante las 2 últimas horas. El análisis de síntesis proteica in vitro se realizó extrayendo poli A<sup>+</sup>RNA total. Los poli A<sup>+</sup>RNA fueron traducidos en un sistema libre de células. Los productos sintetizados in vivo e in vitro fueron analizados por electroforesis bidimensional.

La síntesis proteica continúa a 0°C y ciertos polipéptidos se acumulan preferencialmente a esa temperatura. Por otra parte, la síntesis de otros polipéptidos se reprime, mientras que algunos son insensibles al tratamiento. Cambios similares se observan en la síntesis proteica in vitro a 0°C en comparación a los controles. Entre los genes que son reprimidos se encuentra la SP de la RuBisCo. La respuesta compensatoria se detecta luego de cortos períodos a 0°C.

Se trabaja en la identificación de algunos de estos productos inducibles y se discute la relevancia de los cambios en la expresión genética y su asociación al desarrollo de la tolerancia al frío.

Financiado por DID, UACH S-84-29 CNRS (UA 565, AIP 95 31 67).

**SINTESIS Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN EL OVIDUCTO DE BUFO ARENARUM. EFECTO DE 17- $\beta$  ESTRADIOL**. (Protein synthesis and secretion in *B. arenarum* oviduct. Estradiol 17- $\beta$  effect). Miceli, D.C., Mansilla, C. y Fernandez, S.N. Depart. de Biología del Desarrollo, Instituto Superior de Invest. Biológicas, CONICET-Univ. Nacional de Tucumán. R.A.

Se demostró que la función de la porción anterior del oviducto de anfibios (pars recta, PR), cuya secreción está directamente involucrada en la fecundación, es regulada por esteroides sexuales. Asimismo, el estudio de la ultraestructura del epitelio de la PR demostró que existe correlación entre el efecto hormonal, la actividad biológica y el grado de desarrollo de las células secretoras. A pesar de que el estrógeno induce la proliferación celular, el análisis de la fracción citosólica y nuclear indicaba ausencia de receptor típico. Sin embargo en este trabajo se demuestra que existe incremento de la síntesis proteica al cabo de 1h de tratamiento hormonal. Los experimentos de incorporación de aminoácidos radioactivos in vivo indican que la actividad específica de las proteínas del fluido de secreción es superior a la del tejido. El análisis mediante electroforesis y posterior fluorografía indica que la síntesis y secreción por efecto estrogénico es específico para determinadas proteínas. El posterior estudio in vitro confirma dichos resultados. Se detecta principalmente una proteína con alta incorporación específica (masa mol. relat.: 66 Kd) y otras (220Kd, 170Kd, 150Kd) que están ausentes en muestras controles. Estas son sintetizadas por el tejido y secretadas en forma preferencial al medio de cultivo por efecto de 17- $\beta$  estradiol. El efecto de DHT es mas evidente coincidiendo estos resultados con las observaciones al M.E. que demuestran la aparición de células repletas de granulos y mayor diferenciación del epitelio por efecto de esta hormona. El análisis del tejido indica que no todas las proteínas sintetizadas son secretadas al medio de cultivo.

Estos resultados nos llevan a postular nuevamente que la proteína ligante de esteroides puede cumplir en este caso, funciones de receptor citosólico.

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEOGLUCANO DE RETINA INSOLUBLE EN ACIDO TRICLOROACETICO**. (Partial characterization of trichloroacetic acid-insoluble proteoglycan of retina). Miozzo, M.C., Aon, M.A. y Curtino, J.A. Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC, Fac. Cs. Químicas-CONICET y Fac. Cs. Agropecuarias, U.N.C., Suc. 16, cc 61, 5016 Córdoba, Argentina.

Hemos descrito la unión de proteína a glucógeno de retina (Aon y Curtino, Eur. J. Biochem., 140, 557, 1984) a través de residuo tirosina en unión O-glicosídica (Aon y Curtino, Biochem. J., 229, 269, 1985). El proteoglicano es soluble en ácido tricloroacético (TCA) mientras que otra fracción de  $\alpha$ -1,4 glucano insoluble (GPI) es recuperada junto a las membranas de retina precipitadas por TCA.

GPI, al igual que el total de la proteína de las membranas precipitadas por TCA, se solubilizó en cloroformo-metanol-TCA en presencia de glucógeno carrier que es insoluble en ese medio. La neutralización con metilamina precipitó GPI y las proteínas de membrana. La solubilización en detergente de GPI precipitada junto con las membranas, fue dependiente del detergente y su concentración. Así, 35% y 53% de GPI y 15% y 24% del total de proteína de membrana (Prot) fue solubilizada con deoxicolato de sodio al 0,5% y 1%, respectivamente. El 70% y 100% de GPI y 67% y 77% de Prot fue solubilizada con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,5% y 2%, respectivamente. La fracción GPI solubilizada en SDS y pasada por columna de Sepharosa 6B coeluyó, con un Kav=0,33 (P.M. aprox. 450.000), junto a una cantidad de carbohidrato equivalente a 1/3 del polisacárido presente en la fracción proteoglicano. Sometida a electroforesis en medio disociante en gel de poliacrilamida, GPI se concentró en la zona límite entre 3% y 10% acrilamida. Al incubar las membranas de retina con UDP-14C-glucosa, GPI incorporó 14C-glucosa con una actividad específica (cpm/nmol Glc) siete veces mayor que la fracción proteoglicano, que estaba presente a una concentración de 0,77 mg por mililitro de incubado. (Subsidios: CONICET y CONICOR)

ESTUDIOS METABOLICOS EN UNA CEPA DE S.CEREVISIAE AUXOTROFICA PARA POLIAMINAS (Metabolic studies in a S.cerevisiae polyamine auxotrophic strain). Miret, J.J. y Goldemberg, S.H. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", Buenos Aires, Argentina.

En los últimos años se han aislado cepas de levaduras auxotróficas para poliaminas, con características de crecimiento similares a las de las mutantes bacterianas, que pueden servir como modelo para estudiar el metabolismo y función de las poliaminas en eucariotes inferiores.

Utilizando la mutante de S.cerevisiae 179-5, aislada por Hosaka y Yamashita, se efectuaron algunos estudios metabólicos. Establecidas las condiciones para deprimir el contenido endógeno de poliaminas, se analizó el efecto de estos policonos sobre la velocidad de crecimiento y síntesis de algunas macromoléculas, como RNA y proteínas. La disminución de todos estos procesos en células sometidas a ayuno se revierte por reagregado de poliaminas, siendo la síntesis de proteína la primera en recuperarse y llegar a los valores de la cepa parental.

Se estudió también la correlación entre contenido endógeno de poliaminas y velocidad de crecimiento, la captación de putrescina y espermidina y se midieron algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de poliaminas, como ornitina decarboxilasa y arginasa.

EFFECTO DEL COMPLEJO METAL-ATP SOBRE EL MECANISMO CINETICO DE HEXOQUINASA D (GLUCOQUINASA). (Effect of ATP-metal complex on the kinetic mechanism of hexokinase D (glucokinase)). O. Monasterio, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hexoquinasa D (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1) (glucoquinasa) exhibe una cinética de saturación hiperbólica entre amplios márgenes de concentraciones de 2-desoxiglucosa (0,1 a 9 veces Km) y de MgATP (0,5 a 40 veces Km). Estudios de velocidad inicial con estos sustratos y de inhibición de punto muerto con N-acetilglucosamina y AMP mostraron un mecanismo de adición de los sustratos en secuencia. Los resultados de la inhibición por AMP fueron compatibles tanto con un mecanismo ordenado, con 2-desoxiglucosa como primer sustrato, como con uno al azar con unión preferente de este sustrato. Para dilucidar esta ambigüedad en la interpretación de los resultados se estudió la inhibición por el complejo inerte de coordinación, Cr(III)ATP. Al medir la velocidad inicial de hexoquinasa D a pH 6,9, Cr(III)ATP mostró inhibición competitiva con respecto a MgATP e inhibición mayormente incompetitiva con respecto a 2-desoxiglucosa, con una constante de disociación de 4,5  $\mu$ M. Estos resultados confirman que el mecanismo cinético de adición de los sustratos es principalmente ordenado y 2-desoxiglucosa es el primer sustrato. La inhibición de la enzima por el complejo Mn(II)ATP fue competitiva con respecto a glucosa-6-fosfato a 100 mM glucosa y 5 mM ATP. Este resultado es similar al obtenido con magnesio, excepto que las líneas del gráfico de dobles recíprocos ( $1/v$  vs  $1/[MgATP]$  a diferentes concentraciones de glucosa-6-fosfato) se curvan hacia arriba, lo que sugiere que existiría más de un sitio de interacción con el nucleótido, que se hace observable en presencia de glucosa-6-fosfato.

Financiado por el proyecto DIB 2066-8633.

ANALISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HETEROCLITICA A HORMONAS DE CRECIMIENTO. (Analysis of the heteroclitic immune response to growth hormones). Mollerach-Gobbi, B., Retegui, L., y Peña, C. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-COMICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina.

La heteroclicidad, propiedad característica de anticuerpos que reconocen con mayor afinidad a un antígeno relacionado al inmunógeno que al inmunógeno mismo, fue observada en anticuerpos desarrollados por pacientes hipopituitarios tratados con hormona de crecimiento humana (hGH) que están dirigidos hacia las hormonas heterólogas bovina (bGH) y equina (eGH) y en monoclonales anti-bGH que fijan preferentemente eGH.

Se analizó la especificidad de estos anticuerpos en ensayos de competición utilizando fragmentos de bGH y eGH altamente purificados por cromatografía líquida de alta eficiencia y se estimó su capacidad de detectar perturbaciones conformacionales del antígeno por reacción con las hormonas reducidas y carbamidometiladas. Los anticuerpos inducidos en los pacientes reconocieron esencialmente una conformación proteica destruida por la apertura de los puentes disulfuro y se unieron con baja afinidad a algunos de los péptidos ensayados. Los monoclonales que también detectaron el cambio conformacional proteico reaccionaron con mayor afinidad con péptidos de la región amino-terminal de ambas hormonas.

El mapeo antigénico de dos antisueros convencionales, provenientes de conejos inoculados con bGH o eGH indicó la inmunodominancia de un área común localizada hacia el extremo N-terminal de estas proteínas.

Se concluye que la respuesta homo o heteroclitica hacia bGH y eGH está dirigida hacia la misma región predominante y que la elevada especificidad conformacional de los anticuerpos heterocliticos humanos refleja una probable alteración del inmunógeno durante su procesamiento por las células inmunocompetentes.

INHIBICION DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DEL PALADAR EMBRIONARIO POR DEXAMETASONA IN VITRO, EN DOS CEPAS DE RATÓN. (Inhibition of programmed cell death in embryonic palate by Dexamethasone in vitro, in two strains of mice). Montenegro, M.A., Jeria, M. y Palomino, H. Depto. Morfología Exp. y Depto. de Biología Celular y Genética. Fac. de Medicina, U. de Chile.

Trabajos previos han demostrado que los glucocorticoides (G. C.) producen fisura palatina en animales de laboratorio debido a que retrasan la horizontalización de los procesos palatinos e inhiben la muerte del epitelio palatino medio que ocurre normalmente. Además, se ha visto que al igual que en la especie humana, en el ratón se presenta distinta susceptibilidad a la producción de esta anomalía. En este trabajo analizamos el efecto de la dexametasona en la fusión de los procesos palatinos in vitro en dos cepas de ratón de diferente susceptibilidad.

Se utilizaron hembras grávidas de ratón de las cepas A/Sn y B/10. Se disecaron los procesos palatinos de embriones de 13 días de gestación y se cultivaron 72 h a 38°C en medio de cultivo normal o conteniendo la droga (100  $\mu$ g). El material fue procesado para M.O. y M.E.

La dexametasona inhibe la fusión de los procesos palatinos in vitro en ambas cepas de ratón, pero en un porcentaje mayor en la cepa A/Sn. En ambas cepas se produce la inhibición de la muerte celular programada que ocurre normalmente ya que el epitelio palatino medio persiste intacto.

Si bien los estudios in vivo indican que la cepa A/Sn es medianamente susceptible y la cepa B/10 es resistente, los estudios in vitro no demuestran grandes diferencias entre las cepas, lo que estaría indicando que la muerte celular programada no sería el único factor determinante de la diferente susceptibilidad, sino que existirían otros mecanismos involucrados.

Proyecto DIB-2368-8615. U. de Chile.

FENOMENOS POST-TETANICOS EN LA NEUROTRANSMISION DEL CONDUCTO DEFERENTE. (Post-tetanic events in the rat vas deferens neurotransmission). Montiel, J., Campos, H.M. y Huidobro-Toro, J.P., Laboratorio de Farmacología, P. Universidad Católica de Chile.

La potenciación post-tetánica (PPT) es un hecho relativamente conocido de la placa neuromuscular. Para investigar si este fenómeno se produce en sistemas adrenérgicos, se utilizó la unión neuroefectora del conducto deferente de rata. Se aislaron mitades epididimarias y prostáticas del conducto que se perfunden con Tyrode a 37°C; se registra contracción muscular isométrica. Se estimula eléctricamente fibras nerviosas (70 v, 1 ms) con pulsos de 0.15 ó 15 Hz. Después de un tren de estímulos de 15 Hz x 30 s, los pulsos de 0.15 Hz en la mitad epididimaria muestran PPT, mientras que en el segmento prostático se evidenció inhibición post-tetánica (IPT). Tanto la PPT e IPT son frecuencia-tiempo dependientes y desaparecen con tetrodotoxina, guanetidina ó 6-hidroxidopamina. La PPT se atenúa en conductos de ratas reserpinizadas o tejidos tratados con prazosina. En cambio, la IPT aumenta con reserpina o bloqueo alfa-adrenérgico. Sólo la IPT se reduce con bicuculina o estricnina, pero ni la PPT o IPT se modifican con naloxona, propranolol, yohimbina, teofilina o indometacina. Esta colección de experimentos permite descartar efectos mediados por opioides endógenos, receptores presinápticos adrenérgicos o purinérgicos y prostaglandinas en las respuestas post-tetánicas descritas. Se concluye que la PPT se relaciona con estereolaminas mientras que la IPT se podría explicar por acción de GABA o glicina. Queda de manifiesto la existencia de PPT e IPT en esta unión neuroefectora y la complejidad de la neurotransmisión en este tejido. Experimentos en curso están dilucidando el mecanismo de la PPT e IPT.

Financiada en parte por proyecto DIUC 74/86.

Salmonella typhi (OmpF<sup>-</sup>) RESISTENTE AL CLORANFENICOL. (Resistance to Chloramphenicol in Salmonella typhi(OmpF<sup>-</sup>)) Mora, G.C., Calderón, I. Lobos, S. y Alvarado, C.: Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biología Celular Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Es un hecho comprobado, que moléculas hidrófilas de bajo peso molecular, pueden atravesar la Membrana Externa de bacterias Gram(-) a través de poros o canales acuosos existentes en ésta.

Las porinas, un grupo especializado de proteínas forman estos poros y a través de ellas se establece la difusión rápida de moléculas tales como azúcares, aminoácidos, iones inorgánicos que posean un peso molecular menor de 600-700 daltons. Estudios realizados con mutantes de E. coli deficientes en 1 o más porinas han demostrado que la permeabilidad de la membrana externa a los antibióticos depende de la presencia de estos canales. La resistencia comprobada en estos casos ha sido tanto hacia tetraciclina, cloramfenicol como hacia algunos betalactámicos. Así, se ha encontrado una gran variedad de Enterobacteriáceas cuya resistencia a antibióticos está relacionada con la ausencia de porinas.

En este trabajo presentamos el primer caso descrito de resistencia a cloramfenicol en un aislado clínico de S. typhi.

Se trata de una cepa carente de plasmidios, y de actividad cloramfenicol-acetil transferasa; que no posee ribosomas mutados responsables de la resistencia a este antibiótico, comprobado mediante esferoplastos producidos en esta cepa, los que son incapaces de recuperarse después del tratamiento con cloramfenicol. El análisis de proteínas de la Membrana Externa de estas bacterias en PAGE-SDS revela claramente la ausencia de la porina OmpF, lo cual estaría sugiriendo que se trata de una mutación que afecta la permeabilidad de la Membrana Externa de ellas. (Financiado parcialmente por DIUC 74/85).

TRANSPORTE DE MICROESFERAS POR EL OVIDUCTO DE LA RATA. (Transport of microspheres by the rat oviduct). Moore, C., Croxatto, H.B. - Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Microesferas de almidón, dextrano o poli (DL-láctido-co-glicolido) de 80-140 um de diámetro fueron transferidas al infundíbulo del oviducto de ratas por medio de una técnica microquirúrgica con el objeto de evaluar si la técnica altera el transporte y viabilidad de los huevos nativos, si las microesferas remedan el transporte normal y acelerado de huevos nativos, si su velocidad de transporte guarda relación con sus propiedades físico-químicas y con el estado reproductivo de la hembra receptora. La técnica de transferencia aplicada en los días 1-3 de preñez (P1-P3) no altera el transporte de huevos al útero ni la viabilidad de los embriones nativos evaluada en P11-P12.

Las tres clases de microesferas se transportan a igual velocidad entre sí y llegan al útero con un leve retraso con respecto a los huevos nativos. Las microesferas transferidas en P2 o P3 son retenidas en el oviducto por lo menos hasta P11 observándose bloqueo parcial de su transporte a nivel de unión istmo-ampular y/o istmo-uterina en P4, P5 y P7.

Las microesferas transferidas en P1 y los huevos se transportan prematuramente al útero si se administra estradiol (lug s.c.) en P1, P2 o P3 mientras que las transferidas en P3 no se aceleran cuando se administra estradiol en P3. Esto indica que la unión istmo-ampular funciona de distinto modo y su respuesta al estradiol es diferente en P1 que en P3. Se concluye que microesferas de estos materiales pueden servir como sustitutos del huevo para evaluar la función de transporte del oviducto y esclarecer el programa operacional del órgano en diversas fases del ciclo reproductivo.

Financiado por RF 86020

EFFECTOS DE LA INYECCION INTRACAUDADA DE LHRH Y D-ALA-6-LHRH SOBRE LA ADQUISICION DE RESPUESTAS CONDICIONADAS. (Effects of the intracaudate injection of LHRH and D-ALA-6-LHRH on the acquisition of conditioned responses). Mora, S., Afani, A., Kusanovic, R. y Díaz-Véliz, G. Departamento de Preclínicas, División Ciencias Médicas Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La inyección de 1 ug de LHRH en el N. Caudado de ratas produce una inmediata inhibición de la capacidad de adquisición de respuestas condicionadas de evitación activa, lo cual no ocurre si se inyecta la hormona a través del ventrículo lateral, en hipocampo o N. accumbens. El presente trabajo tiene por objeto establecer una relación dosis-efecto para LHRH en el N. Caudado y, además, estudiar los efectos del análogo D-ALA-6-LHRH.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos de aproximadamente 200 g, las cuales fueron implantadas estereotáxicamente con canulas en uno de los N. Caudados. Una semana más tarde eran sometidas a la sesión de adquisición, inmediatamente después de la inyección de LHRH o D-ALA-6-LHRH o salina, la cual consistía en la presentación de tonos y choques eléctricos a intervalos de 30 seg entre los tonos.

Los resultados demuestran que existe una relación entre la dosis de LHRH inyectada en el N. Caudado y la inhibición del condicionamiento. Además, sugieren que esta estructura podría considerarse uno de los sitios en que se ejercería la acción conductual de LHRH en la rata. El análogo sintético de LHRH no modificó significativamente la conducta estudiada, llevando a pensar que los efectos conductuales de LHRH podrían ser independientes de sus propiedades neuroendocrinas.

Departamento de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile, (DIB). (Proyecto B-1633-8644).

MICROCIRUGIA EXPERIMENTAL: COLGAJOS CUTANEOS LIBRES VASCULARIZADOS EN RATAS. (Experimental microsurgery: Vascularized free flap islands in rats). Moreira, A., Kinast, C., Mercado, O. Instituto Cirugía. Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: R. Yulis).

La literatura sobre esta nueva y prometedora proyección de la cirugía comienza con Jacobson (1960) que sutura vasos cuyo calibre oscila entre dos o tres mm de diámetro externo. Las técnicas están ya descritas pero la aplicación de ellas y la adquisición de destreza manual, así como el manejo de las complicaciones propias de la técnica exige un largo período de entrenamiento con el microscopio. En el presente trabajo se realizan quince colgajos cutáneos vascularizados epigástricos llevándolos al cuello de las ratas. Anastomozándose vasos arteriales terminolateral de 0,8 mm de diámetro externo y vasos venosos de 0,9 mm de diámetro externo terminolateral. Los materiales usados fueron quince ratas cepa Holzman 300 gramos, anestesia nembutal 40 miligramos por kilo intraperitoneal, microscopio quirúrgico, micropinzas, microporta agujas, microclamps Acland, microsutura 10.0 (22 µ diámetro y aguja de 3 mm y 70 µ de diámetro). Se diseña colgajo epigástrico de 5 x 5 centímetros zona inguinal, se abordan los vasos femorales los cuales se disecan con micropinzas procediendo luego a ligar y seccionar los vasos femorales distal y proximal, procediendo a la irrigación de los vasos con suero heparinizado y lidocaina al dos por ciento para prevenir el vasoespasmo. La zona del cuello está preparada, arteria carótida y vena yugular disecada. Se procede a anastomosis terminolateral de la arteria y terminolateral de la vena con la técnica de Serra. Se comprueba permeabilidad completa en el postoperatorio inmediato en venas y arterias; la sutura arterial se evalúa por su pulsabilidad, temperatura y coloración, la sutura venosa por la coloración y por el flujo hacia la vena yugular. El estudio histológico de los sitios de anastomosis mostraron reacción inflamatoria neutra con la sutura. El estudio con microscopía electrónica de barrido muestra reconstitución ad íntegra de la íntima. Los colgajos cutáneos libres abren un gran mundo a la cirugía reparadora, reimplantación de miembros y trasplantes.

(Financiado por Proyecto RS-85-23 Dirección de Investigación de la Universidad Austral de Chile).

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA, LUZ Y SALINIDAD EN LA CAPACIDAD GERMINATIVA EN POBLACIONES DE Atriplex repanda. (The effects of temperature, light and salinity on seed germination capacity in Atriplex repanda populations). Moreno, R.J., Gutiérrez, J.R. y Aguilera, L.E. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena.

A. repanda es un arbusto forrajero, nativo del norte chileno cuya área de distribución se encuentra entre las latitudes 28° 34' y 32° 07' Sur, formando poblaciones pequeñas y aisladas territorialmente lo que impediría el flujo genético entre ellas.

La germinación de las semillas bajo condiciones naturales no supera el 1%. Sin embargo, se ha encontrado que la escarificación y longevidad incrementan la germinación en las semillas de esta especie, notándose una considerable variación según la procedencia de ellas.

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la luz (fotoperíodo versus oscuridad) y temperatura ( $T_0$  constante versus  $T_0$  variable) en la germinación de A. repanda y establecer si existen diferencias significativas en la germinación de once poblaciones sometidas a 7 niveles de salinidad (0 a 684.5 Mosmol NaCl) que permitan concebir una idea de diferenciación ecotípica.

Se encontró porcentajes de germinación más altos en semillas iluminadas y con temperatura variable que en aquellas germinadas en la oscuridad y con temperatura constante respectivamente. Las semillas de las distintas poblaciones, muestran diferencias en su capacidad germinativa en los diversos niveles de NaCl utilizados.

Se discute la diferenciación de las poblaciones para el carácter capacidad germinativa de las semillas, en relación a las condiciones del habitat existente en las diferentes áreas de colecta.

PROYECTO 1092/85. FONDECYT; Dir. Inv. de La Serena.

FOSFATASA ALCALINA EN CELULAS DUODENALES AISLADAS: CAMBIOS CUALITATIVOS POR LA ADMINISTRACION DE COLECALCIFEROL. ("Alkaline phosphatase in isolated duodenal epithelial cells: qualitative changes produced by cholecalciferol administration"). Moreno, J., Ferreira, R., Tolosa de Talamoni, N. y Caffas, F. Química Biológica, F.C.M., U.N. de Córdoba, ARGENTINA. Con el objeto de dilucidar si las modificaciones electroforéticas observadas por nosotros en la fosfatasa alcalina (FA) duodenal de pollos, tratados con vit. D (Arch Biochem Biophys 240:201;1985) se deben al aporte de distintas células con diferente grado de maduración, se aislaron células duodenales fluidas de acuerdo al método de Weiser. Se obtuvieron secuencialmente 6 fracciones. Consideramos las dos primeras como del ápice, 3ª y 4ª intermedia y las dos últimas provenientes de la cripta. La FA presenta su mayor actividad en la zona superior de la vellosidad y está casi ausente en la cripta. Electroforesis sobre gel de poliacrilamida realizada con la FA de las distintas fracciones celulares extraída a pH 7,5 durante 1 h con butanol al 33%, muestra en las células aisladas de raquíticos tres zonas de tinción, identificándose dos a tres bandas en cada una de ellas, sin diferencia en los tres tipos celulares. La administración de colecalciferol 24 h antes de la obtención de las células produce la desaparición de los componentes más rápidos de las tres zonas. En homogenatos dejados a 4°C durante 72 h pH 7,5 desaparece la heterogeneidad molecular de la enzima de los tratados con colecalciferol, sin modificaciones aparentes en la de raquíticos. La incubación a 30°C, 12 h, pH 7,5 de células aisladas, no produce solubilización significativa de la FA (2-4%). La extracción butanólica posterior a pH 5, muestra idéntico perfil electroforético al obtenido por la incubación con sialidasa exógena. Al incubarse las células a pH 7,5, 12 h 30°C se recupera del sobrenadante un alto porcentaje de la FA, siendo mayor en los pollos tratados con colecalciferol. El trazado electroforético muestra una sola banda en todos los casos, semejante a la que se obtiene por incubación de células de animales tratados, incubadas a 4°C, 72 h, pH 7,5. La FA solubilizada con butanol a pH 7,5, incubada a 30°C, 3 h pH 5,5 en presencia de membranas lisosomales aisladas, modifica su perfil electroforético, que se hace idéntico al de la enzima solubilizada a pH 7,5 sin extracción butanólica, tanto en raquíticos como en tratados. Se concluye: A) La desialización de todas las formas moleculares de la FA se realiza tanto en células diferenciadas como inmaduras. Su actividad se incrementa por efecto del colecalciferol. B) La desaparición de la heterogeneidad molecular de la enzima de pollos tratados, incubada a 4°C indicaría la presencia de un factor(es) de conversión, cuya actividad o propiedades catalíticas estarían modificadas por el colecalciferol.

PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CICLICO DEL HONGO DIMORFICO M. rouxii COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACTIVACION (Cyclic AMP-dependent protein kinase from the dimorphic fungus M. rouxii as a model for the study of the mechanism of activation). Moreno, S., Paveto, C., Passeron, S.

Dto. Química Biológica, Programa de Regulación Hormonal y Metabólica, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Univ. de Bs. As.

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (cAMP) de M. rouxii no se disocia por cAMP y sí lo hace en presencia del nucleótido y NaCl 0.5 M. Con el objeto de estudiar el mecanismo de activación de la enzima se investigó en primer lugar el número y calidad de sitios para el cAMP. Mediante el estudio de la cinética de disociación por dilución isotópica del cAMP-<sup>3</sup>H unido a la enzima se pudo llegar a dos conclusiones: 1) la velocidad de disociación del cAMP unido a la holoenzima es muy rápida, (50% en 2' a 4°C) y del cAMP unido a la subunidad reguladora es muy lenta (25% en 10' a 4°C); 2) en la holoenzima se ocupa un solo tipo de sitio y en la subunidad reguladora dos, midiendo ambas cinéticas de disociación a 30°C y en presencia de NaCl.

Por proteólisis controlada de la holoenzima R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> se obtuvo una especie RC, evidenciada en gradientes de sacarosa, que aún presenta dos calidades de sitios para el cAMP y muestra cooperatividad positiva en la reacción de fosforilación. Esto indica que el número de sitios para el cAMP en la holoenzima es 4. Se demostró que los análogos del cAMP sustituidos en C-8 tienen preferencia por un sitio de unión y los sustituidos en N<sub>6</sub> por el otro. Usando estos análogos en combinación, se demostró que tienen efecto sinérgico en la reacción de fosforilación de un heptapéptido (kemptido) usado como sustrato. Se concluye que la proteína quinasa de Mucor no difiere de las de eucariontes superiores en cuanto al número y calidad de sitios para el cAMP y que puede servir como modelo para estudiar si la activación implica obligatoriamente disociación de la holoenzima y necesidad de la ocupancia de los dos sitios.

**POLISOMAS Y TRADUCCION "IN VITRO" EN CULTIVO DE TEJIDOS DE TUBERCULO DE PAPA.** (Polysomes and "in vitro" translation in potato tuber tissue cultures). Moreno, S. y Tandecarz, J.S.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.

En una comunicación previa (SAIB, 1985), mostramos que en cultivo de tejidos de tubérculo de papa se encuentra solamente una de las tres isoenzimas de fosforilasa presentes normalmente en preparaciones soluble del explanto original, con una actividad específica de 10 a 12 veces mayor que la correspondiente en el tubérculo. La represión y desrepresión de genes en las células se puede estudiar a través del análisis de la capacidad de traducción de polisomas. Se procedió entonces al aislamiento de polisomas a distintos tiempos de desarrollo del callo (cultivo y subcultivo). Se presentan los perfiles polisomales obtenidos y la capacidad de traducción de los mismos a distintos tiempos del desarrollo del callo. Se encontró que el contenido de polisomas se incrementa rápidamente con el cultivo del tejido quiescente (tubérculo), el cual contiene ribosomas principalmente en la forma de monosomas. La capacidad de traducción de los polisomas durante el cultivo y subcultivo se midió a través de la incorporación de  $^{35}\text{S}$  metionina en un sistema de traducción de germen de trigo. Los polipéptidos traducidos "in vitro" se identificaron por fluorografía después de electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Los resultados obtenidos indican que el sistema de germen de trigo traduce eficientemente polipéptidos mayores de 70 Kd en las condiciones ensayadas. Además se observa en las fluorografías una banda cuyo peso molecular coincide con el de la subunidad de la fosforilasa de callo (67 Kd).

**FIDELIDAD DE LA TRADUCCION EN BACTERIAS DEFICIENTES EN POLIAMINAS.** (Translation fidelity in polyamine-deficient bacteria). Nastri, H.G. y Algranati, I.D.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Se ha investigado la precisión de la síntesis proteica en bacterias auxótrofas para poliaminas cultivadas en ausencia o presencia de estas sustancias y sometidas al mismo tiempo al ayuno de un aminoácido. En estas condiciones, que normalmente inducen un aumento en la frecuencia de errores de la traducción, la velocidad de la síntesis proteica prácticamente no se modificó en bacterias cultivadas sin poliaminas, pero se redujo notablemente en células suplementadas con estas sustancias. El análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de los polipéptidos sintetizados durante períodos de ayuno de un aminoácido, indicaron que sólo en las bacterias con niveles endógenos normales de poliaminas se produjo una disminución relativa de la síntesis de polipéptidos de alto peso molecular con una acumulación simultánea de péptidos pequeños. Estos resultados parecen indicar que en ausencia de poliaminas se produce un aumento más o menos generalizado en la frecuencia de errores de traducción. Por otro lado en bacterias cultivadas con poliaminas, el ayuno de un aminoácido provocó un marcado aumento en la síntesis de algunos polipéptidos que podrían estar relacionados con proteínas que aparecen en condiciones de "stress".

**INHIBICION DE LOS EFECTOS DE NORADRENALINA, HORMONA ANTI-DIURETICA, ANGIOTENSINA II Y ALDOSTERONA POR FACTOR AURICULAR DE BOVINO EN PIEL AISLADA DE SAPO.** (Inhibition of the effects of noradrenaline, antidiuretic hormone, angiotensin II and aldosterone by bovine atrial factor). Norris, B., Concha, J., Pantoja, C., Chiang, L. Depto. Cs. Fisiol., Fac. Cs. Biol. y R.N., Universidad de Concepción.

Este trabajo presenta evidencia que un factor auricular de bovino (FAB) bloquea el aumento de transporte de  $\text{Na}^+$  inducido por noradrenalina (NA), hormona antidiurética (ADH), angiotensina II (Agt II) y aldosterona (A) en piel de sapo.

En piel abdominal de *Pleurodema thaul*, colocada en cámara modificada de Ussing, se registró diferencia de potencial (DP) y corriente de corto-circuito (COC). El preparado usado fue un extracto acuoso concentrado y dializado según trabajos anteriores de este laboratorio en concentración aproximada de 0.08  $\mu\text{g}$  por el lado serosal. La prueba de amilorida de Isaacson, antes y después de la acción de FAB, permitió medir el potencial de  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}}$ ), conductancia activa de  $\text{Na}^+$  ( $G_{\text{Na}}$ ) y conductancia pasiva ( $G_{\text{sh}}$ ). Todas las drogas, excepto amilorida, se aplicaron en el lado serosal.

FAB disminuyó parámetros eléctricos de la piel: DP bajó en 57.7 $\pm$ 2.7%, COC 66.5 $\pm$ 3.3%,  $E_{\text{Na}}$  51.0 $\pm$ 11.1%,  $G_{\text{Na}}$  36.4 $\pm$ 1.7% y  $G_{\text{sh}}$  20.8 $\pm$ 1.9%. Las 4 hormonas presentaron efectos dosis-dependientes; las concentraciones máximas empleadas (1  $\mu\text{mol}$  ADH, Agt II y NA, y 50  $\mu\text{mol}$  A) aumentaron COC 83.7 $\pm$ 14.2%, 54.4 $\pm$ 11.9%, 86.3 $\pm$ 8.8% y 90.0 $\pm$ 4.0% respectivamente. FAB inhibió estos efectos en 63.0 $\pm$ 3.0%, 51.5 $\pm$ 11.6%, 55.7 $\pm$ 12.1% y 47.3 $\pm$ 6.2% respectivamente.

Estos resultados sugieren que el efecto inhibidor de FAB se debería a disminución de permeabilidad de la membrana apical al  $\text{Na}^+$  en piel de sapo, lo que se desprende de los valores arriba señalados. Se discute esta evidencia en relación a la función tubular renal.

\* Proyectos 20.33.18 y 20.33.10, U. de Concepción.

**RESPUESTA METABOLICA Y TEMPERATURA CORPORAL DEL CHINCOL (*Zonotrichia capensis*) EN ALTITUDES SIMULADAS.** (Metabolic response and body temperature of the chincol (*Zonotrichia capensis*) in simulated altitudes). Novoa, F., Bozinović, F. y Rosenmann, M. Depto. Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Una caída en el  $\text{pO}_2$  inspirado que excede el límite de regulación, provoca en los mamíferos una disminución del metabolismo (M), proporcional al grado de hipoxia experimentado. La singular característica del pulmón de las aves y su amplia distribución altitudinal hacen esperar que ellas demuestren una mayor resistencia a la disminución del  $\text{pO}_2$  ambiental que la descrita en mamíferos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la respuesta del chincol a un gradiente altitudinal simulado.

Las mediciones de M se realizaron en 5 individuos de 20,3 $\pm$ 1,9 g ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ), sometidos a distintos grados de hipoxia ( $\text{pO}_2$  100 a 40 Torr) y a temperaturas de -5°C a 25°C.

La respuesta aguda de *Z. capensis* a la hipoxia experimental demuestra que M se mantiene constante tanto en termoneutralidad como en el frío y en atmósferas de tan bajo  $\text{pO}_2$  como las existentes sobre 10.000 m (2,95 $\pm$ 0,52 y 6,72 $\pm$ 0,66 ml  $\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{h}$  a 25°C y -5°C respectivamente). A pesar de la mantención de M, se observó una marcada hipotermia que no es causada por una disminución en la producción de calor.

La indiferencia metabólica a la hipoxia en esta especie puede ser explicada por dos hipótesis: 1. Aumento de la ventilación y, 2. Aumento en la afinidad de la hemoglobina por  $\text{O}_2$  durante la hipotermia.

Financiado en parte por proyecto DIB N1753-8644, Universidad de Chile.

UNIDAD ORGANÓ SUBCOMISURAL - FIBRA DE REISSNER EN EL MURCIÉLAGO. (Subcommissural organ-Reissner's fiber unit in the bat). Nualart, F.J. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: S.Hein)

Se investigó la unidad órgano subcomisural-fibra de Reissner (OSC-FR) de tres especies de murciélagos aplicando métodos convencionales para microscopía óptica e inmunocitoquímica usando un anticuerpo específico contra el material secretorio del OSC. También se realizó un estudio ultraestructural.

El OSC fue gomori-negativo, carecía de material inmunoreactivo y a nivel ultraestructural no se encontró signos de actividad secretora. No se observó FR y el canal central de la médula espinal estaba obliterado o ausente.

Estos resultados muestran que el OSC de murciélago a diferencia de la mayoría de las especies de vertebrados, carece de una actividad secretora, lo que a su vez resultaría en la ausencia de la FR. Se sugiere que la FR jugaría un rol en mantener el canal central de la médula espinal abierto y permeable a la circulación del líquido cefalorraquídeo.

Financiado Proyecto S-85-39 Dir. Investigación, U.A.Ch. y Grant I/38 259 Stiftung Volkswagenwerk.

CARACTERIZACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DE  $Ca^{2+}$  DEL CANAL DE  $K^+$  ACTIVADO POR  $Ca^{2+}$  DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATA. (Characterization of the  $Ca^{2+}$  binding site of the  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel from rat skeletal muscle). Oberhauser, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. (Patrocinio: D. Wolff)

El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  del túbulo transversal de la rata es un canal iónico, cuya actividad depende de la  $[Ca^{2+}]$  intracelular y del potencial eléctrico a través de la membrana. Con el objetivo de determinar las características físicoquímicas del sitio que liga  $Ca^{2+}$ , se estudió el canal incorporado en bicapas artificiales de fosfolípidos. Usando esta técnica se determinó la secuencia de afinidad del canal para una serie de cationes divalentes, mediante la capacidad de estos iones de activar el canal. Se encontró que la secuencia relativa de afinidad del sitio que une  $Ca^{2+}$  es,  $Ca^{2+}(1) > Cd^{2+}(1 \times 10^{-3}) > Sr^{2+}(2 \times 10^{-3}) > Mn^{2+}(1 \times 10^{-3}) > Fe^{2+}(3 \times 10^{-4}) > Co^{2+}(2 \times 10^{-4})$ . Sobre la base de estos resultados se contruyó un modelo para el sitio que une  $Ca^{2+}$ , basado solamente en interacciones electrostáticas entre los cationes divalentes y grupos de unión aniónicos. Se encontró que el modelo que mejor describe los resultados, contiene dos grupos de ligamen (probablemente carboxílicos) de radio 0,06 nm y espaciados en 0,20 nm. Los resultados obtenidos para la activación del canal por  $Mg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  en presencia de  $Ca^{2+}$ , sugieren la existencia de un sitio alostérico accesible por el lado citoplasmático. La unión de estos iones a este sitio produciría el desenmascaramiento de nuevos sitios específicos para  $Ca^{2+}$ .

Financiado por el DIB, Proyecto N°-1984-8523 y Fundación Tinker.

DIFERENTES MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL ÁREA MÍNIMA EN NOTHOFAGO-PERSEETUM BOLDETOSUM. (Different methods to Determination of Minimal Area in Nothofago-Perseetum Boldetosum). Núñez, L. Laboratorio de Geobotánica, Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: M. Romero).

El objetivo del presente trabajo es la descripción de diferentes métodos empleados en la determinación del área mínima.

Se realizaron inventarios en terreno en la asociación Nothofago-Perseetum Boldetosum, en las cercanías del río Bueno, próximo a la Carretera Panamericana Sur, provincia de Valdivia, Décima Región.

Mediante la información recogida en terreno se procedió a la confección de las tablas respectivas, luego se dibujaron las curvas correspondientes.

Se recolectó información bibliográfica relacionada con las diferentes metodologías utilizadas en la determinación del área mínima.

Se seleccionaron algunas metodologías, aplicando algunas de ellas a la vegetación regional, de las cuales se dan a conocer los resultados obtenidos en el bosque de Peumus boldus.

Se comparan los resultados obtenidos en el bosque analizado.

Se concluye que la metodología tradicional de Braun-Blanquet, es la más simple y rápida, no descartándose el uso de otras que pueden ser empleadas en la vegetación nativa.

MORFOMETRÍA TRIDIMENSIONAL DE CELULAS DE MAMÍFEROS EN FUNCIÓN DEL PESO CORPORAL. (Three-dimensional morphology of mammalian cells as a function of body weight). Ocqueteau, C., Cury, M., Morgado, E., Becker, L., Mujica, L. y González, U. Departamento de Preclínicas, Facultad de Medicina (Oriente), Universidad de Chile, y Departamento de Matemática, Universidad de Concepción. (Patrocinio: M. Cury).

El propósito del presente trabajo es establecer en forma cuantitativa la relación entre las dimensiones celulares (en micrómetros) y la masa corporal (en gramos). La morfometría celular comprende el estudio histológico de cinco órganos en nueve especies de mamíferos de diverso tamaño, desde el ratón de 40 g hasta la vaca de 450 kg. Los métodos de fijación y de tinción fueron estandarizados y los cortes seriados de 7  $\mu$ m de espesor se practicaron en dos dimensiones del espacio que son ortogonales entre sí; de modo que en cada tipo celular se pudieron medir los tres diámetros (ancho, alto y profundidad). Los promedios de 30 mediciones fueron analizados mediante dos programas de computación, a saber: 1) análisis de conglomerados; y 2) análisis estadístico descriptivo.

De los dendogramas de los diversos tipos celulares se desprende que la mayoría de las células de mamífero tienen dimensiones semejantes y únicamente los adipocitos se caracterizan por una gran variabilidad en cuanto a diámetro, superficies y volúmenes.

LÍPIDOS DE PULMON Y CORAZON DE RATAS MACHOS CASTRADAS. (Lipids of lung and heart of castrated male rat). Ojeda M.S. y Giménez M.S. Cátedras de Química Biológica II y Anatomía y Fisiología de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera - 5.700 - San Luis Argentina.

Se está estudiando la regulación de la lipogénesis en animales castrados a fin de determinar el grado de participación de los andrógenos en la síntesis de lípidos. Se determinó el contenido de lípidos totales y de fosfolípidos en pulmón y corazón de ratas machos adultos a los 22 días de castración. Los lípidos fueron extraídos por el método clásico de Folch-Pi. Los fosfolípidos se cuantificaron determinando fósforo. El cálculo estadístico se realizó aplicando el test de Student para datos correlacionados. Se encontró que el contenido de lípidos totales es significativamente mayor en pulmón y corazón de ratas castradas.  $P < 0.01$  y  $P < 0.02$  respectivamente. Los umol de fósforo/mg lípidos son 11% menores en animales castrados que en los controles en los dos órganos estudiados.  $P < 0.05$ . Los resultados obtenidos sugieren que la supresión de los testículos en rata macho determina acumulación de lípidos en pulmón y corazón.

PRESENCIA DE LECTINA EN EL EXUDADO RADICULAR DE SOJA (Presence of lectin in soybean root exudate). Oliva, C. y Daleo, G. Instituto de Investigaciones Biológicas y Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de Mar del Plata.

Se ha postulado que las lectinas tendrían un papel como determinantes de la especificidad en el establecimiento de la relación simbiótica entre leguminosas y *Rhizobium*. En soja han sido caracterizadas la lectina de semilla y radícula; se ha demostrado también una modulación en los niveles y actividad de la lectina de radícula en condiciones que regulan el desarrollo nodular. En este trabajo se demuestra la presencia de lectina en el exudado radicular de soja y se la caracteriza parcialmente.

Se ha detectado lectina en el exudado de radículas de soja de dos días de crecimiento. Esta lectina muestra actividad aglutinante sobre *Rhizobium japonicum* y eritrocitos, actividad que es inhibida si el hepteno, galactosa es agregado al medio. Se cuantificó por medio de actividad aglutinante e inmunodifusión radial, lo que permitió determinar un aumento importante en los niveles de lectina en el exudado de radículas de 48 hs de crecimiento. Esta lectina fue purificada en columnas de afinidad Sepharose-rafínosa. La lectina así purificada demostró tener el mismo patrón de bandas que la lectina de semilla en Ouchterlony e idéntica movilidad electroforética en geles de SDS-Poliacrilamida. Experimentos preliminares indicarían que la presencia de nitrato o amonio en el medio modularían los niveles de lectina en el exudado, de manera similar a la lectina de superficie radicular. El estudio de los factores que regulan la acumulación de la lectina en el exudado permitirá aportar evidencias experimentales en favor del verdadero rol de la lectina en el exudado radicular. La presencia de lectina en el exudado radicular podría indicar que el proceso de reconocimiento se inicia en la rizosfera, antes de la unión de la bacteria a la planta huésped.

Subsidios de CIC, SUBCYT y CONICET.

MOVIMIENTOS DE DEFORMACION MEIOTICA EN EL HUEVO DE SAN GUIJUELA: CARACTERISTICAS Y RESPUESTA A DROGAS. (Meiotic deformation movements in the leech egg: characteristics and response to drugs). Olea, N., Matte, C. y Fernández, J. Dept. Biología. Fac. Ciencias, Univ. de Chile.

El huevo de *T. rude* exhibe una sucesión estereotipada de episodios de deformación asociados con la terminación de la meiosis, el establecimiento de dominios cromosómicos y la citoquinesis. Hay evidencia que la motricidad del huevo resulta de la contracción de una red ectoplásmica de filamentos de actina. Sin embargo, distintos episodios de deformación difieren marcadamente entre sí. Por tanto, parece razonable sospechar que el citoesqueleto de actina del huevo indiviso sufre cambios rítmicos de organización. En esta presentación se comparan los movimientos de deformación asociados con la descarga de los polocitos (Pol.), se determina la sensibilidad de estos procesos a la citochalasina B (CIT-B) y colchicina y se explora la estructura fina del ectoplasma ovular. La emisión del Pol. I es precedida por una onda de contracción que se desplaza entre el ecuador y el polo animal. Dosis altas de CIT-B (40-75 µg/ml) bloquean esta onda y la emisión del Pol., dosis intermedias (30-40 µg/ml) inducen reabsorción del Pol. (polocito fantasma) y dosis bajas (10-30 µg/ml) producen Pol. intactos pero previenen la citoquinesis I. La emisión del Pol. II es precedida por la deformación del hemisferio animal, que adopta la forma de cono. Este proceso es bloqueado por dosis altas e intermedias de CIT-B y un Pol. fantasma II no parece formarse. Dosis altas de colchicina ( $10^{-2}$  M) destruyen el núcleo meiótico, no afectan los movimientos de deformación y forman Pol. fantasmas I y II. Se propone un modelo de organización del huevo meiótico que incluye: a) una región discreta, diferenciada y pre-determinada de ectoplasma que constituye el polo animal y b) una red de actina probablemente sometida a oscilaciones de equilibrio monómero-polímero y capaz de efectuar contracciones de tipo isotónico e isodiamétrico (Proyecto B-1987/8635 DIB, Universidad de Chile).

FUNCIÓN ENDOCRINA EN RATAS TRATADAS CON MELATONINA (Endocrine function in treated rats with melatonin). Olivares, A. y Núñez, S. Unidad de Biología de la Producción. INTA, Universidad de Chile.

Ratas inmaduras de 20 días de edad inyectadas durante 20 días con melatonina presentan disminución en el peso del testículo, epidídimo, vesículas seminales y próstata.

En este trabajo se analizan parámetros endocrinos a fin de conocer el grado de compromiso de la función hormonal testicular.

Con este propósito ratas Wistar de 20 días se inyectaron con 100 µg de melatonina hasta los 40 días de edad. Al día siguiente de la última inyección se sacrificaron; se determinó LH y testosterona circulante por RIA y número de receptores en células de Leydig.

Células intersticiales se incubaron sin o con 5 UI de HCG por 3 horas y se determinó testosterona producida por método de RIA.

Los resultados obtenidos indican que los animales tratados presentan bajos niveles de LH cuando se los compara con los animales controles, (5ng/ml y 33ng/ml respectivamente).

Al analizar la capacidad esteroideogénica de las células de Leydig "in vitro" se encontró que la testosterona sintetizada por inducción de HCG está disminuida en los animales tratados a pesar que las células de Leydig presentan un mayor número de receptores para LH/HCG.

Se puede inferir que en ratas inmaduras melatonina exógena no sólo afectaría al hipotálamo y/o hipófisis sino que además la función endocrina del testículo. Futuros trabajos permitirán evaluar las alteraciones de la vía esteroideogénica de las células de Leydig. Financiado por DIB. U. de Chile. Proy. N°2020-8633.

ACCION INHIBITORIA COMPETITIVA DE PROGESTERONA ( $P\Delta^4$ ) SOBRE LA  $3\beta$ -HIDROXIESTEROIDE DEHIDROGENASA ( $\Delta_5$ - $\Delta_4$  ISOMERASA ( $3\beta$ SDH) EN MICROSOMAS Y TEJIDO PLACENTAL. (Competitive inhibitory action of Progesterone ( $P\Delta^4$ ) on  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase ( $\Delta_5$ - $\Delta_4$  isomerase ( $3\beta$ SDH) enzyme of microsomal and placental tissue) Olivier, N.S.; Genti-Raimondi, S.; Patrito L.C.; Flury, A. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Comunicaciones previas señalan que algunos esteroides (androstenediona, testosterona y dehidroepiandrosterona) suprimen la conversión Pregnenolona ( $P\Delta^3$ )- $P\Delta^4$  tanto en sistema celular como acelular. En tanto otros como  $P\Delta^4$ , Estrona y Estradiol solo inhiben en este último caso (PABS 1984). La falta de efecto inhibitorio de  $P\Delta^4$  en la conversión  $P\Delta^3$ - $P\Delta^4$  en tejido respecto a microsomas fue examinada midiendo las propiedades cinéticas de la enzima ( $3\beta$ SDH) en sistemas optimizados de trozos de tejido y microsomas. La  $HP\Delta^4$  formada, así como la  $HP\Delta^5$  remanente, fueron aisladas del sistema de incubación por procedimientos cromatográficos y llevadas a actividad específica constante. Los resultados indican un Km de 0,55  $\mu$ M en microsomas y 2,1  $\mu$ M en tejido. El análisis cinético del efecto inhibitorio de  $P\Delta^4$  sobre la actividad de la  $3\beta$ SDH revela que este esteroide, actúa como un inhibidor competitivo de la enzima, con un Ki de 0,6 y 1,8  $\mu$ M para microsomas y tejido respectivamente. Se concluye que la  $P\Delta^4$  actuaría "in vivo" regulando sus propia formación y que las diferencias observadas en los sistemas de conversión son justificadas por las diferencias constantes de inhibición halladas.

ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS PROTEICOS DE BRUCELLA. (Study of the Brucella protein antigens). Angel Oñate y Gisela Eller. Instituto de Medicina Experimental, Universidad Austral de Chile.

Los antígenos proteicos juegan un rol preponderante en la inducción de la respuesta inmune celular contra Brucella, en contraste con los lipopolisacáridos que portan los antígenos inmunodominantes para la respuesta inmune humoral.

En el presente trabajo se extrajeron las proteínas de Brucella sp. y se estudiaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS. Los geles fueron sometidos a tinción diferencial para proteínas, lípidos y polisacáridos o usados para transferir las proteínas bandeadas a membranas de nitrocelulosa con el fin de realizar un estudio más completo de ellas.

Los resultados muestran que es posible distinguir mediante esta técnica aproximadamente 45 bandas diferentes, la mayoría de las cuales contiene además de proteínas, lípidos y carbohidratos en cantidades importantes. Además resultados preliminares permiten afirmar que las proteínas de bajo peso molecular (entre 14.500 y 10.000) son las más importantes desde un punto de vista inmunogénico.

Financiado por United Nations University Contract 85-111 e International Foundation for Science Grant B/947-1.

(Patrocinio: Dr. Hugo Folch).

DISTRIBUCION NUCLEAR DEL ANTIGENO T EN CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. CORRELACION CON LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA. (Nuclear distribution of T-antigen in SV40-transformed cells. Correlation with cell growth rate). Ordenes, E. y Santos, M. Depto. Biología Celular y Genética. Fac. Medicina, Div. Norte. Universidad de Chile.

Las células transformadas por SV40 sintetizan el antígeno tumoral mayor (ag-T), de origen viral, que se localiza en el núcleo y en la superficie celular. Entre otras funciones, el ag-T es capaz de unirse al DNA celular e inducir su replicación, lo que sugiere que podría participar en el control de la proliferación de estas células. Una forma de abordar este problema consiste en definir la dinámica de las interacciones del ag-T con determinadas estructuras subcelulares, en relación con la actividad proliferativa. El objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de distribución nuclear del ag-T tanto en poblaciones con distinta actividad proliferativa, como en células en  $G_1$ , S o  $G_2$ . Con este objeto, se sincronizó células mKSA-Asc mediante tratamiento con Hidroxiurea, y se obtuvo poblaciones celulares con distinta fracción proliferativa, variando las condiciones de cultivo. El ag-T se detectó mediante la reacción de inmunoperoxidasa (IAP).

Los resultados mostraron que el patrón de distribución nuclear del ag-T varía de acuerdo al estado proliferativo de las células y se modifica a lo largo de  $G_1$ , S y  $G_2$ . El ag-T presenta una distribución similar a la del DNA durante la interfase, es excluido de los cromosomas en la mitosis y de nuevo es nuclear al inicio de otro ciclo. Estas variaciones cíclicas podrían estar relacionadas con la mantención de las células transformadas por SV40 en constante proliferación. Proyecto 1137 Fondecyt, B2366-8613DIB

FLUJOS METABOLICOS DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS AISLADOS. EVALUACION DE LA CONTRIBUCION PEROXISOMAL. (Metabolic fluxes of fatty acids in isolated hepatocytes. Evaluation of peroxisomal contribution). Orellana, A., y Bronfman, M. Lab. de Citología Bioquímica, Depto. de Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

La beta oxidación de ácidos grasos en el hígado se puede realizar en mitocondrias y peroxisomas. No está claro aún cuál es el aporte que realiza cada una de estas vías a la oxidación total de ácidos grasos hepáticos. Se ha postulado que la acetil-carnitina sería un producto de oxidación peroxisomal. En este trabajo se realizó un análisis cuantitativo del compartimiento de acetil-carnitina celular en hepatocitos aislados, provenientes de ratas normales y tratadas con Clorofibrato, una droga hipolipidante que aumenta en un orden de magnitud la oxidación peroxisomal. Los resultados muestran que en hepatocitos provenientes de ratas tratadas el tamaño del compartimiento de acetil-carnitina es mayor y la velocidad de recambio aumenta aproximadamente un orden de magnitud, con respecto a los hepatocitos de rata control. La clorofibrato, droga que inhibe selectivamente la beta oxidación peroxisomal hace caer el nivel de acetil-carnitina en un 35% en hepatocitos aislados de rata tratada. Considerando la hipótesis que la beta oxidación peroxisomal produce acetil-carnitina, se diseñó un modelo de flujo de ácidos grasos. El ajuste de los datos experimentales al modelo indican que este es una buena aproximación para resolver el problema de flujo de ácidos grasos por varias vías de beta oxidación. Se concluye que al oxidarse ácido láurico los peroxisomas producen acetil-carnitina y que el flujo a través de peroxisomas no es mayor a un 10%, incluso en hepatocitos de ratas tratadas con clorofibrato. (Financiado por Proyecto DIUC 82/86)

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE MONOXIGENASAS RENAL QUE CATALIZA LA OXIDACIÓN ANDROGENOS, (Characterization of renal monooxygenases system that catalized androgens oxidation). Orellana M.; Weinberger J.; Vasquez, H. Departamentos de Bioquímica, División Norte y Departamento de Medicina Experimental, División Sur, Facultad de Medicina - Universidad de Chile.

Citocromo P-450 es la oxidasa terminal en el sistema de monooxigenasas microsomiales que metaboliza compuestos lipofílicos exógenos y endógenos. Esta hemoproteína se encuentra principalmente en el hígado, pero también está presente en órganos extrahepáticos, tales como riñón y pulmón. El sistema de monooxigenasas hepático ha sido bien caracterizado, pero no ocurre lo mismo con el sistema renal.

En este trabajo se estudió el metabolismo renal de algunas hormonas esteroidales en ratas machos adultas de 210 grs. de peso de la cepa Wistar. La capacidad oxidativa del sistema de monooxigenasas en el riñón se midió utilizando como sustratos, Testosterona (T) y Androstenediona (A). Los productos de oxidación se analizaron por HPLC según la técnica de Mancilla y Gil (Analytical Letters 17, 873 - 886, 1984).

El riñón de rata contiene un quinto (0.12 nmol/mg. proteína) del contenido de citocromo P-450 del hígado, sin embargo, catalizó en forma muy eficiente la oxidación de (A) y (T). Los principales metabolitos de (A) fueron: (T) y 6  $\beta$ -OHA. Cuando se utilizó (T) como sustrato, se obtuvo principalmente (A). La formación de los productos, fue inhibida por la presencia de CO indicando que el P-450 participa en la oxidación de estos sustratos. Estudios comparativos de riñón e hígado, sugieren que las isoenzimas de citocromo P-450 presentes en el riñón podrían ser diferentes (en proporción y/o naturaleza) a las del hígado.

Financiado por proyecto B: 1970-8635 del DIB, Universidad de Chile y 8025 del FONDECYT.

MECANISMOS DIFERENTES EN EL PROCESAMIENTO DEL EXTREMO 5' DE LOS PRECURSORES DEL tRNA DE HISTIDINA EN *E. coli* Y *D. melanogaster*. (Different mechanisms for processing at the 5' end of tRNA His precursors in *E. coli* and *D. melanogaster*.) Orellana, D., Cooley, L., y Söll, D.

Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, U.S.A. y Depto. de Bioquímica, Fac. Medicina, U. de Chile. Los tRNA de Histidina poseen un nucleótido de guanosina extra en el extremo 5' terminal, comparados con las otras especies de tRNA. En *D. melanogaster* y *S. pombe* los genes que codifican para este tRNA no poseen la base extra codificada en su secuencia, en cambio los de *E. coli* y *B. subtilis* presentan una guanina en la posición -1 (numeración estandar de los tRNA). Estudios previos han demostrado que el nucleótido de guanina extra en el tRNA His de *D. melanogaster* es adicionado post transcripcionalmente por una actividad enzimática presente en un extracto de células en cultivo de ese organismo (Cooley et al. FNAS 79:6475(1982). La enzima ha sido purificada y presenta un peso molecular de 32000 en geles con SDS. Mediante la utilización de precursores del tRNA sintetizados *in vitro*, se ha observado la formación de un posible intermediario que sugiere que la activación del precursor del tRNA es una etapa previa en la reacción de adición. El procesamiento *in vitro* de precursores del tRNA His de *E. coli*, por un extracto de las células y por el M1 RNA (componente catalítico de la RNasa P), demostró que el nucleótido extra es codificado por el DNA en esta bacteria. La presencia del nucleótido extra en el tRNA His de *E. coli* se debe a un procesamiento anormal por la RNasa P. Financiado por NIH y U. de Chile.

EFFECTO DESACOPLANTE DE IONOMICINA SOBRE MEMBRANAS TILACOIDES DE ESPINACA (Uncoupling effect of spinach thylakoids by Ionomycin). Orellano, E.G., Wegner, R. y Andreo, C.S. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, Fund. M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario). Suipacha 531, 2000 Rosario. ARGENTINA.

La ionomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces conglobatus* ATCC 31005. La mayoría de los antibióticos de este tipo son altamente específicos para cationes monovalentes, mientras que ionomicina lo es para cationes divalentes, especialmente  $Ca^{2+}$ . En este trabajo se informan los efectos que este antibiótico posee sobre reacciones dependientes de luz de las membranas tilacoides.

Ionomicina en una concentración 3  $\mu$ M desacopló el transporte fotosintético de electrones entre agua y metilviológeno, siendo más efectiva su acción en presencia de cationes divalentes tales como  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ . El gradiente protónico que se establece al iluminar una suspensión de membranas tilacoides fue colapsado por la adición de ionomicina. El efecto del antibiótico fue drásticamente incrementado cuando se agregó  $Ca^{2+}$  al medio de reacción. La dependencia por cationes divalentes fue claramente manifiesta a bajas concentraciones del ionóforo, ocasionando  $Ca^{2+}$  un estímulo preferencial comparado con  $Mg^{2+}$ . La fotofosforilación fotosintética fue completamente inhibida por 8  $\mu$ M ionomicina. El  $I_{50}$  (concentración de ionomicina que produce el 50 % de inhibición) fue de 2-3  $\mu$ M tanto para la fotofosforilación cíclica como para la no cíclica. Con estos resultados podemos concluir que ionomicina actúa desacoplando la síntesis de ATP del transporte de electrones presumiblemente al colapsar el gradiente protónico, catalizando un intercambio de protones por cationes divalentes.

POLIMORFISMO GENETICO EN *Pleurodema thaul* (ANURA: LEPTODACTYLIDAE). (Genetic polymorphism in *Pleurodema thaul* (Anura: Leptodactylidae)). Ortiz, J.C., Troncoso, L. y Galleguillos, R. Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción y Departamento de Biología y Tecnología del Mar, Pontificia Universidad Católica de Chile, Sede Talcahuano.

*Pleurodema thaul* es considerada una especie de amplio rango de distribución que se extiende desde Copiapó (27°22'S-70°20'W) hasta Aisén (45°24'S-72°42'W) en territorio chileno, y en la región de Nahuel Huapi en Argentina.

Observaciones cariológicas y de comportamiento reproductivo como amplexus y canto han sugerido que bajo el nombre de *P. thaul* están consideradas varias entidades taxonómicas diferentes.

El presente trabajo se realiza sobre cinco poblaciones (Copiapó, Pajonales, Valparaíso, Concepción y Osorno) en base a datos obtenidos por electroforesis horizontal en gel de almidón, en las cuales se analizan 18 loci enzimáticos. De éstos, siete resultaron polimórficos. El mayor porcentaje de polimorfismo se encuentra en la población de Valparaíso y el menor en la población de Copiapó.

De los datos obtenidos, la población de Osorno se caracteriza especialmente por la presencia del locu Est 2, el cual no se observa en las otras poblaciones. Finalmente se discute el estatus taxonómico de las poblaciones estudiadas y sus relaciones con taxas descritas.

Financiamiento: Proyecto 20.38.04 Universidad de Concepción.

SINTESIS DE VARIANTES DE HISTONAS DURANTE EL PRIMER CICLO DE SEGMENTACION DEL ERIZO DE MAR. (Synthesis of histone variants during the first cell cycle of sea urchin embryos). Ovarce, A.M., Merino, V., Massone, R. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile.

Los estados tempranos del desarrollo embrionario de erizo de mar se caracterizan por ciclos celulares cortos y una rápida duplicación de DNA que prevalece hasta el estado de mórula, lo que implica la necesidad de una disponibilidad de proteínas cromosómicas tipo CS para ser ensambladas al DNA neosintetizado.

Con el objeto de estudiar la síntesis y ensamblaje a cromatina de las variantes histónicas tipo CS durante el primer ciclo de segmentación de embriones de *Tetrapygus niger*, se analizó la incorporación de  $^3\text{H}$ -L aminoácidos a proteínas ácidos solubles, tanto nucleares como citoplasmáticas mediante método fluorográfico.

Nuestros resultados obtenidos en embriones de *Tetrapygus niger* demuestran que durante la fase pre-replicativa se sintetizan fundamentalmente dos proteínas básicas, las cuales no se ensamblan a la cromatina durante este período. En la fase replicativa se observa que existe una proteína tipo HMG y proteínas de las variantes CS que son sintetizadas y ensambladas a la cromatina de cigoto en esta fase.

Estos resultados sugieren una relación temporal entre la síntesis y ensamblaje de variantes histónicas tipo CS con la fase S del ciclo celular en *Tetrapygus niger* al igual que en otros sistemas biológicos.

Proyectos: 20.31.06 DI Universidad de Concepción  
1082/85 FONDECYT

BIOSINTESIS Y EXPRESION DE GANGLIOSIDOS COMPLEJOS DURANTE LA DIFERENCIACION IN VITRO DE CELULAS DE RETINA DE EMBRION DE POLLO. (Biosynthesis and expression of complex gangliosides during differentiation of chick embryo retina cells in vitro).

Panzetta, P., Gravotta, D. y Maccioni, H.J.F. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC-UNC-CONICET). Dpto. Química Biológica, Fac. de C. Químicas.C.C:61;5016-Córdoba, Argentina.

Se cultivaron células disociadas de retina de embrión de pollo de 7 días de edad en cubreobjetos cubiertos con polilisina. Al momento de la siembra las células son redondas y pequeñas, diferenciándose a medida que progresa el cultivo. La mayoría de las células incrementaron su diámetro y emitieron procesos. Se observaron escasas células aplanadas (probablemente células gliales de Müller). El contenido de proteína y de DNA se mantuvo esencialmente constante hasta 7 días "in vitro" (7 DIV). La incorporación de radiactividad en gangliosidos a partir de  $^3\text{H}$ -glucosamina a 7 DIV fue un 65% respecto al valor inicial (1 DIV). La incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina, en DNA, como medida de la actividad proliferativa, disminuyó a un 10% a partir de 3 DIV. Al mismo tiempo cronológico que "in ovo" la síntesis de GD3 disminuyó de un 70% a 1 DIV a un 7% a 7 DIV, mientras que la síntesis de GD1a incrementó de un 6% a 1 DIV a un 70% a 7 DIV. Estudios inmunocitoquímicos evidenciaron la presencia de gangliosidos complejos en el cuerpo celular y en los procesos de las células neuronales. Con esta metodología se observó que los gangliosidos complejos estarían ausentes (o al límite de su detección) en las células gliales.

Se concluye que el cambio en la modalidad de síntesis de gangliosidos, de simples (GD3) a complejos (GD1a) ocurre en neuronas y es contemporáneo con la diferenciación morfológica de las mismas.

CARACTERIZACION DE CASEINAS QUINASAS EN *Mucor rouxii* (Characterization of casein kinases in *Mucor rouxii*).

Pardo, P., Passeron, S., Moreno, S. Departamento de Química Biológica, Programa de Regulación Hormonal y Metabólica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las caseínas quinasas son proteínas ubicuas que se caracterizan por su insensibilidad a cualquiera de los efectores conocidos para otras proteínas quinasas, como cAMP, cGMP y  $\text{Ca}^{++}$  y por preferir caseína y fosvitina como sustratos artificiales. El objeto de este trabajo es la caracterización de estas enzimas en el hongo *M. rouxii*. Hemos encontrado dos caseínas quinasas separables por DEAE-Sepharosa a las que llamamos CK I y CK II según su orden de elución. En fosfoceulosa la CK I eluye a 0,4 M NaCl mientras que la CK II sólo se retiene parcialmente a baja fuerza iónica mientras que a alta queda fuertemente retenida en la resina y eluye entre 0,6-0,7 M NaCl. Los coeficientes de sedimentación determinados en gradientes de sacarosa resultaron ser 3,5 S para la CK I y 7,4 S para la CK II, de los cuales se deducen pesos moleculares de 40 K y 127 K respectivamente. Ambas enzimas utilizan ATP como dador de fosfato con  $K_m$  ap. de 40  $\mu\text{M}$  para la CK I y 10  $\mu\text{M}$  para la CK II y son totalmente dependientes de  $\text{Mg}^{++}$ ; alcanzan el máximo de velocidad con 2,5 mg/ml de caseína. Se encontró que ambas enzimas prefieren como sustratos proteínas ácidas como caseína y fosvitina. La CK I es fuertemente inhibida por KCl, mientras que la CK II es levemente estimulada por KCl, con un óptimo entre 200-250 mM. La CK II resulta inhibida por heparina con una  $I_{50}$  de 35 nM y presenta una importante estimulación por espermidina y espermina. La CK I, en cambio, es inhibida por poliaminas. De acuerdo a su comportamiento en DEAE-Sepharosa y fosfoceulosa, a sus pesos moleculares y a su sensibilidad a la heparina y poliaminas podemos homologar la CK I con las caseínas quinasas de tipo 1 y la CK II con las caseínas quinasas de tipo 2 encontradas en otros organismos.

EFFECTO DEL SODIO EXTRACELULAR EN LA PRODUCCION DE ALDOSTERONA. POSIBLE ROL DEL INTERCAMBIADOR Na/Ca. (Effect of Extracellular Sodium on aldosterone production.  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$  exchange as a mediator). Parra, C. y Marusic, E.T. Depto. Fisiol. y Biofis., Fac. Medicina, U. de Chile.

La secreción de Aldosterona por células de la zona glomerulosa de la glándula adrenal es regulada por diferentes estímulos como el ión potasio, angiotensina II y ACTH. Existen evidencias en la literatura que señalan que estos estímulos inducen un aumento del calcio citosólico. Este aumento del calcio citosólico se debe a la liberación de calcio desde compartimentos intracelulares como a influjos desde el exterior. En la remoción del calcio citosólico podrían participar Ca-ATPasa y/o intercambiador Na/Ca, entidades aun no identificadas en las células de glomerulosa. Con el fin de estudiar la existencia de un intercambiador Na/Ca en la membrana plasmática de estas células, se analizó el efecto de Na en la esteroidogénesis. Los experimentos se realizaron en un sistema de perfusión de células de glomerulosa de adrenal de bovino. Variando la concentración de Na externo y reemplazándolo isoosmóticamente por cloruro de colina. Se encontró un aumento significativo de la esteroidogénesis, de 3 a 5 veces los valores basales al bajar el Na 140 mM a 24 mM en el perfusado. Este estímulo fue dependiente de la presencia de Ca extracelular. Al medir el flujo fraccional de células previamente cargadas con  $\text{Ca}^{45}$  se encontró una disminución del 20% del flujo concomitante con la baja en el Na externo que se correlaciona temporalmente con un aumento de la Aldosterogénesis. Sugiriendo la posible participación del intercambiador Na/Ca en el fenómeno descrito.

IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA SINAPTOSOMAL QUE INMUNOREACCIONA CON SUEROS ANTI-PROTEINA BASICA DE MIELINA. (Identification of a synaptosomal protein immunoreacting with anti-myelin basic protein antisera).

Pedraza, L.F., Roth, G.A. y Cumar, F.A. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

La encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) es una enfermedad autoinmune demielinizante con síntomas de parálisis que puede ser inducida por inyección de mielina de SNC en adyuvante de Freund completo. La proteína básica de mielina (PBM) es el principal antígeno responsable de la aparición de los síntomas clínicos. Algunos roedores tienen 2 ó más PBM de PM entre 14 y 21.5 K. Además, en cerebro de ratón se han descrito varios polipéptidos de PM entre 25 y 100 K que son capaces de reaccionar inmunológicamente con anticuerpos anti-PBM. A la fecha ninguna de estas últimas proteínas ha sido identificada. En este contexto, usando una técnica de inmunodetección de proteínas de fracciones subcelulares purificadas, transferidas a láminas de nitrocelulosa después de separación electroforética, observamos que esas proteínas de alto PM se encontraban concentradas en la fracción sinaptosomal con respecto a la fracción de mielina. Las principales proteínas relacionadas inmunológicamente con PBM corren en geles como un doblete de PM aparente de 80-86 K y fueron tentativamente identificadas como sinapsina Ia y Ib, proteínas de naturaleza básica específicas de vesículas sinápticas. Una preparación de sinapsina purificada también inmunoreaccionó con sueros anti-PBM. Además, un suero anti-sinapsina fue capaz de reconocer las PBM. Teniendo en cuenta que PBM es el principal antígeno encefalitogénico se concluye que agentes inmunológicos producidos en el animal sensibilizado con PBM son capaces de reconocer proteínas extramielínicas, lo cuál podría tener implicancia en el proceso de EAE.

ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DE *Diplodon chilensis chilensis* (MOLLUSCA: BIVALVIA). (Ultrastructure of the spermatozoon in *D. ch. chilensis*). Peredo, S., Garrido, O. y Parada, E. Departamento de Biología, P. Universidad Católica de Chile-Temuco e Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile.

Con el objeto de establecer la existencia de alguna relación entre las características de la reproducción de *D. ch. chilensis* y la morfología del espermatozoide de esta especie, se fijaron pequeños trozos de gónada de machos y espermatozoides obtenidos por punción en TAM para MET y MEB respectivamente.

Se pudo establecer que el espermatozoide está formado por una cabeza ligeramente alargada de 8 um de longitud y 2 um de diámetro, pieza intermedia formada por un anillo de 5 mitocondrias y un flagelo simple de 28 um de longitud y 0.3 um de diámetro.

A nivel de la cabeza se encuentra un núcleo granular en cuya base existe una fosa de implantación donde se articula la pieza conectante. No existe acrosoma. En región central de la pieza intermedia se observa una estructura fibrosa densa que conecta el núcleo con el flagelo. Además existen algunos gránulos de aspecto de glicógeno distribuidos tanto en la cabeza como en la pieza intermedia.

*Diplodon chilensis chilensis* tiene un espermatozoide del tipo primitivo según la clasificación de Franzén (1969), aún cuando la fertilización se realiza en el interior de la hembra.

Financiado por Proyecto 2-86-2 CIPUCT.

CAMBIO EN LA CONCENTRACION DE n-butyl- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato ( $\beta$ CCB) EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A UN STRESS AGUDO. (Concentration changes of n-butyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ CCB) in the cerebral cortex of rats submitted to an acute stress). Peña C.\*, Medina, J.M.\*\*., Novas, M.L.\*\*., De Robertis, E.\*\* and Paladini, A.C.\*.

\*Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica.

\*\* Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires, Argentina.

$\beta$ CCB es un inhibidor competitivo de la unión de benzodiazepinas a receptores presentes en el sistema nervioso central. Fue aislado recientemente de corteza cerebral bovina y su purificación incluyó etapas de filtración por tamices moleculares de Sephadex G-25, distribución en contracorriente y varias cromatografías en columnas de alta eficiencia con fases reversas de  $C_{18}$  y  $C_4$ .

En el estudio de la naturaleza química de este ligando endógeno se identificó por espectrometría de masa al butil ester del ácido  $\beta$ -carbolina-3-carboxílico. Esta identificación fue confirmada por espectroscopía UV, y HPLC en comparación con el compuesto sintético.

Ratas sometidas a un stress agudo presentaron un gran aumento de los niveles cerebrales normales de  $\beta$ CCB y esta variación fue bloqueada por una inyección previa de diazepam. Por el contrario, en el cerebelo no se detectaron cambios en situaciones de stress agudo.

La correlación de estos resultados con otros previos en los que la unión de benzodiazepina marcada disminuyó en cerebelo, pero no en cerebelo, en casos de stress agudo, permite postular una posible relación entre el ligando endógeno aislado y los estados de ansiedad.

INACTIVACION DE LA PAPAÍNA POR 1,4-BENZOXAZINONAS. (Inactivation of papain by 1,4-benzoxazinones). Pérez, F.J. y Niemeyer, H.M. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIMBOA), el principal ácido hidroxámico de extractos de maíz y trigo, es tóxico hacia una amplia gama de organismos. Esta toxicidad ha sido atribuida a la inhibición de sistemas enzimáticos relacionados con el metabolismo energético, mediada por su reacción con grupos sulfhidrilo de las enzimas. En este trabajo se describe la reacción del DIMBOA con la papaína, una tiol-proteasa que posee un único grupo SH en la molécula, ubicado en el sitio activo.

El DIMBOA inactivó la papaína por reacción con el grupo SH de ésta. Estudios cinéticos indicaron la formación de un complejo reversible entre el DIMBOA y la papaína que posteriormente genera la enzima inactiva. Estudios de pH indicaron la participación de dos grupos disociables en la enzima con pKa de 4,5 y 8,4.

En estudios con sustratos de la enzima, el éster etílico de la benzoiloxiglicina (BGEE) protegió a la enzima contra la inactivación por el DIMBOA, mientras que el éster etílico de la benzoiloxarginina (BAEE) no tuvo efecto. El análisis de los productos de la reacción por cromatografía líquida de alta presión sugirió que el DIMBOA se une covalentemente a la enzima. Un análogo del DIMBOA, la 4-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona, no reaccionó con la papaína. Se propone un mecanismo consistente con estos datos.

Este trabajo fué financiado por la AID, FONDECYT y la Universidad de Chile.

ESTUDIO INMUNOLOGICO DE MEMBRANAS DE SUPERFICIE Y TUBULOS TRANSVERSOS AISLADOS DE MUSCULO ESQUELETICO DE RANA (Immunological studies on surface membranes and transverse tubules isolated from frog skeletal muscle). Pérez G. y Roseblatt M. Unidad de Inmunología Celular. INTA. Universidad de Chile.

Los componentes moleculares involucrados en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción de músculo estriado, se ubican preferencialmente en túbulos transversos (t-T), retículo sarcoplásmico (RS) y membrana de superficie (MS). Estos componentes parecen constituir sistemas de membranas funcional y estructuralmente distintos.

Con el fin de comprobar lo anterior, en este trabajo se determina el origen y pureza de estas preparaciones de membrana, usando un enfoque inmunológico. Para esto se prepararon anticuerpos convencionales y monoclonales contra membranas de músculo estriado de rana (CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA), preparadas por métodos bioquímicos convencionales. El antisuero obtenido de conejos inmunizados con una preparación de t-T (0.8 mg t-T en igual volumen con adyuvante completo de Freund, inyección intradérmica) presenta una reactividad, comparando las preparaciones de membranas mediante ELISA, de cuatro veces mayor con la preparación de túbulo-T que con la de RS, y solo dos veces mayor que la preparación de MS. Se han aislado también híbridos productores de tres clases de anticuerpos monoclonales específicos, que presentan reactividad inmunológica para cada tipo de membrana.

Estos resultados, indican que la preparación de t-T es claramente diferenciable inmunológicamente de la preparación de RS. En el caso de la MS, todo parece indicar que existe una alta contaminación con t-T.

Estos resultados apoyan los obtenidos por medición de parámetros bioquímicos tales como ligamiento de nitrodipina y contenido de colesterol.

Financiamiento: DIB. Proy. N° B 2397-8612.

CARACTERIZACION DE LOS COMPONENTES DE LA RESPUESTA EVOCADA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA POR ESTIMULACION DEL LOCUS COERULEUS. (Characterization of the components of prefrontal cortex responses evoked in the rat by stimulation of the locus coeruleus). Pérez, H., Ruiz, S., Hernández, A. y Soto-Moyano, R. Unidad de Neurofisiología y Biofísica, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile.

Se sabe que el sistema neuronal noradrenérgico que toma su asiento en el locus coeruleus (LC) envía impulsos directamente a la corteza cerebral y que la estimulación eléctrica de este sistema de proyección cortical modula la actividad neuronal de la neocorteza.

Se intenta individualizar y caracterizar los diferentes componentes de la respuesta evocada en la corteza prefrontal (CPF) de la rata por estimulación eléctrica del LC. Se empleó técnicas de estimulación simple repetitiva y de trenes de pulsos. Se utilizaron ratas de 45 días de edad. La estimulación simple repetitiva (pulsos de 0.3 msec y de 1.15 mA) se llevó a cabo aumentando la frecuencia de estimulación de modo tal de reducir a la mitad la amplitud de los componentes de la respuesta. La estimulación eléctrica por trenes de pulsos consistió en 1 a 6 pulsos de 0.3 msec de duración cada uno y de intensidad suficiente para evocar respuestas umbrales. Para comprobar la naturaleza noradrenérgica de los distintos componentes de esta respuesta se microinyectó propanolol (2 µg/µl) en CPF. Los resultados muestran que: a) la respuesta evocada en CPF por estimulación del LC consta de dos componentes, temprano y tardío, b) ambos componentes son inhibidos por propanolol microinyectado, c) frente a la estimulación simple repetitiva, el componente temprano es menos fatigable que el componente tardío, d) frente a la estimulación por trenes de pulsos el componente temprano mostró capacidad de suma temporal. Los resultados sugieren que las respuestas evocadas en CPF por estimulación del LC poseen un componente temprano de características monosinápticas.

Financia FONDECYT, Proyecto 1059/1985.

REGULACION DE LA ERITROPOYESIS: TRES METODOLOGIAS EXPERIMENTALES PARA UN MISMO OBJETIVO. (Hormonal Regulation of Erythropoiesis: Three Experimental Methodologies for a same objective). M. Perretta, G. Carrasco y M. Tijmes. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

La eritropoyesis está regulada por su microambiente celular, por factores proteicos y por hormonas. Entre éstas la eritropoyetina (Epo) es la principal, junto con la testosterona (Ta). La hipótesis de trabajo es que la acción conjunta de ambas hormonas induce y aumenta la síntesis de RNAs que participan en la síntesis de globinas. Para demostrarla se utilizaron tres estrategias experimentales: síntesis de RNA IN VITRO, síntesis de RNA IN VIVO y síntesis de un pre RNAm (RNAhn) y estimula la síntesis de pre RNAr. La Ta participa tanto en el procesamiento del pre RNAm como del pre RNAr en las etapas de RNAr 22 s a 18 s y pre RNAm 13 s a 9 s. El RNAhn una vez inducido por la Epo se une a proteínas específicas formando una RNP, en la que cada proteína cumple un rol en el procesamiento de este RNAhn. Esto significa que el RNAhn inducido por la Epo es procesado hasta su forma funcional bajo la forma de RNP por otras RNP cuyos RNA son estimulados por la Ta. Se demuestra que al utilizar tres estrategias operacionales se obtienen resultados similares lo que permite proponer un mecanismo de acción de ambas hormonas, lo que a su vez apoya el concepto general que la eritropoyesis es un proceso hormona-dependiente. Se postula que la regulación del procesamiento de pre RNAm se realiza en forma de partículas macromoleculares (RNP) siguiendo una trayectoria vectorial dentro de la célula. Se presentan los modelos moleculares que explican esta idea.

(Financiado por DIB, U. de Chile. Proyecto B-2017-8633).

EFEECTO ESTIMULADOR DE LA GLUCOSA SOBRE LA INCORPORACION DE 1-<sup>14</sup>C LEUCINA A PROTEINAS EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS. (Glucose stimulatory action on 1-<sup>14</sup>C leucina incorporation into proteins by rat cerebral cortex). Perry, V. L.T., Perry, M.L.S., Pereira, I.R.G. y Bernard, E.A.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

En un trabajo anterior demostramos que la glucosa 10mM estimula la incorporación de [(U)-<sup>14</sup>C] leucina a proteínas del SNC, este efecto no fue observado cuando se utilizó lactato o piruvato. En el presente trabajo investigamos más ampliamente este efecto, utilizando varias concentraciones de glucosa, de intermediarios glicolíticos y del ciclo de Krebs. También estudiamos el efecto del agregado de glutamina y de cuerpos cetónicos al medio de incubación. Como precursor de síntesis proteica se utilizó [1-<sup>14</sup>C] leucina la que no es transformada a ningún otro aminoácido radioactivo.

Slices de corteza cerebral de ratas de 10 días de edad se incubaron 1 hora a 35°C en KRB, conteniendo separadamente los diferentes nutrientes que fueron ensayados. Para medir síntesis proteica se utilizó 0,25 µCi de [1-<sup>14</sup>C] leucina, la reacción se detuvo por agregado de TCA y se midió la radioactividad presente en proteínas. La glucosa mostró un acentuado efecto estimulador sobre la síntesis proteica a una concentración de 0,625mM y alcanzó el máximo de estimulación con 2,5mM. De todos los demás nutrientes ensayados solamente el lactato 15mM y cuerpos cetónicos mostraron algún efecto estimulador pero de una magnitud muy inferior a la demostrada por la glucosa. La glucosa también mostró un efecto estimulador sobre la entrada de leucina al tejido, pero esta estimulación fue mucho menor que la producida sobre la síntesis proteica.

Auxilio Financeiro: CNPq, FINEP, PROPESP/UFGRS.

ESTEROIDOGENESIS Y SINTESIS PROTEICA EN OVARIO DE ANFIBIOS (protein synthesis and steroidogenesis in amphibian ovarian follicles). Petrino, T. y Schuetz, A.W., Dto. Biol. del Desarrollo. INSIBIO-CONICET-UNT. Tucumán, Argentina

Experimentos previos mostraron que la estimulación pituitaria de la producción de progesterona (P) y la acción de la misma en los folículos ováricos de anfibios, son dependientes de la síntesis proteica tanto en las células foliculares como en el ovocito. En este estudio se investigó la conversión de pregnenolona a P en el ovario de Rana, y si esta etapa específica de la ruta sintética de progesterona requiere de la mencionada síntesis proteica. Folículos en distintos estadios de la ovogénesis fueron cultivados con pregnenolona exógena y el contenido de P del medio y de los extractos foliculares fueron determinados por RIA. La concentración folicular de P acumulada después de 4 hrs. de cultivo, incrementó proporcionalmente con el tamaño del folículo. Los niveles intrafoliculares de P fueron consistentemente más altos que los niveles detectados en el medio. Cuando folículos totalmente crecidos fueron cultivados en la presencia de pregnenolona o pituitaria y/o cicloheximida, el inhibidor de la síntesis proteica bloqueó completamente la acumulación de P inducida por pituitaria, pero no la conversión de pregnenolona a P. Por el contrario, la cianocetona (CK), un inhibidor irreversible de la 3 $\beta$ -esteroido deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), bloqueó la acumulación de P inducida por pituitaria o pregnenolona. La adición de pituitaria a folículos pretratados con CK no restauró la capacidad de los folículos para convertir pregnenolona a P. Estos resultados sugieren que la conversión de pregnenolona a P ocurre eficientemente aún en ausencia de pituitaria durante el crecimiento del folículo (ovogénesis) y que la actividad de la 3 $\beta$ -HSD es independiente de la síntesis de proteínas en folículos totalmente crecidos. El requerimiento proteico, durante la inducción pituitaria, para el incremento rápido de P, parece ser anterior a la conversión de pregnenolona a P y no involucra la síntesis de novo de 3 $\beta$ -HSD.

CARACTERISTICAS ENZIMATICAS Y GENETICAS DE RIBULOSA BISFOSFATO CARBOXILASA DE Thiobacillus ferrooxidans. Olga Phillips, Luisa Herrera y Loreto Holuigue. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La utilización de bacterias en el proceso de lixiviación de minerales, presenta ventajas económicas para la extracción de cobre y otros metales desde minerales de baja ley. Dentro de los microorganismos lixiviantes, el más importante es el Thiobacillus ferrooxidans. Esta bacteria es un autótrofo estricto que obtiene el carbono celular por fijación de CO<sub>2</sub>. Este proceso resulta interesante de estudiar, puesto que es limitante para el crecimiento celular. En este sentido, hemos abordado el estudio de las características enzimáticas y genéticas de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (Rubisco), enzima que cataliza la primera reacción del ciclo de Calvin. Esta enzima ha sido purificada tanto de la fracción soluble como de carboxisomas de T. ferrooxidans. Su peso molecular nativo es de 500 kD y posee 2 tipos de subunidades de pesos moleculares 54 kD (A) y 14,5 kD (B). Estas evidencias, junto con el efecto inhibitorio de 6-fosfogluconato, indican que la enzima posee una estructura hexadecamérica (A<sub>6</sub>B<sub>6</sub>). Se han determinado algunas características catalíticas de esta enzima. A partir de una genoteca de DNA cromosomal de T. ferrooxidans, contruida en pBR322, hemos purificado 3 clones que probablemente contienen secuencias del gen de Rubisco, por hibridización con un oligodeoxinucleótido de 21 bases, que corresponde a una secuencia de la proteína altamente conservada. Los plasmidios recombinantes aislados de estos clones poseen insertos de 3,5; 1,4 y 0,7 kb, e hibridizan con el oligonucleótido en análisis tipo "dot blot". La presencia de los genes de Rubisco en estos clones está siendo corroborada mediante el uso de una segunda sonda que contiene el gen de Rubisco de Chromatium vinosum. (Patrocinado por proyecto PNUD/ONUDI CHI/85/002, DIB, Universidad de Chile y FONDECYT.)

ESTUDIO DE CEPAS AUTOCTONAS DE Thiobacillus ferrooxidans. (Studies on native strains of Thiobacillus ferrooxidans). Pichuantes, S. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se sabe que ciertos microorganismos están involucrados en la lixiviación de minerales sulfurados, tales como calcopirita y pirita, propiedad que promete ser de gran utilidad en procesos bioextractivos. Una de las especies más estudiadas en este sentido, la constituye el germen quimiolitotrófico Thiobacillus ferrooxidans, que se caracteriza por desarrollarse en medios ácidos y por ser capaz de fijar CO<sub>2</sub>, utilizando como fuente de energía, la oxidación de ion ferroso o de compuestos de azufre reducido.

Con el objeto de seleccionar cepas con alta capacidad lixivante sobre minerales chilenos y que sean potencialmente susceptibles a manipulación génica, hemos efectuado una caracterización fisiológica, genética y ultraestructural de cinco cepas nativas de T. ferrooxidans, provenientes de minerales del norte chico y centro del país.

En este trabajo se ha investigado: a) la cinética de crecimiento bacteriano en medios de cultivo sintéticos, b) la capacidad lixivante de algunas de las cepas en experimentos de laboratorio bajo condiciones bien definidas, c) la susceptibilidad a diversos antibióticos y d) un estudio ultraestructural comparativo utilizando técnicas de tinción negativa y cortes ultrafinos.

Finalmente, se presentan los resultados de los experimentos de transferencia de material génico, mediante transformación y conjugación, efectuadas en estos microorganismos.

Financiado parcialmente por DIUC 89/85.

TRANSFERENCIA DE ENERGIA EN RELACION CON LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA PEP CARBOXILASA DE MAIZ. (Energy transfer in relation to the quaternary structure of maize PEP carboxylase). Podestá, F.E., Wagner, R., González, D.H. y Andreo, C.S. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

Se llevó a cabo un estudio de transferencia de energía de resonancia en la fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilasa de hojas de maíz. Se utilizaron para ello dos reactivos fluorescentes: cloruro de dansilo (DNS-Cl) e isotiocianato de eosina (ENCS). Ambos compuestos produjeron la inactivación total de la enzima cuando la incorporación fue de 4 moles de modificador por mol de carboxilasa. PEP y MgCl<sub>2</sub> protegieron contra la inactivación por cualquiera de los dos compuestos.

Para los estudios de transferencia de energía se utilizaron muestras marcadas con 1 mol de DNS-Cl (dador) y 1-3 moles de ENCS (aceptor) por mol de enzima. En la PEP carboxilasa así marcada se observó una disminución en la intensidad de la emisión del dador y un aumento en la intensidad de la fluorescencia del aceptador. Esto se incrementó con el aumento del número de aceptores.

El cálculo de las distancias entre el dador y los aceptores reveló que dos de estos se encuentran a 50 Å del dador, mientras que un tercero dista 64 Å. La disociación de la enzima en condiciones de elevada fuerza iónica redujo drásticamente la eficiencia de la transferencia de energía, indicando que los sitios modificados se encuentran en distintas subunidades.

EFEECTO DE MERCURIO SOBRE FECUNDACION, DESARROLLO EMBRIONARIO Y UN SISTEMA PROTEOLITICO EN EQUINODERMOS. (Effect of mercury on fertilization, embryonic development and a proteolytic system in equinoderms). Ponce, O., Enriquez, S. y Magaña, A. Depto. Biología Molecular. Fac. Cs. Biol. y de Rec. Nat. Universidad de Concepción. Chile. (Patrocinio: V. Silva).

Estudios realizados en nuestras costas de la VIII Región revelan altos niveles de contaminantes entre los que se destacan metales pesados como mercurio, cadmio, plomo y otros.

El objetivo de esta comunicación es presentar los efectos del mercurio sobre el proceso de fecundación y desarrollo embrionario utilizando el erizo negro *T. niger* y su acción a nivel molecular sobre enzimas proteolíticas acídicas tipo catepsinas D.

Se demuestra que huevos no fecundados de erizo negro pretratados con una solución 25  $\mu$ M de mercurio y lavados posteriormente, incorporan metal lográndose saturabilidad con 4  $\mu$ M a los 60 minutos y que la actividad proteolítica medida en el homogenizado obtenido de estos huevos se reduce en un 50% aproximadamente en relación al control. Al pretratar los huevos con mercurio 25  $\mu$ M durante 60 minutos, lavarlos y fecundarlos posteriormente, no se observa desarrollo embrionario, sino solamente membrana de fecundación. Al colocar los espermatozoides en una solución con mercurio 1.5  $\mu$ M se observa detención de su movilidad a los 2 minutos.

De estos resultados se concluye que el mercurio, afecta el desarrollo embrionario, la movilidad de los espermatozoides y un sistema enzimático que se ha descrito como importante en el proceso de división celular.

Financiado por proyecto 203108, U. de C.

DESARROLLO DE UN METODO PARA ESTUDIAR LA HISTOPATOLOGIA Y LA ULTRAESTRUCTURA DEL OIDO HUMANO. (Development of a method to study the histopathology and the ultrastructure of the human ear). Posada, J. y Otte, J. Depto. Ciencias Básicas y Depto. de Cirugía, Traumatología y Anestesia, Fac. de Medicina, Div. Sur. U. de Chile (Patrocinio: J. Pereda)

El estudio histopatológico del oído humano requiere una técnica que demora varios meses y que, por razones diversas, no era realizada en el país. Por otra parte, por la dificultad de obtener material fresco y adecuado, la ultraestructura del oído humano normal no es bien conocida y las alteraciones ultraestructurales en la patología cócleo-vestibular son aún menos conocidas.

De 11 pacientes que fallecieron y que tenían documentación clínica concerniente a este estudio, se obtuvieron 22 huesos temporales. El oído más afectado se procesó para su estudio al microscopio óptico. Del oído sano, o menos afectado, se obtuvieron muestras que se procesaron para microscopía electrónica. En 4 de estos huesos se terminó su procesamiento, lo que permitió iniciar el estudio en ambos niveles.

Los resultados de ambas técnicas fueron concordantes y demuestran que este método puede ser aplicado exitosamente en el estudio del oído humano. Se obtuvo información de la ultraestructura del oído y de algunas alteraciones post-mortem. En los casos clínicos se encontró una relación entre la audición y el órgano de Corti, no así con el número de células ganglionares (que fue menor); una explicación anatómica (cúpololitiasis del canal posterior) de las crisis vertiginosas posturales post-TEC y una variación anatómica rara del conducto auditivo interno.

Los resultados obtenidos son más confiables mientras menor sea el lapso entre los exámenes clínicos y la obtención del hueso temporal. En algunas estructuras puede perderse el patrón de comparación al destinarse los oídos a 2 técnicas diferentes.

PROYECTO DIB M2156-8625.

BIOACTIVIDAD DE PROLACTINA HIPOFISIARIA DE RATA: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON UREA 2,5M pH:10,0. (Rat pituitary prolactin bioactivity: effect of 2,5M urea pH:10,0). Prada, M.I., Torres, A.I. y Aoki, A. Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La heterogeneidad molecular y compartimentalización subcelular de prolactina hipofisaria (PRLh) de rata han sido demostradas anteriormente en nuestro laboratorio. La forma monomérica, de bajo peso molecular, altamente soluble en solución salina de fosfato (PBS) y biológicamente activa está asociada a las organelas proteopoyéticas. La forma polimérica, de mayor peso molecular, insoluble en PBS y de menor actividad biológica se encuentra almacenada en los gránulos secretorios de las células lactotropas. El empleo de urea 2,5M pH:10,0 ha demostrado ser un método efectivo para convertir la hormona poliséptica en monomérica, lo cual se traduce en un aumento de la actividad inmunológica detectada. Este trabajo fue realizado para determinar el efecto de urea 2,5M pH:10,0 sobre la bioactividad de PRLh. Hipófisis anteriores provenientes de ratas hebras previamente estrogenizadas fueron homogeneizadas en PBS pH:7,0. El homogenato obtenido fue dividido en dos fracciones: 1) homogenato total centrifugado a 10.000 x g. y 2) homogenato total + urea 2,5M pH:10,0. Estas muestras fueron incubadas a 4°C durante 3 h. La actividad biológica fue determinada mediante un ensayo en buche de Zenaida auriculada. Los animales recibieron dosis equivalentes de tejido fresco repartiéndose la dosis total en cuatro días. Al quinto día se los decapitó y se removieron los buches, los cuales fueron procesados para su posterior observación microscópica. El recuento del número de capas celulares proliferadas en el epitelio fue el parámetro de comparación de la bioactividad resultante en cada grupo de animales. La actividad biológica de un homogenato tratado con urea 2,5M pH:10,0 es mayor en comparación a la observada en un homogenato realizado en PBS pH:7,0. Se demuestra así que el efecto disociante de la urea sobre PRLh no deteriora la actividad biológica de los homómeros resultantes.

LA RETE TESTIS DEL OCTODON degus. (The Rete testis in the Octodon degus). Prado, F. Depto. de Morfología Exp. Facultad de Medicina. U. de Chile. (Patrocinio: B. Morales). La rete testis está constituida por numerosas cavidades irregulares anastomosadas, tipo laberinto, que conecta al túbulo seminífero con los conductos eferentes. Su organización y ubicación presenta variaciones en las distintas especies de mamíferos.

Nuestro objetivo fue estudiar la Rete Testis del *Octodon degus* adulto, en períodos de reposo y actividad sexual. Se utilizaron los testículos de 20 machos, 10 en actividad y 10 en reposo sexual, los cuales fueron disecados solos o con sus epidídimos. Fueron fijados en Duboscq-Brasil, incluido en parafina y cortados en forma seriada por el eje longitudinal, transversal y sagital. Los cortes fueron teñidos con H-E, PAS y tricrómico. Se realizaron mediciones del área ocupada por la rete utilizando un Ocular milimetrado OLYMPUS.

La rete testis del *Octodon degus* presenta una porción Intratesticular, una Intratúnica y otra Extratesticular. La Intratesticular es de mayor tamaño, tiene forma de un tubo aplano en el eje antero-posterior. La porción Intratúnica está representada por túbulos irregulares que atraviesan la túnica albugínea y la Extratesticular corresponde a una cúpula solevantada de donde emergen los conductos eferentes. Durante el período de reposo gonadal se produce una disminución en las dimensiones de la rete en sus tres ejes. El túbulo seminífero se conecta con la rete a través de una Zona de Transición, que presenta un epitelio cilíndrico alto, cuyo citoplasma protuye hacia el lumen del túbulo recto. Este último tiene una longitud muy variable y está revestido por un epitelio plano o cúbico bajo.

La organización y características histológica de la rete testis son similares a las descritas para los roedores, presentando una disminución de sus diámetros proporcionales a la reducción de tamaño que experimenta el testículo al pasar del período activo al de reposo sexual.

LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS ATPasas Y OTRAS ENZIMAS RELACIONADAS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LAS CELULAS HEPATICAS DE LA RATA. (Subcellular localization of ATPases and other enzymes related to the plasma membrane of rat liver cells). PRADO FIGUEROA, M.\*, F. PECKER y A. AMAR-COSTESECO\* INIBIBB-UNS-Argentina, INSERM U99-Creteil-Francia y \*Int. Inst. of Cellular and Molecular Pathology-Bélgica.

El análisis de los microsomas de hígado de rata distingue un grupo de enzimas, llamado  $a_2$ , de las otras enzimas microsomales. La diferencia se basa en las particularidades de comportamiento en centrifugación diferencial e isopícnica. El componente subcelular portando este grupo fue identificado a la membrana plasmática (MP) y estructuras asociadas. (Amar-Costesec y cols., 1974a, J. Cell Biol. 61, 201-212).

En el presente trabajo se han diversificado las condiciones de fraccionamiento y estudiado en cada caso un gran número de enzimas con el fin de formar subcategorías e identificar la naturaleza de las membranas subyacentes. Nuestros resultados permiten de asociar indiscutiblemente al grupo  $a_2$ : la adenilato ciclasa estimulada por el fluoruro, glucagón, adrenalina, leucil  $\beta$ -naftilamidasa,  $\gamma$ -glutamyltransferasa,  $Na^+K^+$  ATPasa y  $Mg^{++}$  ATPasa. Luego de la centrifugación diferencial, todos los perfiles de distribución son bimodales y muestran su máximo de ASR en las fracciones nuclear y microsomal. La relación entre ambas fracciones varía para cada enzima. La adenilato ciclasa (adrenalina) es la más nuclear: 1.85 y la más microsomal la NAD glicohidrolasa: 0.2. Esta heterogeneidad refleja probablemente diferencias cualitativas a lo largo de la MP. Esto refleja también la heterogeneidad celular del hígado como lo demostrado para la NAD glicohidrolasa, enzima de la MP de las células de Kupffer (Amar-Costesec y cols., 1985). La centrifugación isopícnica nos permitió de asociar la  $Mg^{++}$  ATPasa,  $\gamma$ -glutamyltransferasa y la leucil  $\beta$ -naftilamidasa a la zona canalicular.

Trabajo realizado en el ICP de Bruselas.

IPP ISOMERASA Y PRENILTRANSFERASAS: PARTICIPACION EN LA RESPUESTA A INFECCION POR HONGOS. (IPP isomerase and prenyltransferases: participation in fungal infection response) Quaa, A. y Pérez, L.M. Dep. Bioq. y Biol. Mol., Fac. Cs. Quím. y Farm. Univ. de Chile.

En los mecanismos de defensa de los vegetales se forman compuestos que actúan como fitotoxinas o fitoalexinas, a través de vías metabólicas como la de los isoprenoides.

Se estudió el efecto de la infección por hongos de la fumagina en frutos y plántulas de digitos cítricos, midiendo las actividades de IPP isomerasa y de  $C_{10}$  y  $C_{15}$  preniltransferasas.

Estas actividades se modificaron dependiendo de la especie de hongo y de la variedad de cítrico: *Trichoderma* sp. produjo un aumento de la actividad de IPP isomerasa en naranjas; mientras que la misma especie no produjo modificaciones en pomelo. *Penicillium digitatum* produjo una disminución de las tres actividades en frutos. Estas se redujeron a cero en el curso de la infección. En plántulas de naranjo, solamente se redujo la actividad de IPP isomerasa.

Los resultados indican que no existe un patrón general de respuesta de las actividades enzimáticas medidas, frente a la infección por hongos de diferentes especies. Se discute la importancia de los cambios observados en los mecanismos de defensa de los cítricos.

Proyectos 5001/85 FONDECYT y B 2078-8622 DIB.

COMPARACION DE LAS CINÉTICAS DE PRODUCCION DE ATP POR TRANSPORTE FOTOSINTETICO Y OXIDATIVO Y DESCRIPCION DE ALGUNOS PARAMETROS EXOGENOS QUE LOS MODIFICAN (Comparison between the kinetics production of ATP by photosynthetic and oxidative transport and description of some exogenous modifying parameters). Fycheu, N., Messuco, S.V. y García, A.F. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Hemos mostrado previamente que la fotofosforilación catalizada por membranas de *R. rubrum* presenta una cinética no lineal. Mostramos aquí que el transporte de electrones oxidativo catalizado por membranas producidas a partir de células fototróficas resulta en una síntesis de ATP con características similares.

En ambos casos modificaciones en el transporte e inhibición de la  $H^+$  ATPasa o presencia de desacoplantes, permiten identificar dos reacciones que sintetizan ATP. Una de ellas (RI) produce acumulación neta de este nucleótido, mientras que la otra (RII) solo alterna períodos de síntesis e hidrólisis.

Las características de la RII no se afectan por una modificación de la actividad específica del ATP producido por la RI (ATP "exógeno"). Esto indica que el ATP involucrado en ambas reacciones no se encuentra en rápido equilibrio.

Financiado por CONICET y CIC.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE UN INHIBIDOR DE LA UDP-GALNAC:GM<sub>3</sub> N-ACETILGALACTOSAMINIL TRANSFERASA PRESENTE EN SUERO SANGUINEO DE POLLO. (Purification and properties of a chicken blood serum inhibitor of the UDP-GalNAC:GM<sub>3</sub> N-Acetylgalactosaminil transferase). QUIROGA, S. y CAPUTTO, R. Dpto. de Química Biológica-CIQUIBIC-Fac. de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba-CONICET.

En extractos de glándula pineal y suero sanguíneo de pollos, se ha descrito la presencia de un inhibidor de la actividad UDP-GalNAC:GM<sub>3</sub> N-Acetylgalactosaminil transferasa de retina de pollo. La actividad inhibitoria aumenta en glándula pineal y disminuye en suero sanguíneo en animales expuestos a luz con respecto a otros mantenidos en oscuridad. La inhibición mostró ser de tipo competitiva con respecto al sustrato dador (UDP-GalNAC). (Quiroga, S. y Col.-J. Neurosci Res, 12, 269-276) El inhibidor fue purificado a partir de suero sanguíneo de pollos de acuerdo a los siguientes procedimientos: calentamiento, centrifugación a 100000 x g, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, diálisis y cromatografía de filtración molecular. Se obtuvo un preparado con una actividad específica aproximadamente 50 veces mayor a la de partida. Este material, corrido en electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS presenta enriquecimiento en una banda con un peso molecular aparente de 70 Kd. En estudios con enzimas proteolíticas se encontró que pronasa y tripsina eliminaron la actividad inhibitoria, a diferencia de quimiotripsina que no la afectó. En estudios de especificidad frente a otras enzimas de la misma vía biosintética se encontró que el extracto purificado inhibió también la actividad de la UDP-Gal:GM<sub>3</sub> Galactosil transferasa de retina de pollo pero no a la CMP-NeuNac:LacCer N-Acetylneuraminil transferasa del mismo origen. Las dos reacciones que fueron inhibidas tienen la similitud de que el sustrato dador es un derivado de uridina di fosfato.

INDUCCION DE GLICOGENO FOSFORILASA MUSCULAR POR ATROPINA. (Induction of muscle glycogen phosphorylase by atropine). Ramírez, B.U. Laboratorio de Neurofisiología, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La fibra muscular rápida obtiene energía para la contracción de su glicógeno endógeno. La glicógeno fosforilasa (Ph) es la enzima que inicia el metabolismo del glicógeno. Se ha descrito que la atropina (i.v.) activa en pocos minutos la Ph de músculo esquelético, sin alterar la actividad total (a+b) de la enzima. Nosotros estudiamos el efecto de atropina aplicada por un período más prolongado sobre la Ph muscular.

Se inyectó atropina (1 mg/kg; i.v.) en gatos adultos. El músculo Tibialis anterior se extrajo 24 h después. El músculo contralateral, extraído antes de inyectar la droga, se usó como control. Se midió la actividad y la distribución subcelular de la Ph.

La actividad (a+b) se determinó midiendo la liberación de Pi a partir de G-1-P, en presencia de AMP. La masa de enzima se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

En músculo normal observamos que la actividad específica de la enzima soluble era mayor que la de la enzima microsomal. La atropina indujo un aumento significativo en la actividad total de la Ph medida en el sobrenadante post-mitocondrial. Este aumento no se debió a una solubilización de la enzima microsomal, ya que se observó también un aumento significativo en la masa de enzima, tanto en la fracción soluble como microsomal.

Concluimos que la atropina puede inducir un aumento neto de actividad en la Ph muscular mediante un incremento en la masa de enzima. Esto podría tener un efecto fisiológico sobre la producción de energía de la fibra muscular.

EFFECTO DE GnRH-(1-5) SOBRE LA UNION DE 125I-GnRH A MEMBRANAS DE ADENOHIPOFISIS. (Effect of GnRH-(1-5) on the binding of 125I-GnRH by adenohipophyseal membranes). Ramírez, S., Leiva, L. Laboratorio de Endocrinología, Depto. Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: M. De la Lastra).

En comunicaciones anteriores hemos presentado evidencias sobre la acción inhibitoria aguda del fragmento GnRH-(1-5) sobre la secreción de LH estimulada por GnRH en ratas. El efecto inhibitorio se observa con dosis de 50-100ng y carece de una relación lineal dosis - efecto, ya que no se observa con dosis mayores a las señaladas. Con el fin de estudiar el mecanismo de la acción inhibitoria del fragmento GnRH-(1-5) se realizaron experimentos con membranas semipurificadas de adenohipofisis, destinados a investigar una posible competencia del fragmento con GnRH a nivel de receptores a esta hormona. Se estudió el desplazamiento de 125I-GnRH por GnRH frío y por fragmento 1-5, tratando de cubrir el rango de concentraciones necesario para activar tanto los receptores de alta como de baja afinidad:  $k_a = 10^9 M$  y  $k_a = 10^6 M$  respectivamente. Las condiciones experimentales se establecieron según técnicas descritas por otros autores.

Resultados preliminares mostraron curvas de desplazamiento muy similares para GnRH frío y para GnRH-(1-5) cuando se utilizaron concentraciones del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-7} M$ . A concentraciones de GnRH-(1-5) de  $10^{-6}$  a  $10^{-5} M$  no se observó desplazamiento y, al contrario, parece favorecerse la unión del 125I-GnRH al receptor de membrana.

Estos resultados indican que el fragmento GnRH-(1-5) es capaz de unirse al receptor de GnRH, lo que podría explicar su acción inhibitoria sobre la secreción de LH, así como su peculiar relación dosis-efecto.

Investigación financiada por Proyecto DIUC 69/86, CONICYT 1186/85 y Rockefeller 86020.

REGULACION DE CORTISOL EN UTERO. PURIFICACION DE LA ENZIMA 11,β-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA (11-HSD) DE PLACENTA HUMANA. (Cortisol regulation in utero. Purification of 11-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta). Ravanel, M., Vergara, M., Serón-Ferré, M. Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El paso de cortisol entre madre y feto está limitado en la placenta por la inactivación de cortisol(F) a cortisona(E), catalizada por 11-HSD. Nuestro objetivo fue aislar esta enzima. Para ello investigamos su distribución subcelular en placenta humana, y su solubilización. 25-50g de placenta normal (n=5) se homogenizaron en 0.05M Tris-0.25M Sacarosa, pH 7.5 y centrifugaron a 700g x 5min, 10000g x 20min y 110000g x 60min (microsomos). La actividad específica (A.E.=ngE/20min/mg prot.) se determinó incubando cada fracción, con 500ng F, 2 mM NADP<sup>+</sup>, en 0.1M fosfato pH 7.4, a 37°C x 20min y midiendo formación de E por HPLC.

Distribución subcelular de la 11-HSD. (X ± S.E.)			
homogenizado	700g	10000g	microsomos
A.E.	86.6±10.3	19.6±7.1	146.5±34.4
			175.3±17.9
% Actividad 11-HSD soluble en detergentes.			
Fracción	X=100 (0.5%)	DF=18 (0.5%)	
10000g	34	55.5	
microsomos	12	5.6	

El extracto de la fracción 10000g, en DF-18, se centrifugó a 120000g, y el sobrenadante se sometió a cromatografía en Sephadex G-200 (1.6x75cm), eluyendo con 0.1M fosfato pH 7.4, 0.5% DF-18, 0.01% NaN<sub>3</sub>. La enzima eluyó en la fracción de PM 345 Kd y la A.E. aumentó tres veces. Estos datos muestran que la 11-HSD se localiza en la fracción subcelular de 10000g y en microsomos, que su solubilidad en detergentes difiere según la ubicación y que en la fracción 10000g su PM es de 345 Kd. Financiado por DIUC 56/84 y 73/86.

CONCENTRACION PLASMATICA DE LH EN RESPUESTA A PULSOS DE LHRH EN OVEJAS PREPUBERES PRETRATADAS CON NALOXONA SOLA O CON CLONIDINA O YOHIMBINA. (Plasma LH concentration in response to LHRH pulses in prepuberal sheep pretreated with naloxone alone or with clonidine or yohimbine). Recabarren, S.E., Conejeros, E., Mellado, V. y Miranda, G. Lab. de Fisiología Animal, Dpto. Medicina Veterinaria, U. de Concepción, Chillán.

Con el fin de estudiar la relación entre la actividad opiopeptidérgica y catecolaminérgica en los niveles plasmáticos de LH en ovejas prepúberes, se administró a ovejas inmaduras mediante un cateter implantado en la arteria carótida 3 pulsos de naloxona (NAL, 1mg/kg) a intervalos de 60 min. seguidos de 4 pulsos de LHRH (1 ug) con el mismo intervalo. Los animales controles recibieron suero salino en reemplazo de NAL. Un grupo de los animales tratados con NAL recibió clonidina (CLON) y otro grupo yohimbina (YOH) 60 minutos antes del primer pulso de NAL. La concentración plasmática de LH se midió por radioinmunoanálisis en muestras de sangre obtenidas cada 15 o 20 min. desde una hora antes de la administración de las drogas y hasta una hora después de los pulsos de LHRH. La concentración plasmática de LH en respuesta a los pulsos de LHRH medida como área bajo la curva fue mayor en las ovejas pretratadas con NAL o NAL más CLON, con respecto a las controles (P < 0.01). Se concluye que la LHRH liberada por disminución del tono opioide actúa condicionando la hipófisis a los pulsos exógenos de LHRH.

Financiado por Proyecto 20.24.05. Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

**LA CISTEINA REACTIVA DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA SE ENCUENTRA EN UN SITIO ALOSTÉRICO PARA FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO** (The reactive cysteine of fructose 1,6-bisphosphatase is located in a fructose 2,6-bisphosphate allosteric site). Reyes, A. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

El mecanismo de la inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) es controvertido. Algunos autores han propuesto la existencia de un sitio alostérico para este inhibidor, pero otros han sugerido su interacción con el sitio activo de la enzima. Al analizar la activación por K<sup>+</sup> de la enzima de riñón de cerdo encontramos que existían residuos cisteína esenciales para esta propiedad y postulamos que K<sup>+</sup> disminuía la afinidad de FBPasa por Fru-1,6-P<sub>2</sub> en un segundo sitio (inhibitorio) para el sustrato. La posibilidad que este último sitio corresponda mas bien a un sitio de unión para Fru-2,6-P<sub>2</sub> nos impulsó a estudiar el efecto de diferentes ligandos de la FBPasa sobre la modificación de los grupos SH esenciales para su activación por K<sup>+</sup>.

FBPasa (12,5 μM) se trató con N-etilmaleimida (200 μM) a 4°C, pH 7,5, en presencia de diferentes adiciones. Se estudiaron la estequiometría de la reacción y algunas propiedades cinéticas de la enzima modificada.

La pérdida de la activación por K<sup>+</sup> se correlacionó con la modificación de un SH hiperreactivo por subunidad de enzima. Fru-2,6-P<sub>2</sub> (100 μM) o concentraciones altas de Fru-1,6-P<sub>2</sub> (25 mM) protegieron contra esta alteración; una protección parcial se observó con niveles no inhibitorios de sustrato. Estos resultados, junto con estudios cinéticos de la enzima modificada, sugieren que la cisteína altamente reactiva se ubica en un sitio alostérico para Fru-2,6-P<sub>2</sub> en la enzima, el cual también puede unir Fru-1,6-P<sub>2</sub> con menor afinidad. Este sitio alostérico sería responsable de la conocida inhibición de las FBPasas por exceso de sustrato.

(Financiado por: DID-UACH, S-85-26, FONDECYT, 1243).

**ESTUDIOS SOBRE LA REGULACION DE LA SINTESIS DE RUSTICIANINA EN Thiobacillus ferrooxidans.** (Studies on the regulation of the synthesis of Rusticyanin in Thiobacillus ferrooxidans.) Reyes, R., Jordana, X. y Jedlicki, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Una de las reacciones más importantes en el proceso de biolixiviación en el cual participa una bacteria quimiolitotrófica llamada Thiobacillus ferrooxidans, es la oxidación del ion ferroso a ion férrico, puesto que ella constituye una fuente de energía para esta bacteria. Se ha postulado que una proteína llamada Rusticianina, que contiene un átomo de cobre por molécula, estaría involucrada en esta vía de oxidación en T. ferrooxidans. En una primera etapa hemos purificado esta proteína casi a homogeneidad, utilizándola como antígeno en la inducción de anticuerpos contra Rusticianina en conejos. La actividad y especificidad de estos anticuerpos ha sido verificada por su capacidad de inmunoreaccionar selectivamente con una proteína de un extracto de T. ferrooxidans que posee igual migración que un patrón de Rusticianina en una electroforesis desnaturalante y posterior transferencia a una membrana de nitrocelulosa. Hemos crecido T. ferrooxidans en cultivos que contienen sulfato ferroso o azufre elemental (S<sup>0</sup>) como fuente de energía y bicarbonato [<sup>14</sup>C] para marcar las proteínas bacterianas. La autorografía de una electroforesis de estos extractos muestra una disminución de la radiactividad asociada a la banda de Rusticianina en aquellas células crecidas en presencia de S<sup>0</sup> con respecto a las crecidas en sulfato ferroso. Los resultados obtenidos aplicando técnicas de inmunoprecipitación de extractos radiactivos provenientes de células crecidas en diferentes medios, con el anticuerpo específico para Rusticianina, sugieren que la presencia de S<sup>0</sup> en los cultivos podría estar inhibiendo la síntesis de Rusticianina en la bacteria. (Patrocinado por proyecto PNUD/ONU/CHI/85/002, DIB, Universidad de Chile y FONDECYT.)

**TRANSPORTE DE H<sup>+</sup> EN CELULAS DE TUBULO SEMINIFERO DE RATA** (Proton transport in rat seminiferous tubule cells). Reyes J., Bitrán J. y Benos D.J., Instituto de Química, P. Univ. Católica de Valparaíso; Depto. Fisiología/Biofísica, Fac. Medicina, U. de Chile y Dept. Physiology/Biophysics, University of Alabama at Birmingham.

El pH interno es uno de los parámetros celulares sujetos a regulación homeostática y probablemente responsable de la modulación de eventos celulares como síntesis de DNA y proliferación celular. La actividad glicolítica de células transformadas de Sertoli y células espermatogénicas produce cambios internos que estimulan la secreción de protones. Esto se evidencia como una dependencia de glucosa de la aparición de equivalentes ácidos en el medio extracelular (200 nmoles/h. mg protein en 5 mM de glucosa), en una relación H<sup>+</sup>/lactato producidos entre 1 y 2. El metabolismo de glucosa es necesario ya que 2-deoxyglucosa no estimula la producción de equivalentes ácidos. Este efecto de glucosa podría en principio explicarse por la producción metabólica de protones en la vía glicolítica y/o la producción de NADH glicolítico y la estimulación de una dehidrogenasa de membrana que transportaría protones y electrones hacia el exterior de la célula. La producción de equivalentes reductores (e<sup>-</sup> o O<sub>2</sub>) por células espermatogénicas es <50 n moles/h. mg protein, descartando la posible importancia cuantitativa de este mecanismo de cotransporte. El transporte de protones metabólicos es también insensible a amiloride, un inhibidor del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Financiado Rockefeller Foundation RF 83002 y NIH AM-25886.

**Ca<sup>++</sup> y K<sup>+</sup>. UNA FUNCION CRUCIAL EN LA REACCION ACROSOMICA DE ESPERMATOZOIDE DE HAMSTER "IN VITRO".** [Ca<sup>++</sup> and K<sup>+</sup>. A key role in the hamster sperm acrosome reaction "in vitro"]. Riffo, M. Depto. Ciencias Básicas. Div.Cs. Med. Sur. Fac. Medicina y Div. Cs.Básicas. INTA. U.de Chile.

Para la inducción de capacitación (CAP) y reacción acrosómica (RA) "in vitro" en espermatozoide de mamífero, se utilizan medios químicos definidos que tratan de imitar las condiciones "in vivo". En experimentos realizados "in vitro" la inducción de la RA es dependiente de las condiciones de incubación. Estudios realizados en nuestro laboratorio han contribuido a demostrar que la adición de lisofosfatidilcolina (LFC) al medio de incubación acelera la inducción de la RA, pudiendo ser utilizada como marcador del proceso de CAP y que las variaciones en el medio de incubación influyen sobre la capacidad estimuladora de la RA por parte de LFC. Al respecto, el objetivo de este trabajo es proporcionar evidencias acerca de la secuencia de eventos que involucran algunos iones participantes en el desarrollo de la RA "in vitro". Espermatozoides epididimarios de hamster fueron lavados y separados en una columna de perlas de vidrio e incubados por diferentes tiempos a 37°C en un medio conteniendo bajas concentraciones de Ca<sup>++</sup> o K<sup>+</sup> y/o LFC. En espermatozoides incubados bajo estas condiciones LFC no estimula la RA. La adición tardía de tales iones indica que son necesarios para los eventos de la CAP y/o RA, especulándose que la entrada de K<sup>+</sup> es posterior y dependiente del aumento de Ca<sup>++</sup> intraacrosómico. La adición de bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> (toxina de escorpión y Co<sup>++</sup> respectivamente) inhibe la RA y este efecto no es revertido por la adición de LFC. Se concluye que los iones Ca<sup>++</sup> y K<sup>+</sup> son necesarios para los eventos propios de la RA "in vitro", tal vez contribuyendo a los procesos moleculares que llevan a una estrecha aposición entre las membranas acrosómica externa y la plasmática que la recubre. Financiado por proyecto B-2396-8613 D.I.B. U. de Chile y Grant 83010 O.M.S.

RESPUESTA DE LA  $H^+$ -ATPasa DE TRIPANOSOMATÍDEOS AL INHIBIDOR PEPTÍDICO DE LA ENZIMA DE HIGADO DE RATA. (Response of trypanosoma  $H^+$ -ATPase to the peptide inhibitor of the liver  $H^+$ -ATPase). Rilo, M.C., Cataldi de Flombaum, M.A. y Stoppani, A.O.M. Centro de Investigaciones Bioenergéticas y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La  $H^+$ -ATPasa de mitocondrias de hígado de rata y músculo cardíaco bovino, como así también la de levadura y cloroplastos, posee un péptido de bajo peso molecular que inhibe la actividad hidrolítica de la enzima, denominado "inhibidor peptídico natural de la ATPasa".

El objetivo de la presente comunicación fué demostrar la presencia del inhibidor en la  $H^+$ -ATPasa de tripanosomatídeos.

Se utilizaron células de Trypanosoma cruzi y Crithidia fasciculata para la obtención de mitocondrias, a partir de las cuales, por sonicación se obtuvieron partículas submitocondriales; estas últimas se filtraron por columna de Sephadex G-50 lográndose un aumento de la actividad enzimática de 0,2  $\mu\text{mol/mg}$  a 0,7  $\mu\text{mol/mg}$  y de 0,164  $\mu\text{mol/mg}$  a 2,1  $\mu\text{mol/mg}$  para T. cruzi y C. fasciculata, respectivamente. Estos datos demuestran la presencia del inhibidor asociado a la enzima y la retención del mismo en la columna.

Las partículas activadas fueron incubadas a distintos tiempos con concentraciones variables de inhibidor peptídico hepático obtenido por el método de Rackar (Proc. Natl. Acad. Sci., 1962, 48, 1659-1663).

La máxima inhibición cruzada se obtuvo entre 10-15 minutos de incubación; para T. cruzi se logró inactivación total, con C. fasciculata la inhibición fue del 50-75%.

Los resultados obtenidos de activación de la ATPasa de T. cruzi y C. fasciculata por filtración en Sephadex y la inhibición por reacción cruzada con inhibidor hepático, sugieren la existencia de un inhibidor natural de la ATPasa en dichos tripanosomatídeos.

REGULACION NEUROENDOCRINA DE LA DIFERENCIACION DE CELULAS DE MEDULA OSEA A LINFOCITOS Thy-1 POSITIVOS. (Neuroendocrine regulation of bone marrow cells differentiation to Thy-1 positive lymphocytes). Rivas, C. (Patrocinio: Esquivel, E.) Inst. de Medicina Experimental, Universidad Austral de Chile.

Recientemente hemos demostrado que factores hipotalámicos son eficaces en restaurar la respuesta inmune a tiroglobulina, profundamente deprimida en animales viejos. Experimentos preliminares indican que estos factores actuarían a través del timo. Con el fin de dilucidar este punto y determinar si el nivel de estos factores hipotalámicos se afecta con la edad, se desarrolló un sistema de cultivo in vitro de corta duración. Timo e hipófisis provenientes de ratones RK viejos se incubaron en presencia de un extracto hipotalámico de dadores de edad variable (24 hrs a 14 meses). El sobrenadante de este cultivo fue agregado a células de médula ósea en las cuales se determinó el porcentaje de células Thy-1 positivas, lo que se interpreta como diferenciación a linfocitos T.

Los resultados demuestran que: a) el extracto hipotalámico proveniente de dadores hasta 9 meses de edad es un eficiente diferenciador; b) tal efecto cae bruscamente entre los 9-10 meses de edad en que la capacidad de diferenciación del extracto es nula; c) el extracto de ratones timectomizados obtenido a los 12 meses de edad demuestra capacidad de diferenciación, a diferencia de los controles viejos no timectomizados, indicando un mecanismo de feed-back.

(Parcialmente financiado por Proyecto DID-UACH S-84-08 y FONDECYT N° 1070/85).

REGULACION HORMONAL HETEROLOGA DE LA ACCION DE PROLACTINA EN GLANDULA MAMARIA. (Heterologous hormonal regulation of prolactin action in mammary gland).

Ríos, M. y Puente, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Numerosos estudios, han permitido constatar que la enzima  $\delta$ -glutamyltranspeptidasa de la glándula mamaria está sujeta a regulación por prolactina y que de alguna forma participaría en el mecanismo de transporte de aminoácidos a las células secretoras.

En este trabajo, se estudió la participación que tienen las hormonas esteroideas, glucocorticoides y estrógenos, en la regulación de la actividad transpeptidásica de la glándula mamaria de rata.

Los estudios se realizaron in vivo, utilizando ratas ovariectomizadas, adrenalectomizadas, ovariectomizadas-adrenalectomizadas y pseudooperadas, las que se trataron con estradiol, hidrocortisona y domperidona (fármaco que estimula la secreción hipofisiaria de prolactina); en la mayoría de los casos se utilizó como control de la acción de prolactina, la actividad de la enzima lactosa sintetasa.

Los resultados confirman que la actividad transpeptidásica es regulada por la prolactina, e indican que tanto los glucocorticoides como los estrógenos modulan positivamente la acción de la hormona hipofisiaria sobre el tejido mamario.

El efecto de los glucocorticoides se manifiesta principalmente durante la lactancia. Los estrógenos parecen ser necesarios en la preparación de las células mamarias durante la virginidad, posibilitando así la capacidad de responder a la prolactina en la lactancia así como en la acción que ésta desarrolla en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria.

Financiado por Proyecto DIB 2116-8623 U. de Chile.

DETERMINACION DEL ESPESOR DE BICAPAS DE LIPIDOS TOTALMENTE HIDRATADAS MEDIANTE DISPERSION DE NEUTRONES. (Thickness measurements of fully hydrated bilayers by neutron scattering). Rivas, E., Reiss-Husson, F. y Sadler, D.M.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, (CONICET), La Plata, Argentina; Laboratoire de Photosynthese (CNRS), Gif-sur-Yvette, Francia y H.H. Wills Physics Laboratory, University of Bristol, Bristol, Inglaterra.

Se ha conseguido información sobre el espesor de la doble capa lipídica en dispersiones unilamelares de lípidos totalmente hidratados, utilizando la técnica de dispersión de neutrones a pequeño ángulo. Se prepararon vesículas unilamelares grandes de dimiristol lecitina con cadenas parafínicas totalmente hidrogenadas o perdeuteradas, mediante el método de evaporación en fase invertida y selección de tamaño por cromatografía sobre tamices moleculares. Se analizó directamente la variación de la densidad de dispersión a través de la membrana del liposoma utilizando el formallamo de la variación de contraste y el empleo de mezclas de isótopos ( $H_2O/D_2O$ ), que permite calcular espesores para las distintas regiones de la bicapa excluyendo el medio exterior. Los resultados se expresan en términos de: a) un parámetro de espesor a contraste infinito,  $D_w$ , el cual está directamente relacionado al espesor de la membrana. Para los liposomas de dimiristol lecitina,  $D_w = 10.75 \text{ \AA}$  lo que corresponde a un espesor de  $37.3 \text{ \AA}$ , si se asume que la superficie del liposoma es plana y anhidra. b) Un parámetro  $\alpha$ , relacionado a la variación de la densidad de difusión a través de la membrana. El resultado experimental acuerda estrechamente con los valores calculados previamente para la estructura cristalina de la DMPC. Un resultado de sumo interés es el que muestra que la inclinación de las cadenas parafínicas en la fase a baja temperatura, es de una magnitud tal que no provoca cambios de espesor con respecto a la doble capa en la fase líquida.

ESTUDIO DE LA GLICOPROTEINA INICIADORA DE LA SINTESIS DE B-1,4-GLUCANO DEL ALGA *Prototheca zopfii* (Study on the glycoprotein primer of a B-1,4-glucan in the algae *Prototheca zopfii*) Rivas, L.A. y Pont Lezica, R. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata y Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA.

En trabajos anteriores sobre la síntesis de B-glucanos de pared en la clorofita *Prototheca zopfii* encontramos que hay dos sistemas paralelos que sintetizan B-1,4-(B-1,3)-glucanos (tipo mixto) a partir de UDPG, y B-1,4-glucanos (tipo celulosa) a partir de GDPG. En estos dos sistemas parece haber reacciones similares en las que están involucradas glicoproteínas como iniciadoras. Los estudios cinéticos indican que no hay interferencia entre ellos y tienen requerimientos de metales diferentes. En este trabajo se describe la purificación y caracterización de la glicoproteína iniciadora de la síntesis de glucano tipo celulosa y su comparación con la involucrada en el glucano tipo mixto.

Las células se marcan con [<sup>3</sup>H]leucina in vivo, se preparan membranas y se incuban con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc. La fracción TCA insoluble se purifica y la glicoproteína doblemente marcada se utiliza para los estudios de caracterización. Se estudia el peso molecular aparente de la glicoproteína, tipo de enlace péptido-azúcar, tamaño y composición del oligosacárido, tipo de enlaces glicosídicos y configuración anomérica. Del estudio comparativo con la glicoproteína iniciadora de B-glucanos mixtos se concluye que estos caminos son paralelos a pesar de tener secuencias de reacciones similares.

Subsidios de CONICET, CIC y SUBCYT.

BASES IONICAS DE LA RESONANCIA ELECTRICA EN CELULAS CILIADAS AISLADAS DE RANA. (Ionic basis for electrical resonance in isolated hair cells from the Bullfrog). Robles, L., Roberts, W.M. y Hudspeth, A.J. Depto. de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, Univ. de Chile y Dept. of Physiology, School of Medicine, Univ. of California, San Francisco, CA, U.S.A.

En la coclea de mamíferos donde existe una membrana basilar la selectividad de frecuencia se obtiene por sintonización de esta estructura. En otras especies existen mecanismos de sintonización intrínsecos a las células ciliadas del oído interno. En la tortuga y en la rana se ha encontrado que las células ciliadas están sintonizadas por resonancia eléctrica. En ellas se han identificado canales voltaje dependientes de Ca<sup>++</sup> y canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>++</sup>, que podrían interactuar produciendo la resonancia del potencial de membrana. En este trabajo se estudia la relación entre la frecuencia de oscilación y parámetros cinéticos de los canales iónicos medidos en la misma célula. Las células ciliadas son disociadas mecánicamente del sáculo y de la papila anfibia de la rana y se registra usando la técnica de "patch-clamp" en célula completa. Cuando las células se estimulan con pulsos de corriente depolarizante muestran oscilaciones amortiguadas del potencial de membrana con frecuencias de resonancia de 125 Hz en el sáculo y entre 160 y 250 Hz en la papila. Cuando se depolarizan en condiciones de voltaje fijo producen una corriente iónica bifásica. Bloqueo con TEA permite aislar una corriente de Ca<sup>++</sup> de activación rápida y otra más lenta de K<sup>+</sup> activada por Ca<sup>++</sup>. Se observan diferencias entre los parámetros cinéticos de las células del sáculo y de la papila, tanto para los canales de Ca<sup>++</sup> como para los de K<sup>+</sup>. Estas diferencias en cinética están correlacionadas con las diferencias en frecuencia de resonancia de los dos grupos de células.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONICAS DEL ESPERMATOZOIDE EN EMBRIONES DEL ERIZO DE MAR *Tetrapygus niger* (Analysis of the non histone chromosomal proteins of *Tetrapygus niger* embryos). Roco, M., González, M., Gamboa, S., Puchi, M., Departamento de Biología Molecular y Departamento de Bioquímica Clínica, Universidad de Concepción, Chile.

Post fecundación del ovocito se produce la fusión del pronúcleo femenino y masculino. Resultados previos han demostrado que antes de la fusión, se produce la decondensación del núcleo del espermatozoide, produciéndose además pérdida de proteínas cromosomales no histónicas e histónicas. Con el objeto de obtener información precisa sobre la cinética de liberación de las proteínas no histónicas, se analizaron estas proteínas cromosomales por ensayos inmunológicos a diferentes tiempos postfecundación.

Las proteínas cromosomales no histónicas aisladas de cigotos obtenidos a los 3,5,7,20,30 y 60 minutos postfecundación fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y transferidas a papel de nitrocelulosa. Este se incubó con el anticuerpo antihistonas de espermatozoides de conejo, posteriormente con el anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo biotinilado y revelado con el sistema del complejo streptavidina-peroxidasa biotinilada.

Los resultados obtenidos indican que entre 2 y 5 min postfecundación hay pérdida de las proteínas no histónicas del espermatozoides conservándose tres proteínas que podrían proceder del genoma paterno, materno o ambos, ya que estas proteínas presentan reacción cruzada.

(Financiado por proyecto 20.31.11 de la Universidad de Concepción y Proyecto 1082/85 del FONDECYT).

ESTUDIO CONFORMACIONAL DE NUEVOS ANALOGOS ACTIVOS EN RECEPTORES DE AMINOACIDOS EXCITATORIOS. (Conformational Analysis on new analogs in excitatory amino acid receptors). Rodríguez, A.M., Ciuffo, G.M., Estrada M.R. y Jáuregui, E.A.

Cátedra de Química General II. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. 5700 San Luis. Argentina.

Actualmente se acepta que los receptores de aminoácidos excitatorios estarían involucrados en desórdenes neurológicos, por lo cual ha cobrado gran importancia la búsqueda de los requerimientos conformacionales en dicho receptor. En el presente trabajo se realiza un estudio conformacional teórico, utilizando un potencial átomo-átomo empírico, donde se supuso que la hidratación eliminaría las interacciones electrostáticas.

Los compuestos estudiados resultan de la modificación del ácido iboténico (IBO) por distintos mecanismos: elongación de la cadena lateral (2-homoIBO, 3-homoIBO), sustitución en el anillo (ATPA, 4-metilIBO) y ciclización de la cadena lateral en un segundo anillo (7-HPCA). Se analiza el efecto conformacional de estas modificaciones del compuesto base. Se obtiene que, cuando hay elongación de la cadena lateral (2-homoIBO y 3-homoIBO) aumenta la flexibilidad y el número de conformaciones. La sustitución en el anillo (4-Me IBO y ATPA) limita la posibilidad, por impedimento estérico, de acceder a conformaciones permitidas a IBO. 7-HPCA, compuesto totalmente rígido, adopta las dos posiciones de semisilla que fueran encontradas experimentalmente (#).

Comparando con resultados obtenidos previamente para otros compuestos, se proponen los requerimientos estructurales en los distintos tipos de receptores de aminoácidos excitatorios.

# P. Krogsgaard-Larsen et. al. In: Natural Products and Drug Development.

ESTUDIO DE LA VELOCIDAD ESPERMÁTICA EN EYACULADOS FRES-COS Y CONGELADOS, POR EL METODO FOTOGRAFICO DE EXPOSI-CION MULTIPLE, EN POTRO. (Study of the velocity in fresh and frozen semen, by multiple exposure photogra-phic method, in stallion). Rodríguez, H., Von Frey, W. Depto. de Biología Celular y Gené-tica, Facultad de Medicina y Depto. de Reproducción Ani-mal, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Chile.

Para conocer la potencialidad fecundante de un eyacu lado, se ha ideado una serie de métodos tendientes a una evaluación objetiva. Se plantea estudiar la veloci dad de los espermatozoides eyaculados, a través del Mé todo Fotográfico de Exposición Múltiple (Makler, 1980), en los períodos de Junio-Julio y Octubre-Noviembre, tan to en semen fresco como luego de la congelación. Se tra bajó con un total de 30 eyaculados en los que se evaluó el espermiograma convencional y la velocidad espermáti ca (um/seg). El período de congelación fue de un mes.

Los valores de la velocidad espermática mostraron un rango promedio de 10 a 12 um/seg. Al estudiar su rela ción con las características evaluadas en el espermio grama convencional, se encontraron coeficientes de cor rrelación positivos y significativos con la motilidad subjetiva y la vitalidad espermática, pero negativos con la morfología espermática. Estas correlaciones re sultaron semejantes para ambos períodos estudiados y tanto para semen fresco como congelado, sin presentar diferencias estadísticas entre ellos.

Se concluye que la velocidad espermática es una car acterística que permite evaluar la potencialidad fecun dante de los espermatozoides eyaculados y que no se af ecta por el período de estudio o el proceso de conge la ción.

(Financiado por Proyecto DIB N° B 1464-8655).

SINTESIS Y CARACTERIZACION DE GAGS EN CELULAS DE ESTROMA DE TESTICULO EN CULTIVO. (GAGs synthesis by testicular stromal cells). Rodríguez, J.P. y Minguell, J.J. Unidad de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

Los componentes de la matriz extracelular (ME) regulan la adhesión, los patrones biosintéticos, la migración y la proliferación celular. Esto sugiere que la organiza ción de la ME, también pudiera jugar un rol importante durante la activa proliferación y diferenciación celular en la espermatogénesis. En este sistema la génesis de una ME funcional radica en las células de estroma testicular. En este trabajo se presentan resultados sobre estudios de síntesis y caracterización de glicosilaminoglicanos (GAGs) producidos por células de estroma testicular de rata, cultivadas en un sistema en el cual coexisten to dos los fenotipos de estroma (Sertoli, Leydig, peritubu lares, fibroblastoides y otros). Las células se cultivan en medio 199 suplementado con suero fetal (12%) y de ca ballo (12%) e hidrocortisona ( $10^{-7}M$ ) a 33° en 5% CO<sub>2</sub>. En las células adherentes (estroma) se determina: prolifera ción celular y producción de testosterona, ABP, colá geno y GAGs.

La síntesis de GAGs totales se determina usando gluco samina tritiada y precipitación diferencial con cetil trimetil-amonio (CTA) al 1%. Los distintos tipos de GAGs (dematan sulfato, DS; Heparan sulfato, HS; ácido hialurónico, HA; condroitinsulfato, CS) se cuantifican por trata miento con enzimas selectas y precipitación posterior con CTA.

En este sistema ocurre proliferación, producción de ABP, testosterona como también de colágeno y GAGs. La síntesis de GAGs se correlaciona con proliferación celu lar, alcanzando un máximo al momento de confluencia. Se observa una marcada diferencia entre el porcentaje de GAGs en medio de incubación vs. células (DS: 19 vs. 0; HS: 17 vs 79; CS: 50 vs 15; HA: 14 vs 6). La producción de colágeno y GAGs por un sistema de cultivo donde estan presentes todas las células de testículo, permitirá co nocer el rol de ME en la espermatogénesis.

(Financiado por DIB. B-2173 y PNUD-CHI 84/003).

ESTUDIO HISTOQUIMICO E INMUNOCITOQUIMICO DEL ORGAN O SUBCOMISURAL, FIBRA DE REISSNER Y MASSA CAUDALIS EN LARVAS DE LAMPREAS (*Geotria australis*). (Histochemi cal and immunocytochemical study of the Subcommissu ral Organ, Reissner's fiber and Massa Caudalis in lamprea larvae (*Geotria australis*)). Rodríguez S., Rodríguez P., Bense C. Instituto de Histología y Pat ología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: K Schaeblitz).

El órgano subcomisural (OS), estructura circunven triculer ubicada bajo la comisura blanca posterior, secreta material glicoproteico hacia el tercer ven trículo cerebral, formando la fibra de Reissner (FR) estructura filamentosas que sigue el canal espendima rio y en su porción terminal forma la Massa Caudalis (MC).

El OS, FR y MC de larvas de lampreas fueron inves tigada 1: histoquímicamente mediante Lectinas: aglu tinina de *Recinus comunis* (RCA), Concanavalina A (Con A), aglutinina de germen de trigo (WGA); 2: in munocitoquímicamente utilizando anticuerpos Anti FR de bovino.

El OS y la MC fueron fuertemente inmunoreactivas, en cambio la FR fue inmunonegativa. La FR no reac cionó ni con Con A ni RCA. Solo la periferia de la FR fue WGA (+). La RCA mostró afinidad por la FR des pués de hidrólisis ácida. El centro de la MC fue fuertemente WGA positiva.

Estos resultados sugieren que: a) a nivel de la FR hay una alteración conformacional que esconde los sitios inmunoreactivos, hecho que es revertido en la MC; b) la FR tiene una cubierta de glicoproteínas que contienen Acido Siálico como residuo terminal, mientras que la MC posee una cubierta de glicoproteí nes con Galactosa como residuo terminal; c) en la FR y MC la disposición espacial de las glicoproteínas es diferente.

Financiado Proyecto S-85-39 Dir. Investigación UACH y Grant I/38259 Stiftung Volkswagenwerk.

REGULACION DE RECEPTORES ADRENERGICOS Y PURINERGICOS EN EL CONDUCTO DEFERENTE DE LA RATA (Adrenergic and puri nergic receptor regulation in the rat vas deferens). Rohde, G.C. Lab. de Farmacología, Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Renato Albertini).

En los últimos años se han presentado evidencias que apoyan la idea de una co-transmisión adrenérgico-purinérgica en el conducto deferente de varios roedores. Entre las interrogantes que plantea dicho modelo nos in teresó estudiar las modificaciones que provoca la dener vación en las respuestas adrenérgica y purinérgica. Pa ra ello se usaron ratas Sprague-Dawley controles y de nervadas quirúrgicamente o con 6-OHDA. Los segmentos prostáticos y epididimarios se incubaron en un baño de superfusión a 37°C con tensión basal de 1 gr. Se estu dió la afinidad (EC<sub>50</sub>) y efecto máximo de agonistas adrenérgicos y purinérgicos en controles y denervados, antes y después de incubación con antagonistas específicos. Los resultados demostraron una disminución de la EC<sub>50</sub> para noradrenalina en ambos segmentos y un aumento de 4x el efecto máximo sólo en el prostático después de la denervación quirúrgica. Resultados similares se obtie nen con la denervación química. La potencia de antago nistas (pA<sub>2</sub>) no se modificó por la denervación en el segmento epididimario pero aumentó en forma significati va en el prostático. El estudio de agonistas purinérgi cos no demostró cambios significativos en la respuesta máxima ni en la afinidad. La evidencia sugiere un aumen to en el número de receptores adrenérgicos en el segmen to prostático con cambios de afinidad a diferencia de lo que ocurre en el segmento epididimario. La ausencia de modificación en la respuesta purinérgica sugiere asi mismo una regulación distinta de estos receptores.

Financiado por Proyecto 03/86 Escuela Medicina, Pontifi cia Universidad Católica de Chile.

CARACTERIZACION DE LAS DNA POLIMERASAS DNA-DEPENDIENTES DE *Trypanosoma cruzi*. (Characterization of DNA dependent DNA polymerases from *Trypanosoma cruzi*). Rojas, C.V., Solari, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las diferentes etapas del ciclo de vida del protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, se encuentran representadas por formas celulares que son distinguibles mediante diversos parámetros, uno de los cuales es la proliferación celular.

Con el propósito de comprender los mecanismos involucrados en la regulación de la replicación del DNA en este parásito, se ha abordado el estudio de las enzimas que participan en este proceso, en una primera instancia, las DNA polimerasas.

Se ha establecido un esquema de purificación que ha permitido separar dos fracciones con actividad DNA polimerásica, a partir de los extractos de la forma epimastigote del parásito. Estas dos actividades parcialmente purificadas, han sido caracterizadas según: a) la capacidad para utilizar diferentes tipos de complejos matriz-partidor como sustrato, b) la sensibilidad a inhibidores específicos y selectivos y c) a sus propiedades físico-químicas.

Resultado de interés señalar que de acuerdo a las características determinadas, ambas actividades enzimáticas difieren de las DNA polimerasas de las células humanas, que son infectadas por este parásito intracelular.

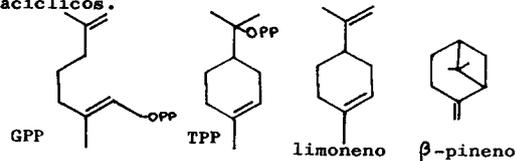
Financiado por: Universidad de Chile. Proyecto B-2130-8622 y UNDP/World Bank/WHO/TDR.

PARTICIPACION DE UN INTERMEDIARIO MONOCICLICO EN LA BIOSINTESIS DE MONOTERPENOS. (Participation of a Monocyclic Intermediate in Monoterpene Biosynthesis). Rojas, M.C., Avalos, V. y Cori, O. Dep. Química, Fac. Ciencias, U. de Chile.

Se ha propuesto que en la ciclación enzimática de neril y geranil bifosfato (NPP y GPP) a monoterpénos cíclicos, participaría un intermediario monocíclico del tipo terpinilo. Datos termodinámicos y cinéticos en reacciones modelo, ponen en duda la participación de este intermediario en la biosíntesis de monoterpénos bicíclicos.

Se sintetizó terpinilbifosfato tritiado (TPP- $^3\text{H}$ ) y se ensayó su utilización por un sistema enzimático que forma  $\beta$ -pineno y limoneno a partir de GPP y NPP. TPP- $^3\text{H}$  fue transformado eficientemente al hidrocarburo monocíclico limoneno. No se obtuvieron hidrocarburos bicíclicos. La eficiencia catalítica de la limoneno sintetasa fue 35 veces mayor con TPP que con GPP y NPP como sustratos.

Los datos sugieren la participación de un intermediario terpinilo en la biosíntesis de limoneno, en tanto  $\beta$ -pineno se formaría en un proceso concertado a partir de los precursores acíclicos.



SUEÑO DESINCRONIZADO Y CICLO DE TEMPERATURA. Moncagliolo M., Wynken U. y Vivaldi E. A. Dpto. de Fisiología, U. de Valparaíso; Instituto de Neurocirugía; y Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los elementos relevantes del ciclo sueño vigilia en ratas (ondas delta y husos del electrocorticograma, actividad theta hipocámpal y electromiograma), son detectados ininterrumpidamente por un microcomputador conectado directamente a un polígrafo, y sus incidencias son cuantificadas en intervalos de 15 segundos. Esto permite diagnosticar vigilia (V), sueño de ondas lentas o sincronizado (SS) y sueño activo o desincronizado (SD). Se estudiaron tres ratas, por cuatro a siete días, bajo ciclo luz oscuridad 12:12. Además en dos ratas se tomaron muestras cada 15 segundos de la temperatura corporal.

La curva de temperatura presenta un aumento sostenido que comienza 2 horas después del comienzo de la fase de luz y hasta unas 3 horas antes del fin de la fase de oscuridad. Sobre esta línea se superponen aumentos transitorios correspondientes a los episodios de actividad.

Se definieron índices para evaluar propensión al SD. Para estimar el curso temporal durante las 24 horas, cada día se dividió en 6 intervalos de 4 horas, se calcularon los índices para cada intervalo y se promediaron luego los intervalos correspondientes. Los siguientes son los índices y las secuencias de 6 valores que resumen sus cursos temporales promedios en 24 horas, correspondiendo los 3 primeros a la fase de luz. Cantidad de SD: 21, 30, 29, 9, 11, 4 minutos. Porcentaje del sueño total ocupado por SD: 13, 17, 18, 13, 14, 8. Latencia mayor al SD (duración del episodio de SS más prolongado interpuesto entre V y SD): 19, 17, 12, 8, 8, 7 minutos. Latencia mayor al SD como porcentaje del SS: 13, 10, 9, 14, 11, 16.

El que la mayor propensión al SD coincida con la parte inicial de la fase ascendente de la curva de temperatura es análogo a lo observado en el humano, y podría permitir modelar en la rata las alteraciones de la interacción entre SD y ciclo de temperatura características de patologías neuropsiquiátricas que involucran a los ritmos biológicos.

Proyecto D. I. B., U. de Chile M-2406. Proyecto FONDECYT 1221.

PEONC Y CLATRINA DE *N. crassa*: CARACTERIZACION MOLECULAR (PEONC and clathrin from *N. crassa*: molecular characterization). Rosa, A.L., Alvarez, M.E., Bocco, J.L. y Maccioni, H.J.F. CIQUIBIC (UNC-CONICET) Facultad de Ciencias Químicas, UNC, 5016-Cordoba, Argentina.

Clatrina de *N. crassa* ha sido caracterizada en nuestro laboratorio (Rosa, A.L., Gravotta, D. y Maccioni, H.J.F., esta Reunión). PEONC (PM 60000) copurifica con clatrina y posee propiedades físico-químicas semejantes. Según microscopía electrónica, la proteína forma filamentos que pueden desensamblarse y reensamblarse en estructuras semejantes a "canastos" vacíos de clatrina.

Una preparación altamente enriquecida en PEONC (según SDS-PAGE y tinción con  $\text{AgNO}_3$ ) nos permitió obtener anticuerpos que, luego de purificados por afinidad, fueron caracterizados en "Western blots".

Como aproximación a estudios moleculares de la expresión genética de clatrina y PEONC, mRNA-poli-A<sup>+</sup> de *N. crassa* fue purificado por cromatografía en oligo(dT)-celulosa de RNA total obtenido de micelio vegetativo (cepa St. Lawrence 74 A). La integridad del RNA se estudió por electroforesis en geles de agarosa (RNA-glioxal-DMSO) y tinción con plata. El mRNA-poli-A<sup>+</sup> obtenido (aprox. 0.8 % del RNA total) fue traducido *in vitro* en presencia de ( $^3\text{H}$ )-leucina o ( $^3\text{S}$ )-metionina en extractos de germen de trigo y los productos radioactivos identificados luego de SDS-PAGE y fluorografía. Se presentan resultados sobre experimentos de inmuno-precipitación de los productos de traducción *in vitro*.

CLATRINA Y VESICULAS CUBIERTAS EN *N. crassa*. (Clathrin coated vesicles in *N. crassa*). Rosa, A.L., Gravotta, D. y Maccioni, H.J.F.  
 CIQUEBIC (UNC-CONICET) Facultad de Ciencias Químicas, UNC, 5016-Córdoba, Argentina.

Hemos encontrado y caracterizado clatrina y vesículas cubiertas en el hongo filamentoso *N. crassa*. Las vesículas cubiertas fueron obtenidas a partir de cultivos vegetativos de cepas salvaje y mutantes morfológicas. Las células coquechadas y lavadas, pulverizadas en aire líquido y homogeneizadas por ruptura mecánica y sonicación se sometieron a centrifugaciones diferenciales para obtener una fracción microsomal cruda. La misma fue cromatografiada en columna de perlas de vidrio obteniendo fracciones con vesículas cubiertas distinguibles según tinción negativa y microscopía electrónica. Según SDS-PAGE estas fracciones estaban enriquecidas en un polipéptido de movilidad electroforética similar a clatrina bovina (172 Kd). Por estudios de microscopía electrónica y SDS-PAGE se logró estudiar el ensamblado de ensamblado de "canastos" vacíos formados por clatrina de *N. crassa*. Anticuerpos obtenidos contra clatrininas de vaca y *N. crassa* no dieron reacción cruzada en "Western blots".

EFFECTO DEL 48/80 SOBRE LA  $Ca^{2+}$ -ATPasa LUEGO DE TRATAMIENTOS QUE IMPIDEN SU COMBINACION CON LA CALMODULINA. (Effects of 48/80 on the  $Ca^{2+}$ -ATPase after treatments that impede its combination with calmodulin). Rossi, J.P.F.C., Rega, A.F. y Garrahan, P.J.  
 Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113 Buenos Aires.

La  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membranas de eritrocitos humanos es modulada por la calmodulina (CaM). Hemos demostrado (B.B. Acta 816, 379) que el compuesto 48/80 (inhibidor altamente específico de los efectos de la CaM sobre la  $Ca^{2+}$ -ATPasa) inhibe con alta afinidad ( $K_i = 3,3 \mu g/ml$ ) en forma parcial y no competitiva al componente de alta afinidad y en forma competitiva al componente de baja afinidad de la curva de sustrato de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa. El efecto del 48/80 sobre los componentes de alta y baja afinidad al ATP son atribuibles a su acción sobre la CaM. La proteólisis controlada de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa impide la unión de la CaM con la enzima (Zurini et al., J. Biol. Chem. 259, 618). En estas condiciones el compuesto 48/80 inhibe en forma no competitiva y total la actividad de  $Ca^{2+}$ -ATPasa, con alta afinidad ( $K_i = 8,1 \mu g/ml$ ). Este efecto del 48/80 debe atribuirse a la combinación del inhibidor con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa y no con la CaM. Estos resultados permiten concluir que: a) El 48/80 es capaz de combinarse con la  $Ca^{2+}$ -ATPasa inhibiéndola en forma completa. b) Los efectos de compuestos inhibidores de la CaM no son necesariamente atribuibles a su acción sobre la CaM puesto que esos compuestos pueden también actuar en forma directa sobre la enzima.

Con subsidios del CONICET y de la Universidad de Buenos Aires.

CAMBIO DEL ESPERMATOZOIDE EN EL TRACTO EPIDIDIMARIO (*Capra hircus*). (Spermatzoal changes in the epididymal tract of *Capra hircus*). Rubio, M., Bustos-Obregón, E.  
 Depto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina y Depto. Zootecnia, Facultad Cs. Veterinarias, Universidad de Chile.

Se ha realizado un estudio preliminar de la maduración espermática del chivo. Una característica importante de dichos cambios es la motilidad progresiva. Además, se han detectado variaciones morfológicas y en la composición química de los núcleos de los espermatozoides que ocurren durante su pasaje por el epidídimo.

Se obtuvo por castración quirúrgica epidídimos de cinco chivos en período reproductivo, realizándose test de decondensación (DC) con tioglicolato en espermatozoides de cabeza, cuerpo y cola de los epidídimos. Además, se midió motilidad objetiva y velocidad espermática por Fotografía de Exposición Múltiple (MEP) en los tres segmentos epididimarios, así como motilidad subjetiva.

Por M.E.P. se ha encontrado que la motilidad espermática en los distintos segmentos del epidídimo (cabeza: 11,73%; cuerpo: 29,49% y cola: 66,7%), difiere entre ellos significativamente ( $p < 0,05$ ), no concordando esto con los valores de motilidad subjetiva. La velocidad espermática ( $u/seg$ ) es homogénea en el tracto epididimario. Por otro lado se observó una progresiva disminución del % de DC nuclear a lo largo del epidídimo (cabeza: 18,30%; cuerpo: 16,73% y cola: 3,92%). Se detecta la inadecuada estabilización de la cromatina, dependientes de enlaces S-S, cuando el espermatozoide no ha alcanzado su madurez óptima en el epidídimo.

Los cambios del espermatozoide que se relacionan con la capacidad para fertilizar y que se reflejan en el desarrollo creciente de la motilidad progresiva y modificaciones del estado estructural de la cromatina espermática a través del tracto epididimario, son los indicadores de maduración espermática, la cual se completaría en el segmento terminal (cola del epidídimo).

(Financiado por Proyecto DIB N°B 1464-8655)

DISTRIBUCION ESPACIAL EN ADULTOS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* SELECCIONADOS PARA ALTA Y BAJA AGREGACION DE HUEVOS. (Spatial distribution in adults of *Drosophila melanogaster* selected for high and low egg aggregation rate). Ruiz, G.  
 Inst. Ecología y Evolución, Fac. Ciencias, U. Austral de Chile

Este trabajo pone a prueba la hipótesis que la elección del sitio de oviposición en *Drosophila melanogaster*, es una forma de expresión de la conducta gregaria que poseen los adultos.

Con este objeto, a grupos de individuos seleccionados para alta y baja agregación de postura de huevos, se les registró la distribución espacial. La estadística usada fue la distancia al vecino más cercano (Clark y Evans, 1954).

Los resultados indican que: -no existe diferencia sexual para la distribución espacial de los individuos -la distribución espacial de los adultos seleccionados para alta concentración de huevos es significativamente diferente de los seleccionados para baja concentración de huevos ( $R=0.46$  y  $R=0.96$  respectivamente;  $F=78.04$ ;  $P < 0.01$ ); -individuos sin experiencia sexual y seleccionados para alta o baja concentración de huevos poseen una distribución espacial similar;  $R=0.74$  y  $R=0.87$  respectivamente.

Estos resultados aprobarían la hipótesis propuesta. Sin embargo para la distribución espacial de los adultos debería considerarse su estado fisiológico.

(Financiado por Proyecto RS-83-15 D.I.D., U.A.Ch.)

**ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES INTERHEMISFERICAS VISUALES EN RATAS ANOFTALMICAS CONGENITAS** (Study of the visual interhemispheric projections in anophthalmic rats) Ruiz, G.; Bravo, H. y Olavarría, J. Laboratorio de Neurofisiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Departamento de Anatomía, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La corteza cerebral visual de la rata envía y recibe conexiones interhemisféricas a través del esplenio del cuerpo calloso, estableciéndose éstas entre los límites de las diferentes áreas visuales. Existen antecedentes que indican que estas proyecciones se remodelan cuando el sistema visual es manipulado externamente, por ejemplo en enucleación postnatal.

En el presente trabajo estudiamos lo que sucede cuando la privación se realiza en períodos prenatales, utilizando para ello una cepa de ratas anoftálmicas congénitas. Múltiples microinyecciones de HRP disueltas en DMSO al 1% se practicaron en la corteza de un hemisferio; después de 24 a 48 horas de sobrevida se perfundieron y fijaron los cerebros para luego realizar secciones seriadas. Utilizando la técnica de corteza aplanada e histoquímica correspondiente se visualizó todo el patrón de conexiones interhemisféricas. El análisis en campo claro y oscuro reveló que la distribución general de conexiones, descrito anteriormente, se mantiene.

Esto último indica que la ausencia de input visual desde períodos prenatales no altera el establecimiento de las conexiones interhemisféricas. Sin embargo algunos detalles como el ancho de la banda existente entre el área estriada y periestriada lateral es mayor. Este hecho se podría interpretar como la persistencia en estas ratas anoftálmicas de grupos neuronales que en condiciones normales remodelan sus conexiones interhemisféricas por el input que viene de la retina.

**ACTIVIDAD TRANSPORTADORA DE FOSFOLIPIDOS EN OVOCITOS Y EMBRIONES DE ANFIBIOS.** Phospholipid transfer activity in amphibian oocytes and embryos. Rusiñol, A. y Bloj, B. Dpto. Bioq. Nutricional INSIBIO (CONICET-UNT). Instituto de Qca. Biológica - Fac. Bioq. Qca. y Farmacia. UNT. Chacabuco 461 - 4.000 - Tucumán.

Se estudió el rol de las proteínas transportadoras de fosfolípidos durante la biogénesis de membrana plasmática que ocurre durante el desarrollo embrionario de *Bufo arenarum*. Se midió la actividad transportadora en sobrenadante de pH 5,1 de ovocitos y de embriones utilizando vesículas sonizadas que contenían fosfolípidos marcados con 14C y trioleína 3H (como marcador no intercambiable) como partículas donadoras y membranas de eritrocitos tratadas con glutaraldehído como partículas aceptoras. Las mediciones se efectuaron a 37°C y los resultados se expresaron en % de transferencia por hora y por mg de proteína. La actividad transportadora de fosfatidilcolina (PC) en sobrenadante de ovocitos sin fecundar es de 12, ocho veces más alta que en sobrenadante de hígado de sapo embrionario. Después de 20 hs de desarrollo, en el estadio de blástula tardía, esta actividad es solamente de 2,3. Un descenso de 4 veces en la actividad transportadora se obtiene también si la actividad se expresa por embrión. Las actividades transportadoras de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE) en el sobrenadante de ovocitos (expresadas como % de transferencia por hora y por 100 ovocitos) es de 11,1 y 5,6 respectivamente. En el estadio de blástula tardía la primera es solo de 0,6 y la segunda no se detecta bajo las condiciones experimentales usadas. Estos resultados sugieren que más del 95% de las actividades transportadoras de PE y PI y el 75% de la de PC presentes en el sobrenadante de ovocitos no son esenciales para el posterior desarrollo del embrión. No se descarta sin embargo que una proteína transportadora específica para fosfatidilcolina sea requerida para este proceso.

**EVIDENCIAS HISTOLOGICAS Y HEMATOLOGICAS DE CAMBIOS CIRCADIANOS DEL BAZO ASOCIADOS AL SOPOR DE *Marmosa elegans*.** (Histologic and hematologic evidences of daily changes in the spleen of *Marmosa elegans* associated with torpor). Ruiz, G. y Valenzuela, C. Depto. de Biología Universidad Metropolitana de Cs. de la Educación.

Diversos estudios indican que los estados de sopor en mamíferos están frecuentemente relacionados con cambios hematológicos cuya magnitud y dirección (hemodilución o hemoconcentración) aparentan ser característicos de los grupos o de las especies estudiadas. Se ha sugerido además que la habilidad para entrar y salir rápidamente del sopor está asociada con el almacenamiento de eritrocitos en el bazo.

El objetivo del presente trabajo es determinar la dirección de los posibles cambios hematológicos durante el sopor de un marsupial, grupo no estudiado en este contexto, y paralelamente buscar evidencias de almacenamiento y depleción esplénica de eritrocitos.

Con este propósito se obtuvo por punción cardíaca sangre de marmosas tanto en estado de sopor como en actividad normal. En algunos ejemplares se extirpó el bazo durante el sopor y en otros durante la fase activa. Luego del registro de los pesos relativos de los bazos, se procesaron para microscopía óptica.

Los resultados indican que el estado de sopor de *Marmosa elegans* está asociado con una hemodilución sistémica derivada del secuestro esplénico de eritrocitos, lo que se evidencia por: 1) disminución del hematocrito, 2) incremento en el peso relativo del bazo y 3) marcado incremento del número de eritrocitos almacenados en el bazo.

Proyecto DIB N 1753-8644 Univ. de Chile.

**TELA DE ALGODON DERIVATIZADA COMO MATRIZ PARA INMOVILIZACION DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA.** (Derivatized cotton cloth as matrix for the immobilization of  $\beta$ -Galactosidase). Saldaña R., Herlitz E. Departamento de Bromatología, Nutrición y Dietética, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. (Patrocinio M. Bunster).

Existe gran interés por disponer de una  $\beta$ -Galactosidasa inmovilizada que posea estabilidad, actividad adecuada, buenas propiedades mecánicas y un costo razonable. La aplicación práctica de un preparado que cumpla tales condiciones permite la hidrólisis enzimática de lactosa en diferentes productos de interés en tecnología de alimentos.

En el presente trabajo se ha optimizado la obtención de un derivado hidrofóbico de tela de algodón capaz de inmovilizar  $\beta$ -Galactosidasa a través de adsorción hidrofóbica. La obtención de un derivado hidrofóbico de tela se logra mediante el acoplamiento de fenilglicidiléter a los grupos OH de la tela, el cual proporciona a través de los grupos fenilo las características hidrofóbicas necesarias para la adsorción de la enzima. Variando las condiciones de reacción entre la tela y el fenilglicidiléter se ha logrado aumentar la adsorción de la enzima a la tela. La enzima inmovilizada de esta manera ha sido caracterizada y se ha evaluado su capacidad para hidrolizar lactosa a escala de laboratorio.

Financiamiento : Proyecto FONDECYT 0520/85.

RELACION SACAROSA-ALMIDÓN: UDP-Glc FOSFORILASA, SU DISTRIBUCIÓN Y LOCALIZACIÓN. (Relationship between sucrose and starch: UDP-Glc Phosphorylase, its distribution and localization). Salerno, G.L.

Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nac. de Mar del Plata y Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA, Casilla de Correo 1348, 7600 Mar del Plata, Argentina.

El mecanismo por el cual los productos de la reacción catalizada por sacarosa sintasa (SS) en el sentido de clivaje de sacarosa, participan en la síntesis de almidón, permaneció sin definirse hasta la demostración de la enzima UDP-Glc fosforilasa en endospermas de maíz en desarrollo (Salerno, 1985). Dicha enzima, que cataliza la fosforólisis del UDP-Glc con la concomitante formación de UDP y Glc-1P, permite explicar la relación entre SS y la síntesis de almidón, al facilitar Glc-1P, necesaria para su sintetasa. Se consideró importante conocer la presencia de la enzima en otras fuentes vegetales, así como también en distintos tejidos. Se comprobó la actividad UDP-Glc fosforilasa en otros granos en formación (trigo y cebada) así como en semillas maduras de dichas plantas. Por otra parte, en tejidos fotosintéticos, hojas de cereales y en un alga unicelular, *Chlorella vulgaris*, la enzima se halla siempre presente. Dado el rol fundamental que esta enzima tiene en granos en desarrollo, se procedió a determinar la localización de la enzima en endospermas de maíz en desarrollo, con lo cual se tendría un esquema más claro de la vía que sigue el UDP-Glc hasta el almidón. Para ello se prepararon protoplastos de endospermas de maíz y a partir de ellos se aislaron los amiloplastos. La actividad enzimática apareció vinculada a la fracción de amiloplastos y queda por determinar su vinculación con el pasaje a través de la membrana de los plástidos.

Apoyado por CONICET y CIC.

ACTIVIDAD DE LA ATPasa LISOSOMAL DE HIGADOS CON DIFERENTE CAPACIDAD PARA DEGRADAR PROTEÍNAS. (Lysosomal ATPase activity in livers with different protein breakdown ability). Sanllicenti, P.M., Cassia, R.O., Bur, J.A. y Conde, R.D. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Cuando se administra a ratones adultos una dieta sin proteínas, el contenido de proteínas hepáticas se reduce a la mitad en 5 días. La mesa perdida se recupera rápidamente al realimentar a los animales con una dieta completa. Esto se debe a que la degradación proteica se inhibe. Existen evidencias sobre la participación de los lisosomas en dicha degradación. La regulación de la actividad lisosomal podría estar a nivel de la ATPasa presente en la membrana de dichas organelas. Su función sería mantener la acidez intralisosomal.

El presente trabajo se orientó a la medición de la actividad de ATPasa en membranas lisosomales aisladas de hígados de animales en dieta sin proteínas (degradación aumentada) y realimentados (degradación inhibida). Las membranas se aislaron a partir de lisosomas cargados con Tritón WR 1339 (Tritosomas). Además de la actividad de ATPasa, se midieron los contenidos de fosfolípidos y proteínas.

Los resultados indicaron que la actividad de ATPasa por  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido es independiente de la capacidad degradativa del tejido. Sin embargo, el contenido de proteína por  $\mu\text{mol}$  de fosfolípido es mayor en las membranas provenientes de tejido con baja actividad degradativa. La relación entre este hecho y la actividad proteolítica de los lisosomas es desconocida.

Financiado por CONICET, CIC y FIBA.

ANÁLISIS MOLECULAR DE PLASMIDOS EN CEPAS DE *T. ferrooxidans* AISLADAS DE MINERALES CHILENOS. (Molecular analysis of *T. ferrooxidans* plasmids isolated from strains of Chilean minerals). Sanchez, H., Cáceres, B., Sanchez, J. F., Droguett, G. y Hevia, E. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica, Casilla 114-D, Santiago, Chile. (Patrocinio: F. Bull).

La lixiviación bacteriana es un procedimiento alternativo interesante para la solubilización de ciertos metales a partir de minerales de baja ley. Este proceso involucra la participación de una bacteria acidófila, *T. ferrooxidans*.

Con el propósito de iniciar estudios dirigidos hacia la manipulación del DNA de este microorganismo, hemos caracterizado y clonado en *E. coli*, según técnicas usuales, elementos extracromosomales aislados de diversas cepas autóctonas de *T. ferrooxidans*. De las cepas A-4, A-6 y R-2, se aisló un plásmido de características moleculares similares, en base a criterios de tamaño (10 kb) y mapas de restricción. Se caracterizó en más detalle el plásmido de A-4, por clonamiento parcial de varios subfragmentos de éste en pUC19/JM101. Hemos encontrado en éste, una región refractaria al clonamiento en el sistema descrito. La cepa D-2 carece de plásmidos y la cepa MACS-100 tiene uno diferente, según criterios ya mencionados. Intentos reiterados de transformación de *E. coli* con el plásmido nativo o incorporando el gen CAF han resultado infructuosos.

Este estudio tiene como fin, la construcción de plásmidos híbridos, que puedan ser usados como vehículos de clonamiento molecular en este acidófilo, lo que permitirá mejorar algunas propiedades bacterianas, para obtener una mayor eficiencia en el proceso de biolixiviación.

Financiado por FNUD-ONUDI (CHI 85/002).

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE APONOGETON DISTACHYON. (Chemical content of Aponogeton distachyon). San Martín, J., Barrera, J. y Hauenstein, E. Sedes Maule y Temuco, Universidad Católica de Chile e Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile.

*Aponogeton distachyon* L.f. (*Aponogetonaceae*, *Liliatae*) es una planta acuática de origen sudamericano, silvestre en los bañados de Santo Domingo, al Sur de Valdivia, Chile. Esta especie es un recurso natural de múltiples aplicaciones. Se estudió la composición química de los diferentes órganos de esta planta con miras a orientar su futuro aprovechamiento.

El material se colectó en primavera, separando rizomas, raíces, pecíolos, hojas, flores, brácteas, frutos y semillas, los que luego de lavados y secados, se pulverizaron para realizar análisis químicos por los métodos tradicionales. El contenido energético se determinó en un calorímetro adiabático.

El mayor contenido de ceniza se presentó en la raíz. El extracto no nitrogenado es alto en el rizoma y aumenta más aún en la semilla. La fibra cruda es baja en rizomas, hojas y semillas, aumentando en raíces, pecíolos, flores y frutos. La curva de proteína tiene un recorrido inverso, siendo alta en la hoja. Calcio y fósforo presentaron comportamientos opuestos en los órganos aéreos y similar en los subterráneos. Los valores calóricos son altos en rizomas, hojas y semillas y bajos en raíces y pecíolos. Los resultados confirman la utilidad de los rizomas como alimento y de las hojas como fuente proteica.

Proyectos: DID-UACH N° RSM-80-30 y FONDECYT

ESTIMULACION DEL TRANSPORTE DE CALCIO EN MICROSOMAS DE RAIZ DE *PHASEOLUS VULGARIS* POR VITAMINA D<sub>3</sub> (Stimulation of calcium transport in microsomes of *Phaseolus vulgaris* roots by vitamin D<sub>3</sub>). Santamaria, E. y Boland, R. Departamento de Biología, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca.

La vitamina D<sub>3</sub> a bajas concentraciones afecta el crecimiento y la captación de Ca en segmentos de raíz de *Phaseolus vulgaris* cultivados *in vitro*. Se realizaron experimentos para identificar el sistema(s) de transporte de Ca afectado por el esterol. Raíces obtenidas de semillas de *P. vulgaris* germinadas 4-5 días en la oscuridad fueron cultivadas 2 h en medio de Shenk-Hildebrandt en ausencia y presencia de vitamina D<sub>3</sub> (10<sup>-9</sup> M). Se aislaron fracciones subcelulares por ultracentrifugación diferencial de homogenados del tejido. Se efectuó la caracterización parcial de varios sistemas transportadores de Ca<sup>2+</sup>. En la fracción mitocondrial, uno en el que participa la cadena respiratoria y el otro asociado a una H<sup>+</sup>-ATPasa. En microsomas se identificaron una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa dependiente de calmodulina y una H<sup>+</sup>-ATPasa que genera un gradiente de H<sup>+</sup> para el intercambio Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>. El tratamiento con vitamina D<sub>3</sub> no produjo cambios apreciables en la actividad de los sistemas de transporte de Ca<sup>2+</sup> localizados en mitocondria. Sin embargo el esterol aumentó significativamente el transporte del catión en membranas microsomales. Como la vitamina D<sub>3</sub> incrementa los niveles endógenos de calmodulina en las raíces es posible que los efectos observados estén relacionados con una estimulación de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa dependiente de CAM. Los efectos de hormonas de crecimiento vegetales (auxina, citocinina) están mediados por cambios en los niveles citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup>. Es probable que la vitamina D<sub>3</sub> afecte el crecimiento de raíz mediante un mecanismo que involucre también al Ca<sup>2+</sup> como mensajero secundario.

OBTENCION DE 3-CETO Δ<sup>1,4</sup> ESTEROIDES, POR VIA MICROBIANA. (Microbiana obtention of 3-ceto Δ<sup>1,4</sup>steroids) Sanz de Tósetti, M.I.; Segovia, R.F. Cátedra de Microbiología General e Industrial Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional de San Luis 5700 San Luis, Argentina.

INTRODUCCION: En la obtención de compuestos esteroidales con actividad farmacológica, una de las reacciones de importancia industrial, que puede llevarse a cabo por vía microbiana, es la 1-desdeshidrogenación. Tradicionalmente se recurre al uso de un aceptor artificial de electrones, que permita la remoción de los electrones desde el sustrato, encareciéndose de esta forma el proceso. En el presente trabajo, nosotros describimos la conversión de progesterona en su derivado deshidrogenado, por células de *Nocardia rhodocrous*, en dos fases líquidas inmiscibles, sin agregado de aceptor artificial de electrones.

METODOS: Células de *Nocardia rhodocrous*, que crecieron en medios conteniendo lactato, glicerol ó glucosa, se colocaron en una solución de progesterona en gasoil (100 mg/50 ml), y luego de dos horas de agitación, se separaron por centrifugación y el sobrenadante sometió a pruebas de TLC-Las placas de sílica gel F 254 se observaron bajo lámpara UV.

RESULTADOS: Las células cultivadas en medios conteniendo lactato, llevaron a cabo la bioconversión en más del 50% en las dos horas de reacción, no así las cultivadas en medios con glicerol ó glucosa.

DISCUSION: La presencia de lactato, induciría la D-lactato deshidrogenasa de membrana, ligada al transporte de aminoácidos y azúcares. Las células contienen ácido láctico en su pellicula acuosa, que posibilitaría la regeneración del cofactor necesario (NAD, NADP), para la reacción de deshidrogenación.

MODELOS CIRCADIANOS DE SUEÑO-VIGILIA EN UNA POBLACION DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS (Circadian Sleep-Wakefulness Patterns in University Students)

Santibáñez, L., Fernández-Góñi, A., Moya, L., Sánchez, M.

Depto. de Fisiología y Biofísica. Fac. de Medicina. Universidad de Chile.

La literatura de Sueño/Vigilia (S/V) de humanos, plantea la existencia de diversos modelos distribuidos en las 24 hrs. Por ej., el "Hábito Buho": modelo de S/V caracterizado por despertar matinal tardío (después de 8 hrs) comienzo tardío del Sueño nocturno (Sn) y mayor eficiencia de rendimiento (real y/o subjetiva) en el crepúsculo. Los sujetos con un horario más temprano de despertar matinal y comienzo de Sn, tendrían el "Hábito Alondra". No hay comprobación de estos modelos en poblaciones.

La comprobación de ellos en una población normal, es de gran importancia para la organización y programación de la vida y rendimiento personal y profesional de cada sujeto. Por ej., para la elección y distribución de sus turnos laborales. Además, estos datos nos informarían, sobre formas de organización de los marcapasos circadianos hipotalámicos.

En la población de 500 estudiantes de Medicina de 1° a 6° año de Medicina de la Sede Norte de la Facultad de Medicina, adultos jóvenes, sanos, se hizo contemporáneamente, una encuesta de 62 índices sobre hábitos de S/V en días laborales, fines de semana y vacaciones. Se estudió la prevalencia de los hábitos "Buho"- "Alondra" y su relación con presencia/ausencia de patología del ciclo S/V.

Los resultados muestran la existencia clara de los modelos "Buho"/"Alondra", con fuerte dominancia del hábito "Buho" (92 %). Ambos hábitos fueron "contrariados" por los horarios habituales de trabajo en la Facultad y la necesidad de tiempo de estudio, lo que se tradujo la existencia de Hipersomnia y somnolencia diurnas en el 98 % de toda la población.

Los periodos escogidos como de mayor alerta y rendimiento intelectual para los "Buhos" estaban localizados: después del mediodía en dos ciclos ultradianos: entre 15-17 hrs y entre 18 y 24 (78 %) y un ciclo matinal tardío entre 11 a 13 hrs (32% de los Buhos).

Excluida la somnolencia, es llamativo un 57,2% de patología del S/V i.e. ronquidos, bruxismo, priapismo, sonambulismo, etc.

Estos resultados, muestran la existencia de 2 modelos circadianos de S/V y muchas interrogantes: ¿son genéticos? ¿plantean la necesidad de considerar el hábito circadiano de rendimiento de una población ante la necesidad de obtener sus máximos rendimientos laborales e intelectuales? ¿Se repetirán en otras poblaciones contemporáneas?

ESTUDIO DE UNA ACTIVIDAD DE β-N-ACETIL GLUCOSAMINIDASA ASOCIADA A LECTINA DE PAPA. (Study on β-N-acetyl glucosaminidase activity associated to potato lectin) Scheggia, C., Daleo, G. y Pont Lezica, R. Instituto de Investigaciones Biológicas y Departamento de Biología, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata.

En trabajos previos sobre lectina de papa (*Solanum tuberosum*, aglutinina: STA) se había observado que las preparaciones presentaban actividad glicosidásica. Existen antecedentes con respecto a otras lectinas, especialmente de la familia de las Leguminosas, que se unen específicamente a galactosa, y a su vez presentan actividad de α-galactosidasa. No se ha encontrado hasta el presente que lectinas de otras familias tengan esta propiedad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar algunas propiedades de la actividad glicosidásica presente en preparaciones de STA para determinar si está asociada a la misma molécula o se trata de una enzima que copurifica con la lectina.

Las preparaciones de STA se obtuvieron a partir de tubérculos de la variedad Huinkul, y se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de quitina. La actividad glicosidásica se midió utilizando para-nitro fentil-glicósidos. Inmunoglobulina anti-STA se preparó inmunizando conejos por vía intramuscular con STA purificada y posterior purificación del suero. Se estudió la actividad glicosidásica frente a varios sustratos (pNF-glicósidos) resultando ser β-N-acetilglucosaminidasa. Esta tiene un pH óptimo de 6.6 y una Km aparente de 0.25 mM. Se estudia la especificidad de sustratos frente a oligómeros de N-acetil glucosamina y otros oligosacáridos. En gels de poliacrilamida en presencia de SDS se observan sólo los polipéptidos correspondientes a STA, que den el mismo patrón de inmunoprecipitación en Ouchterlony. No hemos logrado disociar hasta el presente la actividad enzimática de la lectina, por lo que se sugiere que corresponden a la misma molécula. Se discute el posible rol de esta actividad enzimática que es rara en plantas superiores, así como las similitudes de esta actividad enzimática asociada a STA, con la presente en algunas lectinas de Leguminosas.

Subsidios de CIC, SUBCYT y CONICET.

METODO RAPIDO DE DETECCION DE ADN PLASMIDICO EN CEPAS DE *Clostridium acetobutylicum*. (Quick method to visualize plasmid DNA from strains of *C. acetobutylicum*) Schijman, A.G., Floccari, M., Mendez, B. Lab. de Genética Bacteriana, Depto de Qca Biológica, Facultad de Cs Exactas y Naturales, Universidad de Bs.As. *C. acetobutylicum* es un microorganismo anaeróbico, Gram +, que produce acetona, butanol y etanol a partir de almidón como fte. de C. La fermentación acetobutílica presenta un interés biotecnológico doble: 1. producir a escala industrial solventes orgánicos y 2. degradar la biomasa residual renovable utilizándola como sustrato fermentativo. De ahí la importancia de conocer y mejorar la genética de este microorganismo. Cualquier manipulación genética requiere de sistemas de transferencia génica eficientes, como por ej. la introducción de vectores de clonado. En este lab. se obtuvieron cepas portadoras de plásmidos, según evidencias fenotípicas. A partir de este material biológico es necesario detectar físicamente dichos plásmidos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un procedimiento rápido y en pequeña escala (cultivos de 5 ml) para visualizar ADN plásmidico por electroforesis en geles de agarosa. Este método se basa en: 1. fragilizar la pared bacteriana con lisozima, en presencia de Arnasa y de una alta concentración de EDTA (100mM) para inhibir la fuerte actividad de Adnasa presente en estas cepas; 2. lisar los protoplastos con una alta concentración de SDS (1%) en presencia de proteinasa K; 3. desproteinizar con fenol-cloroformo y 4. sembrar una alícuota en geles de agarosa. Mediante este procedimiento se detectaron bandas correspondientes a moléculas CCC oligoméricas. El método es sencillo, rápido (1 hora), por lo que resulta adecuado a los efectos de ser empleado rutinariamente para rastrear un número considerable de muestras en una jornada de trabajo.

BARRERAS DEL ORGANISMO SUBCOMISURAL DE LA RATA CON EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO Y LA SANGRE. (Blood and cerebrospinal fluid-subcommissural organ barrier). Schoebitz, K. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile.

El órgano subcomisural (OS) es una estructura circunventricular ubicada en la pared del 3er ventrículo (V) bajo la comisura posterior. Las células ependimarias (CE) y subependimarias (SE) envían prolongaciones que contactan con los vasos sanguíneos (vs) de la región SE o al espacio leptomeníngeo.

Se utilizaron 16 ratas, de las cuales 8 fueron inyectadas en la cisterna magna (CM) con 100 ul de peroxidasa (P) al 3% y las restantes fueron inyectadas en el 3er V. A los 2 y 15 minutos postinyección se fijaron por perfusión vascular con glutaraldehído al 2%. Se extrajo el cerebro, se diseccionó el OS y la eminencia media y se siguieron fijando por inmersión 4 horas. Al día siguiente se procesaron para el revelado de la P según el método de Graham y Karnovsky (1966). Los cortes para microscopía electrónica se procesaron en forma habitual.

Los resultados nos indican que: 1) El endotelio de los vs del OS es continuo; 2) Poseen un espacio perivascular que contiene colágeno largo espaciado; 3) En el citoplasma de los vs del OS se observan escasas vacuolas de pinocitosis con P. Cuando se inyecta el marcador en la CM no hay P en el espacio intercelular de CE y hay P en el espacio subaracnoideo y SE. Cuando se inyecta en el 3er V el espacio intercelular de la región basal de las CE y el de las células SE presentó el marcador, en cambio el espacio intercelular de la región apical de las CE no lo presentó.

Esto indicaría que existe una barrera efectiva OS-sangre y una probable barrera OS-líquido cefalorraquídeo. Esto ubicaría al OS en una situación excepcional cuyo significado funcional es aún desconocido.

Financiado por Proyecto S-85-39, Dirección de Investigación, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

METABOLIZACION DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LIGNINA POR *Streptomyces viridosporus* T7A (Metabolism of lignin model compounds by *Streptomyces viridosporus* T7A. D. See lenfreund, C. Rüttimann, R. Vicuña. Lab. Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, U. Católica de Chile.

En la naturaleza la biodegradación de la lignina es llevada a cabo por la acción integrada de hongos, bacterias filamentosas (Actinomycetes) y eubacterias, atribuyéndose en general un rol preponderante a los hongos. Últimamente se ha postulado que ciertos actinomicetes tendrían también una participación importante en este proceso catabólico.

La bacteria filamentososa ligninolítica más conocida es *Streptomyces viridosporus* T7A. Nosotros hemos estudiado su versatilidad metabólica utilizando diversos tipos de compuestos modelo de lignina y preparaciones purificadas de lignocelulosa.

Se estudió la metabolización de compuestos modelo de bajo PM tales como ácidos aromáticos monoméricos y diméricos por métodos espectroscópicos. Se observó que algunos compuestos son metabolizados (ác. benzoico y ác. protocatecuico), otros no son modificados y ác. vanillico es inhibitorio para el crecimiento del microorganismo.

Utilizando fracciones purificadas de lignina Kraft se observó crecimiento de *Streptomyces* en la fracción de PM mayor de 3000 e inhibición del crecimiento en la fracción de PM menor de 3000 rica en ác. vanillico. Al sustraer selectivamente el ác. vanillico de la fracción de menor PM mediante un pretratamiento con bacterias que metabolizan este compuesto, se obtuvo un crecimiento comparable al encontrado en la fracción de mayor PM.

Por último, se estudió la producción por cuenta de esta bacteria del intermediario polimérico precipitable con ácido (APPL) utilizando lignocelulosa de distintas fuentes (paja de trigo, aserrín de pino), en diversas condiciones de cultivo. Estos APPL son un sustrato ligninoso natural y hemos descubierto que existen bacterias que son capaces de utilizarlos como única fuente de carbono. Financiado por DIUC, Celulosa Arauco, FONDECYT.

ACTIVIDAD ENZIMATICA EN ESPERMATOZOIDE DE DIFERENTES ESPECIES DURANTE EL TRANSITO EPIDIDIMIAL. (Spermatozoal enzymic activity in different species during epididymal transit). Sembaj, A., Ponce, R.H. y Vermouth, N.T.

Cátedra de Química Biológica, Facultad de C. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Los espermatozoides de mamíferos adquieren su capacidad fertilizante durante su pasaje a través del epidídimo. Este proceso de maduración está asociado a cambios morfológicos y bioquímicos. Hemos realizado un estudio comparativo de las actividades de lactato dehidrogenasa (LDH), malato dehidrogenasa (MDH), aspartato aminotransferasa (AAT), glutamato dehidrogenasa (GluDH), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) y proteínas totales (PT) en extractos acuosos de espermatozoides aislados de caput y cauda de epidídimo de rata, ratón, conejo, cobayo y cerdo. La actividad se expresa en unidades por célula. El tránsito epididimario se acompaña de una reducción en la mayoría de las actividades enzimáticas y en el contenido de proteínas, excepto para LDH en cobayo que presenta un incremento significativo. GluDH en ratón y LDH, AAT y PT en cerdo, no mostraron variaciones.

Las modificaciones que experimentan las enzimas en espermatozoides durante la maduración difieren en las distintas especies, lo cual sugiere que dicho proceso no se expresa, en todas ellas, por un patrón metabólico uniforme.

MORFOLOGIA DE FIBRAS DEL VAGO REGENERADAS EN GLIA DEL HIPOGLOSO. (Morphology of regenerated fibers of the vagus on hypoglossal nerve).

M. Serra. Lab. Neurocitología, Depto. Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. (Patrocinio: J. Alvarez.)

En neuronas amielínicas del vago, el calibre de la prolongación infranodosa (IN) es de  $1.1 \mu\text{m}^2$ , y el número de microtúbulos (MTs) por axón es de 56. En la prolongación supranodosa (SN), en su trayecto periférico e intracraneal tiene valores de  $0.36 \mu\text{m}^2$  y 10 MTs por axón.

Esto se podría deber a dos programas genéticos, uno para cada prolongación, o a que la glía central o periférica, que rodea a los axones, difiera y module un solo programa. Para discriminar entre estas posibilidades hicimos regenerar en gatos, fibras SN del vago en el nervio hipogloso que aporta la glía periférica, y cuyos axones tienen características similares a los IN. A los 6 meses reoperamos y estudiamos los nervios con el microscopio electrónico. Se analizaron fibras SN en su glía original ( $0.31 \mu\text{m}^2$  y 15.3 MTs por axón) y en glía del hipogloso ( $0.31 \mu\text{m}^2$  y 17.2 MTs por axón; estos valores se asemejan a los de las prolongaciones SN del vago normal. Se concluye que la glía por la que discurre el axón no participa en la especificación de su calibre o del contenido microtubular del axón. Sería la condición de ser SN o IN lo que determina las diferencias morfológicas encontradas en las fibras amielínicas central o periférica del vago.

EFFECTO DEL LITIO SOBRE LA LIBERACION DE COLECISTOQUININA DESDE CORTES DE CUERPO ESTRIADO DE RATA. (Effect of lithium on the release of colecystokinin from rat striatal slices). Sierralta, J., Beinfeld, M.C. y Gysling, K. Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. y Dept. of Pharmacology, St. Louis University, St. Louis, MO, U.S.A. (Patrocinio: B. Ramírez).

El litio es uno de los fármacos más usados en el tratamiento de la psicosis maniaco-depresiva, sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción. El propósito de este trabajo es estudiar el efecto del litio sobre la liberación de colecistiquinina (CCK) un neurotransmisor putativo.

Cortes de cuerpo estriado ( $200 \mu$ ) se incubaron en Krebs-Ringer-Fosfato pH 7.4 continuamente oxigenado. La liberación fue inducida por  $\text{K}^+$  40mM. El litio se intercambia equimolarmente con NaCl. La CCK liberada fue determinada por radioinmunoensayo usando un anticuerpo anti CCK (R5) (Beinfeld y cols. Brain Res. 213, 51, 1981). La adición de LiCl 10 mM al medio rico en  $\text{K}^+$  no afectó la liberación de CCK. Sin embargo, la preincubación de cortes de cuerpo estriado por 50 min en la liberación de CCK por exposición subsecuente a  $\text{K}^+$  40mM. Es importante destacar que LiCl 10 mM estaba presente en el medio de estimulación de los cortes controles así como en los preincubados con  $\text{Li}^+$ . Este efecto también se observó cuando los cortes fueron sometidos a dos períodos de estimulación S1 y S2 y previo a la segunda estimulación los cortes eran preincubados por 40 min. en presencia de  $\text{Li}^+$ ;  $S_2/S_1$  control =  $0.78 \pm 0.05$ ;  $S_2/S_1$  experimental =  $1.62 \pm 0.21$ .

Se discuten posibles mecanismos de este efecto de litio sobre la liberación de CCK.

Financiado parcialmente por proyecto DIUC 203/86.

MORFOLOGIA BUCOFARINGEA Y ALIMENTACION DE ODONTESTHES BONARIENSIS Y ODONTESTHES MAULEANUM DEL EMBALSE RAPEL. (Morphology of the Oropharynx and feeding of *Odonesthes bonariensis* and *Odonesthes mauleanum* at Rapel Reservoir. Silva, E., Comte, S.H., Contreras, M. y Vila, I. Depto. Cs. Ecológicas, Univ. de Chile.

El Embalse Rapel exhibe marcada heterogeneidad ambiental. Sin embargo, su creación reciente y altas fluctuaciones de nivel influirían en una fauna bentónica pobre en diversidad y abundancia. La fauna íctica, en cambio, es abundante y variada. Este trabajo compara el nicho trófico de dos especies congénicas de Atherinidae del Embalse y estima el grado de sobreposición alimentaria. Se capturaron peces con redes agalleras pares de 1.5, 3.5 y 5.0 cm, colocados por 24 h en estaciones litorales. Se analizó la morfología buco-branquial de los ejemplares y se determinó el contenido estomacal comparándolo con la oferta ambiental.

Ambas especies presentan adaptaciones diferentes: *O. bonariensis* es la especie dominante en este ecosistema, su conducta alimentaria como depredador carnívoro es oportunisto y consume una amplia gama de items. *O. mauleanum*, de distribución preferentemente lótica, sólo se encuentra en aguas de baja profundidad en el Embalse, es poco abundante en la zona de muestreo y el rango de tallas capturadas es limitada (14-20 cm). El contenido estomacal incluye organismos bentónicos como larvas de insectos y ostrácodos, con un porcentaje alto de estómagos vacíos o llenos de sedimento y ocasionalmente restos vegetales. Ambas especies tienen boca protráctil, pero *O. bonariensis* la extiende en línea recta y *O. mauleanum* lo hace oblicuamente. Hay diferencias en el número de branquiaspinas de los arcos branquiales y en el sistema dentario: esto permite postular modalidades de capturas diferentes, hecho corroborado en observaciones preliminares de alimentación experimental. Es posible predecir que *O. mauleanum* se desplazaría entre los afluentes y el embalse. Proyecto DIB N-2450/8613. MAB/5 UNESCO.

PRODUCCION DE LIGNINASAS POR HONGOS NATIVOS CHILENOS. (Production of ligninases by natives white-rot fungi). Silva, E., Merino, A., Agosin, E. y Pincheira, B. Laboratorio de Biotecnología, INTA, Universidad de Chile. \*Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La celulosa junto a las hemicelulosas y lignina, suman más del 85% del peso seco de los tejidos leñosos.

La lignina es un hetero-polímero aromático, tridimensional y amorfo, cuya recalcitrancia dificulta tanto su aprovechamiento, como el de los polisacáridos asociados a ella (celulosa y hemicelulosa).

En la naturaleza, la biodegradación de la lignina se lleva a cabo principalmente por hongos Basidiomycete llamados pudrición blanca, en un proceso lento y altamente oxidativo. Un representante muy estudiado de esta clase es *Phanerochaete chrysosporium* del cual se pudo aislar en el año 1983, la primera enzima con actividad ligninolítica.

En Chile se han encontrado distintos tipos de hongos asociados a la descomposición de la madera nativa. Estos fueron recolectados bajo la forma de carpóforos, cuyas características macroscópicas han permitido en algunos casos una caracterización parcial. Otra prueba de caracterización lo constituyó el test de Bavendaa, que indica la producción de fenoles oxidasas extracelulares que permite distinguir los llamados hongos de pudrición blanca de los de pudrición parda. De esta manera se identificaron algunos hongos entre los cuales están el *Trametes versicolor*, *Ganoderma applanatum*, *Gloeospora vitellina* y *Phlebia chrysocrea*; estos dos últimos son responsables de la producción del llamado "palo podrido".

Los crecimientos miceliares en medio malta permitieron determinar las temperaturas óptimas de crecimiento de los hongos. Teniendo esto en cuenta y usando como indicador del metabolismo secundario la decoloración del azul de Reazol-6 se tomaron los sobrenadantes de los medios de cultivo y se probó su actividad ligninasa con la metodología descrita para la ligninasa del *Phanerochaete chrysosporium*. Se estudió el efecto del nitrógeno, oxígeno y agitación sobre la producción de ligninasas en cultivo líquido para las cepas que mostraron la actividad ligninasa más elevada.

Aquellos hongos más promisorios en cuanto a actividad específica, fueron sometidos a análisis enzimáticos preliminares, además de dar los primeros pasos en los estudios genéticos.

Financiado por: Fondo de Desarrollo Universidad de Chile.

Proyecto: Biodegradación y aprovechamiento de recursos lignocelulósicos.

ANTICUERPOS MONOCLONALES DIRIGIDOS CONTRA CALICREINA URINARIA HUMANA (Monoclonal antibodies directed to human urinary kallikrein) Macarena Silva Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Alfredo E. De Ioannes)

Para el estudio de la calicreína tisular y especialmente para su cuantificación en el plasma, los anticuerpos monoclonales presentan ventajas sobre los anticuerpos policlonales usados hasta ahora.

La inmunización de ratones hembras CB10F1 con calicreína urinaria humana purificada, indujo una respuesta humoral compatible con la producción de anticuerpos monoclonales.

Se hicieron dos fusiones somáticas con linfocitos esplénicos provenientes de ratones inmunizados *in vivo*, con calicreína urinaria humana. Los animales, previo a la fusión, recibieron la inyección de refuerzo por vía intravenosa. Estas fusiones somáticas dieron origen al híbrido HUK VD6 que secreta un anticuerpo monoclonal específico de calicreína urinaria humana por el ensayo ELISA (enzima inmunoensayo en fase sólida) usado en la selección de híbridos. Además, se realizó una fusión somática de linfocitos esplénicos provenientes de un ratón inmunizado *in vivo* que recibió la dosis de refuerzo *in vitro*. Esta fusión generó dos híbridos -HUK 1E11 de la clase IgG, y HUK 2B5 de la clase IgM-productores de anticuerpos monoclonales dirigidos contra calicreína urinaria humana.

La caracterización inmunológica de los anticuerpos monoclonales obtenidos, indicó que éstos no se unen a la enzima en solución bajo las condiciones en que fueron ensayados.

El anticuerpo monoclonal HUK 1E11 puede ser empleado en el estudio, por *western blotting*, de calicreínas tisulares provenientes de distintos órganos humanos y de rata, y en el estudio de los fragmentos de degradación proteolítica fisiológica de la enzima.

Proyecto DIUC 303/81.

ESTUDIO DE LA RECUPERACION DE LOS MARCADORES DE DIFERENCIACION TINICA, POR ADMINISTRACION DE CASEINA EN ANIMALES SOMETIDOS A DEFICIENCIA PROTEICA SEVERA. (Thymus repopulation by casein feeding after a severe protein deficiency). Slobodianik, N.H., López, M.C., Melton, E., & Roux, M.E. (\*CONICET). Dpto. Bromatología y Nutrición Experimental, Fac. Farmacia y Bioquímica, Univ. Buenos Aires.

La cinética de recuperación del timo fue estudiada luego de la administración de caseína al 20%, durante 5, 9, 21, o 40 días, en ratas Wistar que al destete sufrieron déficit severo de proteínas. Se determinó el peso ( $X \pm ES$ ) y el número de células del timo ( $N^\circ$  cél  $\times 10^7 \pm ES$ ) en cada uno de los tiempos mencionados. La curva de invasión tímica observada en los controles de 80 días de edad (C), no se obtuvo en las ratas de nuestro modelo experimental que recibieron caseína durante 40 días (peso:  $357.0 \pm 39.0$  vs C:  $287.9 \pm 23.2$ ;  $N^\circ$  cél:  $53.4 \pm 5.0$  vs  $35.8 \pm 7.9$ ; \* $P < 0.05$ ). La población T madura y sus subpoblaciones fueron caracterizadas por inmunofluorescencia indirecta mediante el empleo de los anticuerpos monoclonales: W3/13, W3/25 y MRC OX8. Resultados: W3/13: (5:  $37.9 \pm 3.7$ ; 9:  $93.1 \pm 2.4$ ) vs C:  $87.6 \pm 3.2$ ; 21:  $80.1 \pm 3.4$  vs  $90.9 \pm 0.6$ ; 40:  $81.1 \pm 2.5$  vs  $68.7 \pm 2.3$ . W3/25: (5:  $32.4 \pm 6.5$ ; 9:  $61.2 \pm 4.1$ ) vs  $65.9 \pm 3.3$ ; 21:  $59.4 \pm 5.7$  vs  $82.4 \pm 1.7$ ; 40:  $50.8 \pm 5.7$  vs  $63.9 \pm 2.6$ . MRC OX8: (5:  $54.5 \pm 4.9$ , 9:  $65.5 \pm 2.9$ ) vs  $69.2 \pm 3.6$ ; 21:  $69.7 \pm 2.9$  vs  $77.6 \pm 0.2$ ; 40:  $65.9 \pm 5.0$  vs  $65.0 \pm 1.6$  ( $X \pm ES$ , \* $P < 0.01$ ). Estos datos indican que los porcentajes de células T de las distintas subpoblaciones han alcanzado el valor de los controles de igual edad; aún cuando la fase de regresión gradual del timo está retrasada.

ESTUDIO DEL EFECTO HIPOTENSOR EN PERROS AL ADMINISTRAR DIFERENTES FRACCIONES DE Solanum crispum R. (Study of hypotensor effect upon dogs through the application of different parts of Solanum crispum R.). Sobrevía, L., Alarcón, J. Departamento Ciencias Básicas, Instituto Profesional de Chillán. (Patrocinio: S. Recabarren).

Existe una gran cantidad de información sobre el contenido de sustancias químicas presentes en plantas, además sobre el efecto biológico que estas ejercen al ser aplicadas en animales, como también en órganos y tejidos aislados.

No se conoce claramente la relación que existe entre sustancias extraídas de plantas de nuestro medio y el efecto que producen al ser aplicadas a un animal de experimentación.

Se realizó el presente trabajo con el objeto de determinar en qué medida la presión arterial de un perro se ve afectada al administrar fracciones de un extracto de Solanum crispum R. (natre) por vía endovenosa. Paralelamente se registraron parámetros como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y diuresis del animal. Fracciones derivadas del extracto madre producen un efecto hipotensor y un aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria ( $p < 0.01$ ). No se observaron alteraciones en la diuresis del animal. Los ensayos analíticos aplicados a las fracciones finales indican presencia de aminas y compuestos flavónicos. Cuando se administraron fracciones que contienen C-27 alcaloides no se observaron cambios de presión.

Consideramos que es interesante profundizar en el conocimiento de metabolitos secundarios existentes en vegetales de nuestro medio con el objeto de obtener mayor información de su efecto al ser aplicados en modelos experimentales.  
Res. Ex. N° 434/85.

CUANTIFICACION E INTERACCION DE LA FERREDOXINA-NADP<sup>+</sup> REDUCTASA CON LAS MEMBRANAS TILACOIDES EN LA CIANOBACTERIA Anabaena Sp. 7119. (Quantification and interaction of ferredoxin-NADP reductase to the thylakoid membranes in the cyanobacterium Anabaena Sp. strain 7119). Soncini, F.C., Serrano, A. y Vallejos, R.H.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

La ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa (EC 1.18.1.2) es la enzima terminal del transporte de electrones fotosintéticos en plantas superiores, algas verdes y cianobacterias.

Se ha estudiado la interacción de esta flavoproteína con la membrana tilacoide en la cianobacteria Anabaena sp. 7119. Mediante ruptura mecánica (sonicación) en presencia de cationes divalentes se observó que sólo un 20% del total de la proteína, determinada por técnicas inmunoelectroforéticas o usando el ensayo de citocromo c reductasa, permanece unida a membrana. El empleo de polímeros no iónicos (polietilenglicol y polivinilpirrolidona) en el medio de ruptura, incrementó el porcentaje de la enzima unida a membrana hasta un 80% del total, obteniéndose valores de 8-10 nmoles de reductasa por  $\mu$ mol de clorofila. El incremento de la cantidad de enzima unida a membrana en presencia de polímeros no iónicos puede ser explicado por la reducción de la actividad del agua producida por estos polímeros.

Estos resultados indican que la interacción de la proteína con la membrana tilacoide en cianobacterias sería diferente de la ya informada para plantas superiores, en donde la interacción con la membrana es dependiente de la presencia de cationes divalentes.

MODIFICACION DE LOS OLIGOSACARIDOS DE  $\beta$ -GALACTOSIDASA EPIDIDIMARIA. EFECTO EN SU AFINIDAD POR MEMBRANAS. (Modifications of the oligosaccharide of epididymal  $\beta$ -galactosidase. Effects on its affinity for membranes). Sosa, M.A., Mayorga, L.S. y Bertini, F. IHEM-CONICET, U.N.Cuyo. Mendoza. Argentina.

Las enzimas lisosomales secretadas conservan los residuos manosa 6-fosfato (M6P) que son reconocidos por receptores específicos presentes en membranas subcelulares. Previamente hemos observado que  $\beta$ -galactosidasa secretada por el epitelio epididimario de rata se une con alta afinidad y en forma saturable a membranas subcelulares. Sin embargo, M6P no fue un buen inhibidor de la unión, la que en cambio fue desplazada por derivados de fructosa 6-fosfato.

Con el objeto de determinar que residuos son responsables de esta afinidad, la enzima del fluido fue parcialmente purificada por DEAE celulosa y tratada con fosfatasa alcalina (1 U/ml), con metaperiodato de sodio (5 mM) o con neuraminidasa (0.38 U/ml). Luego de los tratamientos la enzima fue enfrentada con membranas obtenidas de una fracción post-nuclear de un homogeneizado de hígado de rata a 49 000 g x 15 min. y posteriormente lavada con KCl 0.2 M. Luego de 1 h de incubación la actividad enzimática unida a membranas fue medida en el sedimento lavado por dos veces. El tratamiento con fosfatasa alcalina produjo un descenso del 80% de la afinidad. La periodación inhibió la actividad enzimática por lo que se hizo un tratamiento suave que redujo la afinidad en un 75%. Por último el tratamiento con neuraminidasa produjo un aumento de la afinidad al doble. Los resultados indican que la unión es mediada por un residuo fosfoazúcar distinto de M6P.

USO DEL EFECTO DE CARBAMILACION SOBRE LA INHIBICION DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR AMP PARA APOYAR LA EXISTENCIA DE UN SITIO ALOSTERICICO PARA FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO ( Use of the carbamylation effect on the fructose 1,6-bisphosphatase AMP inhibition to probe the existence of a fructose 2,6-bisphosphate allosteric site. Soto, M., Ludwig, H. y Hubert, E. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Al analizar la inhibición alostérica por AMP de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) de riñón de cerdo, encontramos que su carbamilación, en presencia de concentraciones altas de fructosa-1,6-bisfosfato (25 mM), forma un derivado activo que ha perdido sólo la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP (Slebe *et al.* J. Prot. Chem. 2, 437, 1983). En vista que hemos sugerido la existencia de un segundo sitio (inhibitorio) para el sustrato, que correspondería mas bien a un sitio de unión para el inhibidor fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>), en este trabajo estudiamos el efecto de Fru-2,6-P<sub>2</sub> sobre la carbamilación selectiva del sitio de unión de AMP.

FBPasa (14  $\mu$ M) se trató con NaN<sup>14</sup>CO (100 mM) a 37°C, pH 7,5, en presencia de Fru-2,6-P<sub>2</sub> (120  $\mu$ M). Se estudiaron la estequiometría de la reacción y algunas propiedades cinéticas de la enzima modificada. La enzima carbamilada mostró poseer todas las características de la FBPasa nativa excepto la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP. No se observó protección con niveles no inhibitorios de sustrato. La pérdida de la respuesta cooperativa hacia AMP se correlacionó con la modificación de un residuo lisina por subunidad.

Nuestros resultados apoyan la idea que la inhibición por exceso de sustrato se debe a la unión del Fru-1,6-P<sub>2</sub> a un sitio alostérico para Fru-2,6-P<sub>2</sub> y confirman que éste sitio se encuentra en íntima relación con el sitio de unión de AMP. Además confirman que la lisina implicada en la respuesta cooperativa hacia el nucleótido, no se encuentra en el sitio de unión del AMP en la enzima. (Financiado por: DID-UACH, S-85-26; FONDECYT, 1199).

CARACTERIZACION PARCIAL DE FOSFORILACION DE PROTEINAS EN PEROXISOMAS. (Partial characterization of protein phosphorylation in peroxisomes). Soto, U., Necochea, C., Skopin, C., Nicovani, S., y Leighton, F. Departamento de Biología Celular, U. Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Hemos detectado fosforilación de proteínas peroxisomales lo que ocurre principalmente en una proteína de membrana de 63 kDa (Eur. J. Cell Biol. 41(S14):26, 1986). La proteína de membrana (Px63) se detecta por electroforesis en gel de polisacrilamida y autoradiografía de peroxisomas obtenidos de un fraccionamiento subcelular de hepatocitos de rata, incubados en presencia de 32P inorgánico. Para evaluar este hallazgo se constató que la marca incorporada es resistente a TCA en caliente y a la extracción con solventes arsénicos, y es removida por proteólisis suave de arsenales enteros o solubilizados, confirmando la naturaleza polipeptídica de Px 63. Por otra parte, tanto en peroxisomas normales como proliferados se detecta incorporación de marca a Px 63 en similar proporción. En presencia de 40  $\mu$ M FCCP la marca en Px 63 es mínima, presumiblemente por la caída detectada en la concentración de ATP celular; en estas condiciones la inhibición de la oxidación de ácidos grasos es moderada en mitocondrias y marcada en peroxisomas. Estas observaciones contribuyen a la caracterización molecular y funcional de este nuevo constituyente peroxisomal.

(Financiado por Proyecto DIUC 79/86 y FONDECYT 1181/85)

GLUCOCORTICOIDES INHIBEN LA POTENCIACION DEL TWITCH INDUCIDA POR DENERVACION (Twitch potentiation after denervation is prevented by glucocorticoid treatment). Soza, M.<sup>1</sup>, Karpati, G.<sup>2</sup>, Carpenter, S.<sup>2</sup>, Rouleau, G.<sup>2</sup>. U. Católica de Chile, Santiago. <sup>2</sup> Montreal Neurological Institute, Montreal. (Patrocinio: N.C. Inestrosa).

Se estudiaron las características del twitch y del tétano en cuatro grupos de músculos soleo de rata en un sistema in vitro. (a) Normal; (b) 13 días post-denervación; (c) 13 días de administración de dexametasona; (d) Combinación de (b) y (c).

El tratamiento con dexametasona aumentó la atrofia de los músculos denervados. La tensión del twitch por gramo de músculo en el grupo denervado, fue muy superior a la del grupo control. Esta potenciación del twitch fue inhibida por el tratamiento con dexametasona.

La amplitud del tétano a 20 Hz fue significativamente menor en músculos denervados comparados con los controles. La administración de dexametasona a este grupo indujo una aún mayor reducción de la tensión tetánica.

La potenciación del twitch post-denervación se debe probablemente a una prolongación del estado activo. Así lo sugiere la prolongación de la duración del twitch. En los músculos denervados y tratados con dexametasona, la disminución de la tensión del twitch se debe probablemente a la pérdida de miosina (filamentos gruesos) observados en electroforesis y en microscopía electrónica (Muscle and Nerve 9 N° 5S, 36.6, 1986).

Financiado por Proyecto DIUC.

MODIFICACION DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE CLOROPLASTOS POR ANIONES CAOTROPICOS. (Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase modification by chaotropic anions). Stein, M. y Wolosiuk, R. Fundación Campomar.

La actividad específica de la fructosa-1,6 bisfosfatasa (FBPasa) de los cloroplastos de espinaca es modulada por un azúcar bisfosfato y un metal bivalente. Experimentos *in vitro* han mostrado que la tiorredoxina o los solventes orgánicos estimulan dicho efecto modificando el  $A_{0.5}$  para la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), en tanto no alteran el  $A_{0.5}$  para el  $Ca^{2+}$ . La correlación entre el incremento de la actividad específica y el carácter hidrofóbico del solvente orgánico condujo a la utilización de aniones caotrópicos para modificar la exposición al solvente de los grupos no polares.

Los aniones caotrópicos estimulan la actividad específica de la FBPasa en presencia de ditiotreitól (DTT), FBP, y  $Ca^{2+}$ . El ordenamiento de estos aniones de acuerdo a la efectividad para la activación responde a la serie liotrópica de Hofmeister ( $SCN^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ). Dicha estimulación resulta de una disminución en el  $A_{0.5}$  para FBP, en tanto no cambia el  $A_{0.5}$  para el  $Ca^{2+}$ . Por otra parte, en la fase catalítica son inhibidores que disminuyen la  $V_{max}$  pero no cambian el  $S_{0.5}$  para FBP o  $Mg^{2+}$ . Experimentos en filtración por gel muestran que no existen cambios en el peso molecular de la enzima. En cambio espectros diferenciales en UV y la exposición de grupos tiolos indican un cambio conformacional de la FBPasa.

Los resultados presentes y los estudios previos sugieren que la activación de la FBPasa de los cloroplastos es el resultado de un cambio en las interacciones hidrofóbicas intramoleculares de la enzima.

CANALES UNICOS DE CALCIO EN MEMBRANAS NATIVAS DE RETICULO SARCOPLASMATICO DE MUSCULO ESQUELETICO. (Single calcium channels in native sarcoplasmic reticulum membranes from skeletal muscle). Suárez, B. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Patrocinio: E. Jaimovich).

Las propiedades eléctricas de las membranas nativas del retículo sarcoplasmático (RS) aisladas de músculo esquelético de conejo se investigaron utilizando la técnica patch-clamp. Las membranas contienen un canal catiónico que se activa en forma espontánea y posee una baja conductancia (5 pS en 200 mM  $CaCl_2$ , soluciones simétricas) selectiva para  $Ca^{2+}$  y  $Ba^{2+}$ . El aumento en la conductancia con  $[Ca^{2+}]$ , entre 50 y 200 mM  $CaCl_2$  (simétrico), se pudo describir mediante una curva hiperbólica regular ( $K_{0.5} = 83$  mM  $V_{max} = 7.9$  pS). La conductancia del canal único obtenida por extrapolación a niveles de  $Ca^{2+}$  fisiológico fue de 0.5 pS. El canal se activa en estallidos o "bursts" seguidos por largos periodos de silencio de hasta 1 minuto. Durante un estallido el canal oscila muy rápidamente con constantes de tiempo en el rango del milisegundo, la duración promedio del estallido depende del voltaje. La aplicación de cafeína (1.6 mM) aumenta significativamente la duración promedio del estallido. Por el contrario, 50  $\mu$ M de dantroleno disminuye significativamente la frecuencia de estallidos, mientras que la nitrendipina (10  $\mu$ M) no produce efecto alguno. Las propiedades funcionales y farmacológicas de este canal indican que puede tener una participación importante en la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RS durante el proceso de acoplamiento excitación-contracción.

ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA INTERACCION DE CLORPROMAZINA CON BICAPAS FOSFOLIPIDICAS. (Structural Studies on the Interaction of Chlorpromazine with Phospholipid Bilayers). Suwalsky, M., Gimenez, L. y Saenger, V. Departamento de Química, Universidad de Concepción.

En nuestro laboratorio hemos estudiado intensivamente las estructuras de bicapas fosfolipídicas por difracción de rayos X, en especial las de L- $\alpha$ -dimiristoil fosfatidil colina (DMFC) y L- $\alpha$ -dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMFE), los que tenderían a ubicarse respectivamente en el lado externo e interno de las membranas de eritrocitos humanos. Aunque ambas estructuras poseen características comunes, DMFE presenta un empaquetamiento molecular mas compacto que DMFC, lo que hace que esta última sea mas sensible a la acción del agua.

La clorpromazina (CPZ) es un neuroléptico ampliamente usado derivado de la Fenotiazina y que afectaría las funciones de membranas celulares.

Mezclas de CPZ.HCl con DMFC y DMFE en diferentes proporciones molares fueron preparadas y estudiadas por difracción de rayos X con distintos contenidos de agua. Los resultados obtenidos indican lo siguiente:

- en ausencia de agua la CPZ no logra alterar las estructuras ni los empaquetamientos moleculares de ninguno de los fosfolípidos estudiados.
- En presencia de agua la CPZ tampoco afecta a la DMFE. Sin embargo, la adición de un 20% de agua al sistema DMFC:CPZ 1:1 modifica la estructura molecular del fosfolípido con posible interdigitación de sus cadenas hidrocarbonadas. En exceso de agua no se observa ninguna reflexión lo que puede deberse a profundos cambios estructurales del fosfolípido.

Esta investigación contó con el apoyo de la Dirección de Investigación (Proyecto 20.13.27).

RECONSTITUTION OF PURIFIED CALCIUM CHANNELS INTO PLANAR LIPID BILAYERS. Talvenheimo, Jane A., Worley, J.F. and Nelson, M.T. \*Dept. of Pharmacology, University of Miami and Dept. of Pharmacology, University of Vermont, U.S.A. (Patrocinio: E. Jaimovich).

Dihydropyridine (DHP) receptors were solubilized and purified from rabbit skeletal muscle transverse tubule (TT) membranes according to Curtis & Catterall (Biochem. 23:2113,1984), to an estimated specific  $^3H$ -PN200-110 binding activity of 2500 pmol/mg protein. The purified DHP receptor contains three polypeptides of molecular weight of 33 kDa, 51 kDa and 140 kDa, corresponding to the three polypeptides identified by Curtis and Catterall (32, 50 and 135 kDa). The purified receptor was reconstituted into phospholipid vesicles, then incorporated into planar lipid bilayers by adding the vesicles to one side (designated *cis*) of a preformed bilayer. Using asymmetric ionic conditions (80 mM  $BaCl_2$  *cis*, 50 mM  $NaCl$  *trans*), two levels of current fluctuation were recorded. The smaller event had a conductance of 8 pS, the larger event had a conductance of 15-20 pS. Both channel types were selective for barium over sodium or chloride, and were observed in the presence or absence of the agonist Bay K 8644. In the presence of 6  $\mu$ M Bay K 8644, nifedipine significantly reduced the probability of the 15 pS purified  $Ca^{2+}$  channel being open. The 15 pS  $Ca^{2+}$  channel appears to be very similar to the 20 pS DHP-sensitive Ca channel identified by Affolter & Coronado in rat TT membranes (Biophys. J. 48:341,1985). The two types of  $Ca^{2+}$  channels observed in the purified receptor preparation were also observed when intact TT membranes were incorporated into planar lipid bilayers, and may be related to the two components of skeletal muscle calcium current described by Beam et al (Nature, 320:168,1986) and Cognard et al (PNAS, 83: 517, 1986). (Supported by grants of the Muscular Dystrophy Association (J.A.T.), the American Heart Association (M.T.N.) and an American Heart Association fellowship (J.F.W.).

PRODUCCION DE COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR POR FIBROBLASTOS DE MEDULA OSEA HUMANA. (Production of extracellular matrix components by bone marrow stromal cells) Tetas, M., Fernández, M. y Barahona, M.C. Dpto. Cs. Básicas, Div. Oriente, Fac. Medicina y Unid. Biol. Celular. INTA. U. de Chile

La proliferación y diferenciación de células troncales hematopoyéticas es regulada por un microambiente conformado por varios fenotipos de estroma, factores de crecimiento y por matriz extracelular (ME). En cultivo, el inicio de la hematopoyesis coincide con la génesis de la ME. A fin de caracterizar y conocer su rol, se estudió la síntesis de colágeno, fibronectina y glicosilaminoglucanos (GAGs) en cultivos de células de estroma de médula ósea humana.

En cultivos de fibroblastos (FMOH, 80% del estroma hematopoyético) se determinó: producción de colágeno por incorporación de prolina tritiada a material colagenasa-sensible y caracterización de tipo genético por cromatografía en DEAE-Celulosa y SDS-PAGE; producción de GAGs por incorporación de glucosamina marcada a material precipitable (CTA, 1%) y caracterización de tipos por tratamiento con enzimas selectas; producción de fibronectina y proteínas glicosiladas por incorporación de glucosamina tritiada y cuantificación y caracterización por ELISA, Sepharosa-Gelatina y SDS-PAGE.

Los FMOH producen y liberan al medio de incubación: a) glicoproteínas, encontrándose fibronectina y un componente similar a 'spreading factor' (MW, 60.000), cuya producción es dependiente de glucocorticoides. b) colágeno I y III, en relación 1:1, siendo la producción de colágeno total, mayor en estados de proliferación que de reposo, condición en la cual la producción es dependiente de glucocorticoides. c) GAGs del tipo condroitín sulfato, ácido hialurónico y heparán sulfato.

Los resultados señalan que en médula ósea humana hay producción de componentes de ME, cuya organización contribuiría al establecimiento de un microambiente hematopoyético. (Financia DIB. B-2173 y FONDECYT 1129-85).

INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACION DE N-ACETIL CISTEINA (Nac) SOBRE LA NECROSIS PAPILAR (NP) RENAL PRODUCIDA POR BROMOETILAMINA (BEA). (Effect of N-Acetyl-cystein on the experimental Bromoethylamine induced renal papillary necrosis).

Thielemann, L., Cerda, M.C., Oberhauser, E., Contador, A., Escudero, J., Fac. de Medicina Depto. Cs. Med. Biol. y Básicas, Div. Cs. Med. Sur. (Patrocinio: M. Vega)

La inyección i.v. única de BEA en ratas produce, en forma reproducible, selectiva NP renal cuyo mecanismo patogénico no ha sido dilucidado. El glutatión reducido (GSH) tisular participa en uno de los más importantes mecanismos protectores celulares frente a efectos tóxicos de algunos xenobióticos. Hemos demostrado que la BEA produce disminución de GSH renal. La administración de agentes que incrementan los niveles de GSH renal (Nac), deberían disminuir la necrosis renal inducida por BEA. Ratas hembras Dornjou de  $\pm$  200g recibieron Nac o su solvente previo a la administración de BEA o suero fisiológico. Se hicieron grupos experimentales: 1) Controles 2) BEA solo 250 mg/Kg (iv) 3) Nac 1.5 mmol/Kg (dosis A) subcutáneo (sc) 4) Nac 6 mmol/Kg (dosis B) ip y sc 5) Nac (dosis A) administrada 2 horas antes de BEA 6) Nac (dosis B) administrada 10 min antes de BEA. A las 72 hrs. post-BEA se hicieron cortes coronales de ambos riñones para estudio histológico. Corroborando experiencias anteriores la BEA a una dosis de 250 mg/Kg produjo necrosis en un 97% de nuestros animales. Los 3 segmentos de la papila renal fueron afectados. El tercio papilar distal presentó mayor grado de necrosis comparado con el tercio medio, y éste a su vez, mayor necrosis respecto al tercio proximal de las papilas. En el grupo 5 no hubo diferencia significativa con respecto al grupo 2. En el grupo 6 se apreció una notable disminución con respecto al grupo 2 en ambos estudios. (I y II). La administración de Nac a la dosis de 6 mmol/Kg junto con BEA logra aminorar en gran medida y en forma significativa, la NP provocada por el xenobiótico. En este modelo, la administración de agentes que incrementan los niveles de GSH renal, protegerían la papila de la NP inducida por BEA.

EFFECTO DE LA REVERSION DE UN SHOCK DE FRIO EN LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS AFECTADAS. (Reversal of a cold shock: its effect on enzymes involved). Tognetti, J., Calderón, P. y Pontis, H.G. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata y Centro de Investigaciones Biológicas (FIBA), Casilla de Correo 1348, 7600 Mar del Plata.

Existen numerosos trabajos que muestran evidencias directas e indirectas vinculando el metabolismo de fructanos con la respuesta de las plantas a un shock de frío. También se ha demostrado que la actividad de la enzima SST que inicia la síntesis de fructanos, es consecuencia de la acumulación de sacarosa, y que en plantas de trigo la actividad de las enzimas sacarosa sintasa aumenta dentro de la media hora de producido el stress.

Si la acumulación de fructanos, y la modificación de la actividad de las enzimas involucradas es consecuencia del shock frío, podría asumirse que cuando el stress desaparece, las plantas van a responder volviendo a la situación que existió antes de producirse el shock. Para determinar si esta es la situación, se sometió a plantas de trigo de 12-15 días de edad crecidas a 24°C, a un shock frío, pasándolas a una cámara a 4°C. Se dejaron a esa temperatura 15 días y luego se las volvió a la temperatura más alta. Se determinaron las actividades de sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, UDPasa, fructan hidrolasa, invertasa, sacarosa sacarosa fructosil transferasa, así como los niveles de sacarosa, fructanos y proteínas. Las mismas fueron medidas tanto antes del shock de frío, durante el período a 4°C y durante las primeras horas del cambio de temperatura. Se encontró que las enzimas que se habían modificado volvían a nivel de los controles mantenidos en frío o ambiente, no debiéndose la variación de actividad a una modificación de las propiedades de las proteínas por el cambio de temperatura, mientras que los niveles de sacarosa y fructanos descienden.

Apoyado por CONICET y CIC.

AI SLAMIENTO DE UN TRANSPOSÓN QUE CODIFICA MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN UNA CEPA PATÓGENA DE *Klebsiella pneumoniae*. (Multiresistance transposon isolated from a pathogenic strain of *K. pneumoniae*). Tolmasky, M.E.<sup>1,2</sup> y Crosa, J.H.<sup>1</sup> Oregon Health Sci. Univ. Portland, Oregon, USA y 2 Inst. Inv. Bioq. "F. Campomar", Bs. As., Argentina.

De una cepa patógena de *K. pneumoniae* se aisló el plásmido pJHCMW1 (11 kbp) el cual poseía determinantes genéticos para resistencia a amikacina (Ak), kanamicina (Km), tobramicina (Tm) y ampicilina (Ap). Dichos genes fueron clonados y caracterizados. El gen que codificaba resistencia a Ap resultó ser similar al de  $\beta$ -lactamasa de Tn3. La resistencia a Ak, Km y Tm estaba codificada en un fragmento de no más de 1.5 kbp y posiblemente un solo gen sea responsable por la resistencia a los tres antibióticos. Para comprobar si los genes de resistencia a antibióticos formaban parte de una secuencia de transposición, una cepa de *E. coli* recA que contenía el plásmido pVK102 (Tetraciclina<sup>r</sup> (Tc<sup>r</sup>), Km<sup>r</sup>) que sería usado como recipiente del transposón y pJHCMW1 fue conjugada con *E. coli* conteniendo pRK2013 (como "helper" de la conjugación) y una cepa recipiente de *E. coli* Nal<sup>r</sup> polA. Ya que pJHCMW1 no replica en mutantes polA, selección con ácido nalidixico, Ap, Ak, y Tc solo permite el crecimiento de *E. coli* recipiente con pVK102, si adquirió genes de resistencia a Ap y Ak. Los plásmidos presentes en las colonias aisladas eran pVK102 con una inserción de 7,55 kbp en diversas posiciones. Estos resultados indicaron que pJHCMW1 posee una secuencia de transposición de 7,55 kbp que tiene los genes de resistencia a Ap, Ak, Km y Tm.

ENZIMAS RAMIFICANTES (Branching enzymes). Tolmasky, D.S. y Krisman, C.R.  
Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires, ARGENTINA

Haciendo uso del nuevo método para medir actividad ramificante, estudiamos varias de estas enzimas provenientes de distintos tejidos, ya sean éstos animales o vegetales. De cada tejido en estudio se extrajo la enzima ramificante y el polisacárido de reserva que le es propio. Tanto las enzimas ramificantes como los polisacáridos fueron purificados parcialmente.

A partir de las enzimas obtenidas se sintetizó, en condiciones adecuadas y controladas, un polisacárido cuyo espectro y grado de ramificación coincide con el del polisacárido extraído del mismo tejido. Estas condiciones de incubación, parecidas a las fisiológicas, son tales que la elongación, es decir la formación de uniones  $\alpha$ 1,4 es lo suficientemente lenta y que la enzima ramificante está en exceso. Así cuando el gluco-oligosacárido  $\alpha$ 1,4 alcanza el largo apropiado para cada ramificante, está puede cortar la unión  $\alpha$ 1,4 y resintetizar una unión glucosídica  $\alpha$ 1,6.

De esta manera nuestros resultados demuestran que el grado de ramificación de un polisacárido es función de la actividad ramificante y no de la relación elongación: ramificación.

HISTONA H<sub>1</sub> EN TRYPANOSOMA CRUZI (H<sub>1</sub> histone in *Trypanosoma cruzi*). Toro, C. y Galanti, N. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La presencia de histona H<sub>1</sub> ha sido cuestionada en *T. cruzi* porque no se ha encontrado una banda que comigre con H<sub>1</sub> de timo, en geles de poli(acrilamida)-SDS. Además, la mayor parte de la cromatina no se condensa durante la mitosis en este parásito.

A partir de cromatina, se extrajo proteínas en ácido perclórico (PCA) 0.75M, correspondiente en eucariontes superiores a histonas H<sub>1</sub> y a HMG. Estas proteínas se fraccionaron por precipitación diferencial en acetona. Las fracciones obtenidas se analizaron en geles de poli(acrilamida)-Tritón DP16-ácido-urea. Por otra parte, de la cromatina de *T. cruzi* se extrajo histonas totales en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4N. Las histonas se analizaron por inmunodifusión contra antisuero anti H<sub>1</sub> de espermios de erizo de mar. Alternativamente, las histonas se separaron por electroforesis en dos dimensiones, se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con el mismo antisuero. Las zonas de inmovilización se detectaron por el sistema biotina-estreptavidina.

Por electroforesis en una dimensión, el extracto en PCA 0.75M mostró una banda de alta movilidad electroforética, probablemente similar a una H<sub>1</sub> descrita en otros protozoos. La inmunodifusión mostró reacción cruzada entre las histonas totales de *T. cruzi* y el antisuero anti-H<sub>1</sub> de espermios de erizo de mar. La técnica de Western mostró reacción positiva con tres proteínas. Una correspondería a H<sub>1</sub> y se debería a reacción cruzada con anti-H<sub>1</sub>. Las otras dos podrían corresponder a histonas H<sub>1</sub>. Estos resultados permiten establecer la presencia de por lo menos una histona H<sub>1</sub>, detectada por diversos métodos, y abren posibilidades para estudiar su participación durante la división de este parásito. (Proyectos B-2365/8613 D.I.B. FONDECYT y UNDP/WB/WHO TDR ID 820599).

DEMOSTRACION DE LA SEGREGACION DE FIBRAS A Y C DEL NERVIJO SINUSAL EN EL NUCLEO DEL TRACTO SOLITARIO. (A demonstration of the segregation of A and C fibers from the sinus nerve in the Nucleus of the Tractus Solitarius). Torrealba, F., Calderón, F. y Claps, A. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

El cuerpo carotideo (CC) de mamíferos es inervado por fibras aferentes de conducción rápida (A, mielínicas) y fibras aferentes lentas (C, amielínicas). Las fibras mielínicas dan origen en el CC a arborizaciones terminales en nido, que contactan 20-60 células glómicas. Los axones C producen arborizaciones con escasos terminales y se relacionan con 5-10 células glómicas. En el presente trabajo describiremos la proyección de ambos tipos de axones al núcleo del tracto solitario (NTS). En gatos adultos se extirpó un ganglio petroso (el cual contiene los somas de ambos tipos de fibras), y después de sobrevividas de 3 a 10 días, se estudió en el NTS la degeneración walleriana, con la técnica de Fink-Heimer. Las fibras finas tienen un curso temporal de degeneración más precoz, y se distribuyen en el subnúcleo comisural. La degeneración gruesa estaba en los subnúcleos ventrolateral y dorsolateral y apareció degeneración mixta en los subnúcleos dorsal e intersticial. Estas observaciones permiten concluir que las fibras C barorreceptoras y quimiorreceptoras del nervio sinusal ocupan diferentes territorios en el NTS que las fibras A. Los hallazgos experimentales sobre la segregación de axones finos y gruesos en el NTS son apoyados por las observaciones de la distribución de mielina, la cual está ausente en el subnúcleo comisural. Asimismo, la presencia en este subnúcleo de fibras con reacción positiva para la fosfatasa ácida resistente a fluor apoya la hipótesis de que hay segregación en el NTS de axones A y C. Esta enzima está presente en fibras C de las raíces dorsales y en la sustancia gelatinosa de la médula espinal. Financiado por proyectos DIUC 95/85 y Fondecyt 1193.

TEMPERATURA, pH Y AGENTES DISOCIANTES MODIFICAN LA INMUNORREACTIVIDAD DE PRL HIPOFISIARIA DE RATA. (Temperature, pH and dissociating agents modify immunoreactivity of rat hypophysial PRL). Torres, A.I., Prada, M.I. y Aoki, A.

Centro de Microscopia Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Estudios recientes han demostrado que la prolactina (PRL) polimérica es almacenada selectivamente en gránulos secretorios. Este contenido hormonal no es detectado en dosajes de PRL hipofisiaria (PRLh) por radioinmunoanálisis (RIA). En este trabajo se estudió la influencia del pH, temperatura y distintos agentes disociantes sobre la inmunorreactividad de la PRLh de ratas hembras estrogenizadas. Las glándulas fueron homogeneizadas en Tris-ClH 0.05M pH 7.0 y luego incubadas durante 3 h en los medios y condiciones que se detallan en la tabla. Las muestras se centrifugaron a 10.000 x g; el dosaje de PRL por RIA se realizó en los sobrenadantes. Los pellets fueron procesados para microscopia electrónica. La tabla muestra los valores de PRLh (ug/ml):

Medios extractivos	pH	Temp. 4°C	Temp. 30°C
TRIS-ClH 0.05M	7.0	8,50 ± 0,5	9,33 ± 1,15
TRIS-ClH 0.05M	10.0	32,22 ± 1,92	28,00 ± 1,73
Ditiotreitól 0.1mM	10.0	25,28 ± 2,92	28,38 ± 2,08
Glutation red. 10mM	10.0	20,56 ± 1,73	24,00 ± 3,6
Urea 2.5 M	7.0	36,50 ± 2,18	31,83 ± 2,84
Urea 2.5 M	10.0	55,83 ± 3,82	41,67 ± 3,78

El dosaje de PRLh es mayor a pH alcalino. Las sustancias tóxicas no afectan la inmunorreactividad de PRLh. La extracción de PRL con urea 2,5 M aumenta significativamente en ambos pH y a menor temperatura. Los pellets muestran resultados comparables a los obtenidos en el RIA; a mayor extracción menor es la cantidad de gránulos secretorios observables. El medio de extracción más efectivo es urea 2,5 M a pH 10,0 incubado a 4°C. La urea tiene un efecto disociante del polímero de PRLh ya que permite exponer mayor cantidad de sitios antigénicos detectables por RIA.

TYMpanoCTOMYS BARRERAE (OCTODONTIDAE): UN ROEDOR ESPECIALISTA. Tympanoctomys barrerae: a specialist rodent Torres-Mura, J.C., Lemus, M.L. y Contreras, L.C. Depto. Biología & Química, Universidad de Talca.

T. barrerae habita en formaciones desérticas halófilas y se conoce solo de tres localidades en Mendoza, Argentina. Esta especie presenta características de roedor de desierto como cola larga, andar bipedal, grandes bulas, etc. Esta convergencia morfológica lleva a preguntarse si esta especie es granívora, como aquellas especies con las que converge, o es herbívoro generalista como otros roedores presentes en el Desierto de Monte.

Se estudian los hábitos alimentarios de T. barrerae y también los de Microcavia australis, Ctenomys mendocinus y Eligmodontia typus. Las dietas se determinan por examinación microhistológica de fecas. Para cada espécimen se realizó un análisis cualitativo y cuantitativo de las dietas.

Tympanoctomys es exclusivamente herbívoro y se alimenta básicamente de "apén", Heterostachys ritteriana: 95% en Septiembre y 92% en Abril. La especialización dietaria queda corroborada al encontrar que el 100% de los animales muestreados presentaba "apén" en su dieta. Por otra parte M. australis es un herbívoro generalista, Ctenomys se alimenta de gramíneas y E. typus es omnívoro, con un 26% de insectos en su dieta.

Entre Tympanoctomys y tanto Ctenomys como Eligmodontia, casi no existe sobreposición dietaria. En cambio con Microcavia ésta alcanza a casi un 50%. Además, se ha observado en terreno que T. barrerae es desplazado de ciertos lugares por el ubicuo Microcavia. Estas interacciones y la alta especialización dietaria permitirían explicar la restringida distribución de este octodóntido.

Parcialmente financiado por Dirección de Investigación, Universidad de Talca.

PRESENCIA DE CUERPOS MULTILAMELARES EN LA GASTRULA DE DE AVE. (Presence of multilamellar bodies in bird gastrula) .. Torres, P.F.; Barberi, F.D. Depto. Biología del Desarrollo (INSIBIO). CONICET - Universidad Nacional de Tucumán, Rep. Argentina.

Distintos territorios celulares del embrión de pollo en el estadio V según la tabla de Hamburger y Hamilton (1951) fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pusieron en evidencia la presencia de cuerpos multilamelares únicamente en células de la prolongación cefálica y del territorio neural presuntivo. Fueron observados en relación con diversos organoides citoplasmáticos tales como las mitocondrias, los gránulos vitelinos y el retículo endotelial. Fueron también detectados en el ámbito nuclear, principalmente en el área periférica, exhibiendo un gran polimorfismo y un contenido de naturaleza amorfa. Su evidenciación mediante distintos procedimientos de fijación, así como el hecho de que fueron ya detectados en una notable variedad de células de distintas especies, permite argumentar que no se trataría de artefactos de técnica.

Teniendo en cuenta que estas estructuras fueron reconocidas en las células implicadas en el proceso de inducción neural, se postula como hipótesis de trabajo su eventual intervención en el transporte de las señales químicas que determinan el proceso de neuralización.

EFFECTOS DE UN FORMULADO DE PARATHION SOBRE LA FERTILIZACIÓN DEL ERIZO DE MAR. (Effects of formulated parathion on sea urchin fertilization Tortorelli, M.C., Hernández, D.A., Lombardo, R.J., Ferrari, L. y Del Giorgio, P. Dpto. de Cs. Básicas, Universidad Nacional de Luján y Dpto. de Cs. Biológicas, Universidad de Buenos Aires.

Los organismos acuáticos resultan afectados por residuos de plaguicidas en distintas etapas de su ciclo de vida, influyendo, en última instancia, sobre el crecimiento poblacional. El propósito de este trabajo fue evaluar la incidencia de un formulado con 100g/L de parathion (PP) sobre la fecundación y su posible implicancia en el crecimiento poblacional.

Adultos de Pseudochinus magellanicus (Philippi) fueron colectados en el canal Beagle (Argentina). La obtención de gametas y la fecundación "in vitro" se realizaron mediante técnicas que evitan la poli-espermia. Se ensayaron 4 condiciones experimentales: a. fecundación sin exposición previa al PP, b. fecundación de oocitos (ooc) expuestos previamente a distintas concentraciones de PP durante 1 h, c. fecundación con espermatozoides (spz) expuestos previamente a distintas concentraciones de PP y d. fecundación con ooc y spz previamente expuestos a PP. El rango de concentraciones utilizados fue de 1 a 64 ppb. El desarrollo embrionario fue detenido con formal 2% dos hs des-pués. Los experimentos control también se efectuaron por duplicado y en condiciones controladas de T°C, pH y salinidad. La CEO se estimó con el método probit.

Se registró un marcado efecto inhibitorio del PP sobre la fecundación. Las CEO fueron: a: 92.2, b: 25.9, c: 13.5 y d: 0.9 ppb. Teniendo en cuenta estos resultados y la proporción de ooc fecundados que alcanza el estadio pluteus en condiciones control (75-88%) y de ellos los que sufren metamorfosis exitosa, es razonable sospechar que bajas concentraciones de PP (menores a 100 ppb) en el mar pueden provocar un marcado efecto secundario sobre el crecimiento poblacional del erizo de mar.

EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN PROTEICA PRE Y POS-NATAL SOBRE EL CONTENIDO DE GANGLIOSÍDIOS Y SIALOPROTEÍNAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS. (The effect of pre- and post natal proteic undernutrition on the gangliosides and sialoproteins content in rat hypothalamus). Treis Trindade, V.M., Perry, M.L.S., Gamallo, J.L. e Bernard, E.A. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências, U.F.R.G.S., Porto Alegre, R.S., Brasil.

A desnutrição proteica provoca alterações estruturais e bioquímicas no cérebro, entre as quais, redução na proliferação dendrítica e mielinização. Há evidências de que gangliosídeos e sialoglicoproteínas estejam envolvidas na adesão sináptica e atuem como receptores para os neurotransmissores. Em ratos, o período mais susceptível aos efeitos permanentes da restrição proteica se estende desde uma semana antes do nascimento até a terceira semana pós-natal. Este trabalho mostra o efeito da desnutrição proteica pré-natal (desde o primeiro dia de gestação) e pós-natal (a partir do nascimento) sobre o hipotálamo. O peso dos hipotálamos aumenta ligeiramente até os dez dias de idade e com as duas desnutrições apresenta diminuição a partir dos dez dias após o nascimento. O conteúdo de gangliosídeos cresce até os dez dias de idade atingindo um platô. Com a desnutrição pré-natal aos dez dias se verifica uma redução no conteúdo de gangliosídeos enquanto que com a desnutrição pós-natal este efeito é retardado. Quando se expressa a concentração de gangliosídeos por mg de tecido se observa uma diminuição aos 15 dias de idade de nos ratos desnutridos pré-natalmente, tornando a igualar-se aos 20 dias. As sialoglicoproteínas apresentam um lento aumento com a idade e se observa que a desnutrição pré-natal afeta o seu conteúdo aos 20 dias após o nascimento. Esta abordagem poderá contribuir na avaliação das alterações bioquímicas e na interpretação das mudanças comportamentais dos ratos desnutridos.

Auxílios Financeiros: CNPq, FINEP, PROPESP/UFRGS.

MAPA DE RESTRICCIÓN DE ADENOVIRUS 35 AISLADO DE PACIENTES CON INMUNOCOMPROMISO. (Restriction mapping of Adenovirus 35, isolated from immunocompromised hosts). Valderrama, G. y Horwitz, M.S. Department of Microbiology and Immunology. Albert Einstein College of Medicine. (Patrocinio O. León).

Adenovirus de serotipos comunes han sido aislados de pacientes con inmunidad alterada, particularmente Adenovirus (Ad) 34 y 35. De estos Ad35 es interesante, debido a que es un Adenovirus nuevo y solo ha sido aislado de pacientes con severa inmunosupresión. En este laboratorio se ha reportado el aislamiento de estos Adenovirus en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. En este trabajo se presenta la construcción del mapa de restricción de Ad35 utilizando las enzimas: BAMHI, EcoRI, PstI, SmaI y HpaI.

Plasmidios conteniendo fragmentos de DNA del Ad7 fueron radiactivamente marcados y usados como pruebas de hibridación con fragmentos de DNA de Ad35 obtenidos por digestión con enzimas de restricción e inmovilizados en Gene Screen. De esta manera se determinó la posición de algunos de los fragmentos de DNA que presentan homología con Ad7. Los fragmentos de DNA terminales de cada extremo, fueron determinados utilizando el sistema de replicación de DNA *in vitro*.

Nuestros resultados indican que la región que codifica para el polipeptido de envoltura es diferente a la encontrada en otros tipos de Adenovirus del mismo grupo. Este nuevo método puede ser aplicado en la construcción de otros nuevos mapas de Adenovirus.

DESARROLLO DE UN NUEVO METODO POR HPLC PARA SEPARAR Y CUANTIFICAR ANDROSTENEDIONA Y SUS PRODUCTOS DE OXIDACION MICROSOMAL (A new HPLC method to separate and quantify Androstenedione and its microsomal oxidative products). Valdés, E. y Gil, L. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Androstenediona (A), es un agente androgénico débil que circula en la sangre periférica, actuando como prohormona para la síntesis de potentes andrógenos en sitios extraglandulares. La (A) es hidroxilada regio y estereoespecíficamente por diferentes especies de Citocromo P-450 en varias posiciones del esqueleto esteroide. No se sabe con exactitud cuantas isoenzimas de Citocromo P-450 participan en el metabolismo oxidativo de (A).

En este trabajo, presentamos una nueva técnica desarrollada en nuestro laboratorio para separar y cuantificar (A) y sus productos de oxidación por HPLC. El método utiliza una columna de Lichrosorbdiol que separa en fase normal, el sustrato y sus productos de oxidación cuando se utiliza como fase móvil una mezcla de n-hexano e iso propanol. (A) y sus metabolitos eluyen con los siguientes tiempos de retención: (A) 15.30 min.; Testosterona (T) 17.20 min.; 6 $\beta$ -hidroxi Androstenediona (6 $\beta$ -OHA) 20.15 min.; 2 $\beta$ -OHA 21.8 min.; 2 $\alpha$ -OHA 22.50 min.; 7 $\alpha$ -OHA 24.30 min.; 16 $\alpha$ -OHA 26.30 min.; 11 $\alpha$ -OHA 27.20 min.; 6 $\alpha$ -OHA 27.40 min. y 15 $\alpha$ -OHA 29.20 min.

Esta técnica es rápida, no requiere el uso de gradientes y utiliza sistemas simples de HPLC. La hemos aplicado para estudiar el metabolismo hepático de (A) en ratas macho de 35 días, cepa Wistar. Microsomas incubados con NADPH y oxígeno molecular producen: (T), 6 $\beta$ -OHA, 2 $\beta$ -OHA 7 $\alpha$ -OHA y 16 $\alpha$ -OHA. La gran sensibilidad y resolución del método facilita las determinaciones en tejidos extrahepáticos de bajo contenido de Citocromo P-450 tales como, riñón y pulmón.

Financiado por proyecto B: 1970-8635 del DIB, Universidad de Chile y 8025 del FONDECYT.

DIFERENCIAS EN EL NIVEL DE LIPOPEROXIDACION, CONTENIDO DE CITOCROMO P-450 Y CONSUMO DE OXIGENO MICROSOMAL ENTRE EL LÓBULO DERECHO E IZQUIERDO DEL HIGADO FETAL DE LA OVEJA. (Differences in the lipid peroxidative status, cytochrome P-450 content and microsomal oxygen consumption between right and left lobes of the liver in fetal sheep). Valenzuela A<sup>1</sup>, Garrido A<sup>1</sup>, Cañas P<sup>1</sup>, Espinoza M<sup>2</sup>, Germaín A<sup>2</sup>, Llanos A<sup>2</sup>. 1 Laboratorio de Bioquímica Farmacológica, INTA. 2 Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología Perinatal. Fac. Medicina. U. de Chile.

La existencia del ductus venosus en el hígado fetal de mamíferos determina que el aporte de oxígeno sanguíneo sea menor en el lóbulo derecho. Esta situación podría implicar un diferente manejo bioquímico del metabolismo del oxígeno en ambos lóbulos hepáticos. Con este propósito se evaluó los niveles basales de lipoperoxidación, citocromo P-450 y consumo microsomal de O<sub>2</sub>, así como algunos parámetros relacionados con la protección celular contra el stress oxidativo, en ambos lóbulos del hígado fetal de la oveja. El lóbulo izquierdo presenta mayores niveles de lipoperoxidación (expresada como malondialdehído), consumo de oxígeno microsomal y una cantidad mayor de citocromo P-450. Respecto a los lóbulos homólogos de la madre, solo el contenido de citocromo P-450 es mayor en estas. Los niveles de actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa no son diferentes entre ambos lóbulos del feto ni tampoco entre estos y aquellos de la madre. El contenido de glutatión reducido es significativamente menor en los lóbulos fetales. Se plantea que el lóbulo izquierdo del hígado fetal estaría sometido a un mayor stress oxidativo que el derecho debido a la mayor oxigenación que recibe. El sistema microsomal de este lóbulo presentaría un cierto grado de desacoplamiento, derivando su actividad hacia la formación de especies activas del oxígeno involucradas en el inicio de la lipoperoxidación celular. Estas diferencias metabólicas podrían tener importancia en la etiología de algunas anomalías hepáticas del recién nacido. (Financia DIB. Proy. B-2399-8613 U. de Chile)

ALTERACION DE ACTIVIDAD METABOLICA EN CELULAS DE LEYDIG DESENSIBILIZADAS. (Modification of some metabolic parameters in desensitized Leydig cells). Valladares, L.E., Ronco, A.M., y Pino A.M. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, Universidad de Chile.

Una dosis única farmacológica de LH/hCG (100 UI) produce una alteración en la capacidad funcional de las células de Leydig, fenómeno conocido como desensibilización.

En este trabajo se estudió el efecto de una dosis desensibilizante de LH/hCG sobre algunos parámetros moleculares de la célula de Leydig, luego de 1, 2, 3, 6 y 12 días después de la inyección.

Ratas adultas fueron tratadas con 100 UI de LH/hCG y se sacrificaron a los tiempos señalados después de la inyección. Las células de Leydig se purificaron a partir de tejido intersticial por gradiente de metrizamida. En estas células se determinó: número de receptores para LH/hCG por unión de <sup>125</sup>I-HCG, síntesis de testosterona al cabo de 3 hr. de incubación y síntesis de RNA por incorporación de <sup>3</sup>H-uridina a material ácido insoluble. Posteriormente estos RNA fueron analizados por cromatografía de afinidad para identificar fracciones ricas en poli-(A).

Los resultados obtenidos indican un desaparecimiento del número de receptores para gonadotropinas, hecho que se hace evidente desde el 1er día después de la inyección. La síntesis de testosterona en las células desensibilizadas se ve disminuida frente a un segundo estímulo "in vitro" de hCG. Tanto el número de receptores como la síntesis de Testosterona se encuentran recuperadas en un 80% , 12 días después de la inyección.

La síntesis de RNA disminuye paulatinamente desde el 1er día después de la inyección siendo esta disminución máxima, al cabo de 2 días. El análisis de estos RNA indica que no hay una disminución preferencial de la síntesis de los RNA poli-(A).

Estos antecedentes indican que la desensibilización estaría asociada con fenómenos transcripcionales, existiendo una correlación entre la disminución de RNA y el número de receptores. Fin. DIB, B-2020-8633, U. de Chile.

EFFECTOS DE LA VITAMINA D<sub>3</sub> Y ESTIGMASTEROL SOBRE LA SINTESIS DE CALMODULINA EN RAIZ. LOCALIZACION Y DEPENDENCIA DEL CALCIO (Effects of vitamin D<sub>3</sub> and stigmasterol on root calmodulin synthesis. Localization and calcium dependence). Vega, M.A. y Boland, R.L. Departamento de Biología, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca.

Estudios previos mostraron que la vitamina D<sub>3</sub>, a concentración 1 nM, induce la síntesis *de novo* de calmodulina (CAM) en raíces de *Phaseolus vulgaris in vitro*. Se realizaron experimentos para obtener información sobre la localización de los efectos y modo de acción del esteroide. Los estudios se efectuaron con raíces primarias de *P. vulgaris* cultivadas en medio Shenk-Hildebrandt a 28 °C en la oscuridad. Los cultivos fueron tratados con vitamina D<sub>3</sub> 10<sup>-9</sup> M durante 2 h. Se midió la síntesis de CAM en distintas porciones de la raíz por el método de doble marcación de proteínas con <sup>3</sup>H-leucina (vitamina D<sub>3</sub>) y <sup>14</sup>C-leucina (control) y posterior separación por electroforesis SDS-PAGE o cromatografía de afinidad en columnas de fenotiazina-agarosa. Se observó que la estimulación de la síntesis de CAM por vitamina D<sub>3</sub> está localizada en el extremo más apical de la raíz (0-5 mm desde el ápice). Mediante técnicas de ligado *in vivo* de fenotiazinas fluorescentes se determinó que en esta zona la CAM se localiza principalmente en las células de la coifa y del meristema cortical. En porciones más distantes del ápice la CAM se ubica selectivamente en los elementos del xilema. El estigmasterol (10<sup>-9</sup> M), un esteroide mayoritario en vegetales, produjo efectos similares a los de vitamina D<sub>3</sub> en la síntesis de CAM. La acción de los esteroides fue simulada por el ionóforo de Ca<sup>2+</sup> A23187 y abolida cuando el tratamiento con los mismos se realizó en medio libre de Ca<sup>2+</sup> y en presencia de 2 mM EGTA. Estos resultados sugieren que los efectos de vitamina D<sub>3</sub> y estigmasterol sobre la síntesis de CAM están mediados por la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la raíz.

RELACION ENTRE EL SISTEMA ADENILATO CICLASA Y SINTESIS DE ESTEROIDES DURANTE LA FASE LUTEA HUMANA (Relationship between adenylate cyclase system and steroids synthesis throughout human luteal phase).

Vega, M., Navarro, V., Castro, O. y Devoto, L. Depto. Cs. Bás., Depto. Obst/Ginecol., Div. Cs. Méd. Sur, Inst. Inv. Cíñ., H. Paula Jaraquemada, Universidad de Chile.

Recientemente se ha descrito que el sistema adenilato ciclasa (AC) de las membranas lúteas está constituido por 3 subunidades: Receptor (R), Regulatoria (N), Catalítica (C), y que en respuesta a LH/HCG aumenta el cAMP intracelular y la progesterona (P<sub>4</sub>). Hemos demostrado que *in vitro* HCG estimula significativamente la síntesis de P<sub>4</sub> y Estradiol (E<sub>2</sub>) en Cuerpo lúteo (CL) intermedio (I) y en menor grado, en CL tardío (Ta), pero no en CL temprano (Te); sin embargo, dbcAMP, toxina cólera (TC) y forskolin (FK) estimulan P<sub>4</sub> y cAMP en CL Te. Este trabajo evalúa el comportamiento *in vitro* del sistema AC de CL humano a lo largo de la fase lútea en relación a la síntesis de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>. Los CL fueron obtenidos de pacientes sometidas a este rritización tubaria. La edad del CL se determinó por FUR, niveles en plasma de LH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>; biopsia de CL y endometrio. Los cortes fueron incubados 3 hrs. en Krebs/HCO<sub>3</sub>, glucosa y BSA, pH 7.4 con O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:95/5 a 37°C, con o sin HCG (10 UI/ml); dbcAMP (1 mM); TC (10 ug/ml) o FK (50 uM). Se midió P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> en medio y tejido por RIA. Los resultados demuestran que en CL I y Ta existe un mayor aumento de P<sub>4</sub> por HCG que en CL Te (p<0.005). DbcAMP, TC y FK estimulan significativamente (vs Control) P<sub>4</sub> en CL Te (p<0.05), I (p<0.01) y Ta (p<0.05); al E<sub>2</sub> en CL I (p<0.01) y Ta (p<0.05). El incremento de P<sub>4</sub> es de 2.2; 4.0 y 2.8 veces y el de E<sub>2</sub> de 1.2; 1.8 y 2.7 veces en CL Te, I y Ta respectivamente. Este modelo experimental sugiere la existencia del sistema AC durante toda la fase lútea siendo su respuesta dependiente de la edad del CL y probablemente la responsable del diferente perfil de síntesis de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>, controlando de preferencia P<sub>4</sub>.

Rockefeller GAPS 8523 y DIB M-1685.

EFFECTO DE LA HERBIVORIA EN LA ABUNDANCIA DE LAS ALGAS DE POZAS INTERMAREALES (Herbivory effect on the tide-pools algae abundance). Vega, R. y Moreno, C. Laboratorio de Ecología, Depto. CCNN, P. Universidad Católica Sede Temuco - Instituto de Ecología, Universidad Austral de Chile.

En la zona intermareal de la Reserva Marina de Mhuín (X Región) de la Universidad Austral, las pozas altas se encuentran dominadas por clorófitas ulvoides y las bajas por algas crustosas calcáreas. Se pregunta ¿Qué factores, bióticos o abióticos, regulan la persistencia y dominancia de las algas en estas pozas?

Entre Agosto 1982 y Enero 1984 se realizó en Mhuín una serie de experimentos para determinar en las pozas altas y bajas, el efecto sobre la abundancia de las algas de: a) competencia entre algas, b) herbivoría, c) interacción de estos dos factores y d) interacción de factores bióticos y abióticos. Se estimó % de cobertura de las algas, densidad de la fauna y biomasa de ambas.

En las pozas intermareales de Mhuín pueden persistir clorófitas, rodófitas y feófitas, que estarían reguladas por factores biológicos: competencia entre algas y herbivoría. Las clorófitas ulvoides son especies colonizadoras iniciales dominantes competitivas en las pozas. Los herbívoros presentes en las pozas altas (*Siphonaria*, *Collisella*, *Littorina*) son poco eficiente en la regulación de la abundancia de las algas; al contrario de los de las pozas bajas, principalmente *Fissurella*.

La baja o alta intensidad de una perturbación como es la herbivoría genera dos estructuras extremas para un mismo habitat, así en las pozas intermareales se reclutan ulvoides pioneras que ante una baja intensidad de herbivoría, dominan por exclusión competitiva, persistiendo el estado ulvoide al detenerse la sucesión (pozas altas). Las macroalgas foliosas desaparecen ante una alta intensidad de herbivoría dominando las algas crustosas calcáreas (pozas bajas).

Financiado por Proyectos: 2.83.3. U. Católica Temuco, RS 82-7 UACH y 1067-83 Fondo Nacional de Ciencias.

VESICULAS DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE MUSCULO DE *Balanus* PARA EL ESTUDIO DE CANALES IONICOS. (Plasma membrane vesicles from barnacle muscle for the study of ion channels). Vergara, C. y Bacigalupo, J. Depto. Biología, Fac. Ciencias, Universidad de Chile.

Datos macroscópicos y de patch clamp sugieren que en músculo de *Balanus* la mayoría de los canales Ca<sup>2+</sup>, cuyas propiedades nos interesa estudiar, se encuentran en invaginaciones de la membrana plasmática. El método de patch clamp no es adecuado para registrar de estas regiones por lo tanto decidimos usar un método alternativo. Este consistió en producir vesículas de membrana plasmática en donde se puede estudiar canales iónicos. Se incubaron 3-10 células de *Balanus* en agua de mar artificial (AMA) diluida a la mitad conteniendo 10 mg/ml de colagenasa por 2 hrs. Se usó AMA diluida con el objetivo de hacer más accesible la membrana de las invaginaciones. Este tratamiento produjo vesículas de membrana de 30-150u que se utilizaron en experimentos de patch clamp o fueron agregadas a un sistema de registro de canales en membranas artificiales. En todos estos casos fue posible registrar corrientes unitarias. Entre los distintos canales observados destacamos un canal de 12 ps que transporta iones Ba, cuya actividad es bloqueada por iones Cd lo que sugiere que es un canal de Ca.

Financiado por DIB-B 1986-8523

ACTIVIDAD Y LOCALIZACION SUBCELULAR DE AMINOTRANSFERASA DE AMINOACIDOS RAMIFICADOS EN ESPERMATOZOIDES DE RATA (Activity and subcellular localization of branched-chain aminoacid aminotransferase in rat spermatozoa) Vermouth, N.T., Montamat, E.E. y Blanco, A. Cátedra de Química Biológica, Facultad de C. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Estudios previos en este laboratorio habían demostrado que la isozima X de lactato dehidrogenasa (LDH X o C<sub>4</sub>) de ratón utiliza como sustratos  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada producidos por transaminación de leucina, valina e isoleucina. En preparaciones de testículo, se comprobó que la aminotransferasa de aminoácidos ramificados (ATAR) posee la misma distribución subcelular que que LDH X (en citosol y en matriz mitocondrial de organelas similares a las existentes en la pieza media de espermatozoides). Estas evidencias llevaron a postular el funcionamiento de un sistema conmutador de H que utiliza la cupla redox  $\alpha$ -OH-ácido/ $\alpha$ -cetoácido de cadena ramificada. La efectiva operación de esta "lanzadera" ha sido demostrada en sistemas reconstituidos in vitro. Dichos estudios se realizaron con mitocondrias "tipo esperma" aisladas de testículo total pues no es posible obtenerlas de espermatozoides. Para comprobar si la situación es la misma en las gametas se ha analizado actividad de ATAR y distribución subcelular de LDH X y ATAR en espermatozoides aislados de epidídimo de rata por el método indirecto de tratamiento con digitonina (D). La actividad ATAR es de 15,65  $\mu$ moles/10<sup>9</sup> células; 0,27  $\mu$ moles/mg de proteína. Las gametas enteras tratadas con digitonina liberan hasta 70% de su actividad ATAR y LDH X a concentraciones de 0,2mg D/mg proteína y recién a 0,7mg D/mg proteína comienza a liberarse el resto. Este resultado confirma la distribución dual, en citosol y mitocondrias, para LDH X y ATAR de espermatozoides y la posibilidad de su participación en el sistema lanzadera propuesto.

LOCALIZACION ESTRUCTURAL DE ISOFORMAS DE ACTINA EN EL ELECTROCITO DE DISCOPYGE TSCHUDII. (Structural localization of actin isoforms in *Discopyge tschudii* electrocytes). Vidal, A., Prado Figueroa, M. y Barrantes, F.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Universidad Nacional del Sur y CONICET, 8000-Bahía Blanca, Argentina.

La actina es un componente de las membranas enriquecidas en receptor colinérgico nicotínico (AChR), distinguible de otras proteínas periféricas de membrana. Con el objeto de establecer eventuales relaciones estructurales entre el AChR y la actina se efectuaron estudios inmunohistoquímicos del órgano eléctrico de *Discopyge tschudii* pez de la fam. *Torpedinidae*, y se utilizaron técnicas de fluorescencia con falacidina, una toxina que tiene la propiedad de unirse con alta afinidad a la forma filamentosa (F) de la actina, y dos líneas de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-actina (QAB<sub>1</sub> y QAB<sub>2</sub>) obtenidas del músculo pectoral de codorniz. Se diferenció la membrana ventral de la no innervada mediante  $\alpha$ -cobrotoxina conjugada con isotiocianato de tetrametil rodamina (ITC-TMR). El QAB<sub>1</sub> mostró una fluorescencia puntual a nivel de las terminaciones nerviosas; el QAB<sub>2</sub>, en cambio, se distribuyó en todo el citoplasma, en concordancia con las observaciones de Cáceres y col. (1983) en neuronas. La falacidina reconoció a la F-actina exclusivamente en la cara dorsal del electrocito. De los presentes resultados puede concluirse que coexisten varias isoformas de la actina en el electrocito: 1) la isoforma detectable por falacidina en su cara dorsal, de localización discreta; 2) la reconocible por el mAb QAB<sub>2</sub>, que podría corresponder a la evidenciada por Changeux y col. (1986) (G-actina citoplasmática); 3) la actina presumiblemente de origen neural, que detecta el mAb QAB<sub>1</sub>, posiblemente análoga a la descrita por Witzemann y col. (1985) en el electrocito. La actina detectable por métodos bioquímicos en las membranas ricas en AChR parece no corresponder a ninguna de las isoformas descritas aquí por métodos inmunocitoquímicos, o se halla en cantidades no detectables por estos métodos.

Mini-Mutac, UN NUEVO VECTOR PARA LA EXPRESION DE GENES EN PROCARIOTAS. (Mini-Mutac, a new vector for gene expression in prokaryotes). Viale, A., Gramajo, H. y de Mendoza, D. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos\* y Departamento de Microbiología#, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

La expresión regulada de genes clonados en *E. coli* es realizada mediante la utilización de vectores de expresión, plásmidos multicopia que poseen promotores regulables seguidos de sitios de restricción en los cuales se inserta el gen que se desea expresar. Esto requiere un laborioso manipuleo in vitro del material genético.

Nosotros hemos construido un nuevo vector para la expresión regulada de genes en *E. coli* clonando el promotor tac en el extremo derecho del mini-bacteriófago transposable MudII1681. Dicho bacteriófago fue integrado al cromosoma de una cepa de *E. coli* lisógena para un Mucts auxiliar. Esta bacteria fue transformada con plásmidos conteniendo genes carentes de promotores reconocibles por la RNA polimerasa de *E. coli*. La expresión de estos genes fue observada en cepas receptoras que fueron transducidas a partir de los lisados mixtos obtenidos luego de la inducción a 42°C de la bacteria transformada. De esta forma se logró la expresión de genes que codifican resistencia a tetraciclina y a cloranfenicol, del gen de la galactosidasa de *E. coli* y la de genes heterólogos como el de la RubisCO de *R. rubrum*.

La utilización de mini-Mutac como promotor portátil in vivo ofrece una nueva alternativa para la expresión regulada de genes clonados en plásmidos.

ESTUDIOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE DESFERIOXAMINA (DF) EN SISTEMAS BIOLÓGICOS. (Studies on the antioxidant capacity of desferrioxamine in biological systems). Videla, L.A., Villena, M.I., Salgado, C. y Canales, P. Unidad de Bioquímica, Dept. Ciencias Biológicas, Fac. Medicina-División Occidente, Universidad de Chile.

La DF es un agente quelante de hierro (Fe), usado en el tratamiento de sujetos con sobrecarga de este metal. Mediante este mecanismo de acción, DF inhibiría la producción de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o del radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) por Fe y sus consecuencias lipoperoxidativas (LP). Este trabajo estudia la capacidad antioxidante de DF en sistemas biológicos bajo condiciones de LP basal e inducida.

Se estudió el efecto de diferentes [DF] sobre: a) quimioluminiscencia (QL) basal e inducida por Fe y el consumo de O<sub>2</sub> (QO<sub>2</sub>) asociados a la autoxidación de homogenizados de cerebro de rata, b) QO<sub>2</sub> inducido por t-butil hidroperóxido (t-BHP) en suspensiones de eritrocitos de rata y c) el QO<sub>2</sub> en el sistema de perfusión hepática. DF presenta un efecto inhibitorio de la QL y QO<sub>2</sub> basal de homogenizados de cerebro, con una K<sub>50</sub> de 0,63 y 0,52  $\mu$ M respectivamente. En este sistema, la actividad pro-oxidativa del Fe es eliminada a una relación molar DF/Fe = 0,65. El QO<sub>2</sub> inducido por t-BHP en eritrocitos es inhibido en un 88% con una K<sub>50</sub> = 210  $\mu$ M. DF agregada al sistema de hígado perfundido disminuye progresivamente el QO<sub>2</sub>, con una respiración sensible a DF máxima de 268 nmol/g/min y K<sub>50</sub> = 125  $\mu$ M.

Los resultados indican que DF es un potente antioxidante, tanto en sistemas de baja como de alta velocidad peroxidativa, efecto que podría tener un rol relevante en citoprotección frente a la acción LP tóxica de xenobióticos. (Financiado por D.I.B., Universidad de Chile, B-1860).

CARACTERIZACION DE CLONAS GENOMICAS CORRESPONDIENTES A COLAGENO DEL TIPO IV. (Characterization of genomic clones harbouring type IV collagen) Villa, L.L., Santos, C.L.S., Bonjardim, C.A., Brentani, R.R. Ludwig Institute for Cancer Research - Sao Paulo Branch - Brasil

Two human genomic libraries constructed in cosmids (a gift from Dr. E. Solomon from ICRF, London) were screened for type IV collagen sequences employing a mouse cDNA clone (Santos et al., Nucl. Acids Res 12(4):20, 35, 1984). We ended up with two clones which were further characterized by restriction mapping, Northern, Southern and hybrid selection procedures. Both hybridize to a 7kb mRNA species derived from total mRNA of two cell lines involved in type IV collagen synthesis, and we have observed that the signal with the homologous one - human HT10-80 - is stronger than the mouse one PYS-2. Furthermore the hybrid selected in vitro translated product showed a 180 Kd polypeptide equivalent to  $\alpha 1(IV)$  chain, which is collagenase sensitive. For the sequencing of so large inserts (25 and 35 Kb approximately) we selected restriction fragments which hybridize with both cDNA and specific oligonucleotides derived from type IV collagen cDNA sequences recently published by others. Some fragments were selected, cloned in M13 and partially sequenced by Sanger's protocol. We've sequenced at least 5,0 Kb, however we still couldn't find the (Gly-X-Y)n repeats characteristic of collagen genes. A new sequencing strategy using Exo III nuclease which is more suitable to sequence large DNA stretches is underway right now.

PARTICIPACION DE LOS OXIDANTES DERIVADOS DEL OXIGENO EN LA PATOGENIA DE LA FASE CRONICA ACTIVA DE PROCESOS INFLAMATORIOS. (Participation of oxygen derived oxidants in the pathogenesis of the active chronic phase of inflammatory processes). Vivaldi, E. E., Ward, P. H. y Moreno, M. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción.

Independientemente del agente etiológico, los procesos inflamatorios tienden a la cronicidad por lo menos mediante tres mecanismos: a) persistencia del agente causal, favorecida o no por agentes locales, b) reactivación de procesos inflamatorios aparentemente normalizados, y c) reacciones antígeno-anticuerpo de evolución subclínica y de potencial importancia patológica.

Con el fin de evidenciar la posible participación de oxidantes derivados del oxígeno, hemos utilizado diversos modelos experimentales, no inducidos por microorganismos, (quemadura en ratones, infección en ratas y reacción de Thomas en conejos) en los cuales hemos podido comprobar que la superóxido dismutasa (SOD) y/o el allopurinol, un inhibidor competitivo de la xantina oxidasa, son capaces de inhibir la respuesta inflamatoria y la necrosis local, lo que se manifiesta por atenuación evidente del edema, de las alteraciones tisulares, así como de la migración leucocitaria a la zona injuriada. Además, los animales que sobreviven debido a la acción de la SOD se diferencian de los controles porque no presentan lesiones crónicas, cicatriciales o infecciones sépticas secundarias.

Como se ha logrado evidenciar en algunas afecciones cutáneas, creemos posible que la terapia prolongada con SOD o con antioxidantes (vitamina A, E y C) puede interferir con procesos autoinmunes o degenerativos consecuentes a reacciones antígeno-anticuerpo.

Financiamiento: Proyecto 1083/85 FONDECYT.

ADSORCION DE FOSFOLIPASA A2 A VESICULAS DE FOSFATIDILCOLINA (Adsorption of phospholipase A2 to phosphatidylcholine vesicles). Viskatis, L., Canziani, G., Donnet, C. y Vidal, J.. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Se estudió la adsorción de fosfolipasa A2 de veneno de *Bothrops neuwiedii* a vesículas de fosfatidilcolina de yema de huevo por cromatografía en condiciones de equilibrio en Sepharosa 4B-CL. Se empleó el formalismo desarrollado por STANKOWSKI para la región de bajas densidades de ligadura. Los parámetros calculados a partir del gráfico de Scatchard fueron  $K_{asoc} = 1.08 (\pm 0.2) \times 10^6 M^{-1}$  y  $n = 23 (\pm 4)$ . La enzima puede ser considerada como un ligando con forma de disco y aplicar, entonces, la aproximación de ANDREWS, que permite calcular la fracción de sitios libres a saturación arbitraria. Se puede obtener un gráfico normalizado para ligandos con forma de disco, independiente de los valores de  $K_{asoc}$  y  $n$ . El valor de los parámetros de ligadura a partir de dicho gráfico fue  $K_{asoc} = 1.025 \times 10^6 M^{-1}$  y  $n=25$ . El gráfico de Hill lineal y de pendiente unitaria se obtuvo al representar  $\log(X/1-X)$  en función de  $\log$  (fracción molar de sitios libres), en vez de  $\log(PC_{libre})$ . El alejamiento de la respuesta hiperbólica (p.ej. Isoterma de Langmuir) se debe a la acumulación de espacios entre las moléculas adsorbidas. Los cálculos termodinámicos demuestran que el reordenamiento de las moléculas adsorbidas para permitir mayor ligadura requiere una disminución de la entropía de mezcla y, por lo tanto, la saturación de la superficie resulta ser un proceso no espontáneo. STANKOWSKI, S. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 735, 352-360 ANDREWS, F.C. (1975) *J. Chem. Phys.* 62, 272-275

ANTICUERPOS ESPECIFICOS ANTI-T. Cruzi EN UNA POBLACION HUMANA DE LA REGION METROPOLITANA (Anti-T. cruzi specific antibodies in a human population of the Region Metropolitana). Wallace, A.\* Sánchez, G.\*\* y Potocnjak, P.\*\*\*. \*Dpto. de Medicina Experimental. Fac. de Med. Div. Norte. \*\*INTA. Universidad de Chile.

En la fase crónica de la enfermedad de Chagas *T. cruzi* puede permanecer durante toda la vida del hospedero. En el hombre esta situación es posible por un equilibrio entre la virulencia del parásito, que varía de acuerdo a su origen geográfico, y a la capacidad del hospedero de desarrollar una respuesta inmune eficiente. Esta última puede manifestarse en niveles variables de anticuerpos específicos. El propósito de este estudio fue establecer los títulos de anticuerpos anti-T. cruzi en una población humana del Cajón del Maipo, Región Metropolitana y su especificidad por reactividad con cepas del parásito aisladas en Chile y otras regiones de Subamérica.

Los sueros se obtuvieron de 43 personas con edades entre 6 y 84 años. Los títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos anti-T. cruzi fueron determinados por dilución seriada doble en reacción de ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta, IFI, sobre formas de cultivo. La actividad lítica se midió sobre tripomastigotes sanguíneos vivos aislados de ratones irradiados.

El 81.0% de los sueros resultaron positivos en IFI y ELISA. Los títulos de anticuerpos IgM variaron entre 1/40 y 1/1280. Los títulos de anticuerpos IgG variaron entre 1/20 y 1/5120. Los anticuerpos líticos se detectan sólo en un 25% de los sueros y se corresponden con los títulos más altos en IgG. No todos los sueros positivos líticos para la cepa Tulahuen reaccionaron con la cepa Y.

Las diferencias observadas en actividad lítica sugiere diversidad antigénica entre las cepas de *T. cruzi* que apoyan la existencia de subpoblaciones del parásito. El resultado del diagnóstico podría depender de la cepa utilizada lo cual tendría implicancias en las determinaciones epidemiológicas.

Financiado por Proyecto B1475-8544. DIB, U. de Chile.

INCORPORACION A BICAPAS LIPIDICAS DE GRANDES POROS SELECTIVOS A CATIONES DE PEROXISOMAS DE HIGADO DE RATA. (Large cation-selective pores from rat liver peroxisomal membranes incorporated to planar lipid bilayers). Wolff, D.<sup>1</sup>, Labarca, P.<sup>2</sup>. 1. Depto. de Biología, Fac. de Ciencias, U. de Chile. 2. Centro de Estudios Científicos de Santiago.

Evidencias indirectas indican que los los peroxisomas son altamente permeables a solutos de bajo peso molecular, pero las bases moleculares del transporte no se conocen. La incorporación de membranas peroxisomales a bicapas lipídicas posibilita el estudio electrofisiológico de sus propiedades de permeabilidad. La fusión de membranas de peroxisomas de una fracción altamente purificada incorpora poros de alta conductancia selectivos a cationes y sensibles al voltaje. La razón de permeabilidades,  $P_K/P_{Cl}$ , es aprox. 4. Los poros muestran varios estados de conductancia y permanecen abiertos la mayor parte del tiempo a 0 mV, cerrándose a potenciales más positivos y más negativos. A voltajes cercanos a 0 mV el estado abierto más frecuente presenta una conductancia de 2,4 nS en KCl 0,3 M. A voltajes más positivos y más negativos de -10 mV el estado abierto más frecuente tiene una conductancia de 1,2 nS. Con estos valores de conductancia se estimaron diámetros de 3 y 1,5 nm respectivamente. Estos resultados sugieren que la presencia de estos grandes poros podría dar cuenta de la alta permeabilidad de los peroxisomas a solutos de bajo peso molecular. Se incorpora también un canal altamente selectivo a aniones que presenta dos estados abiertos con conductancia de 50 y 100 pS en KCl 0,1 M. (Labarca et al: J. Membrane Biol., en prensa). Financiado por Proyectos DIUC 79/86, FNC, 1181/85, y Fundación Tinker.

REACCION TISULAR A COMPRIMIDOS DE PROGESTERONA. (Tissue reaction to progesterone pellets). Zepeda, A., Croxatto, H.D., Instituto Chileno de Medicina Reproductiva y Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: H.B. Croxatto)

Los comprimidos de progesterona implantados bajo la piel en humanos son expulsados con mayor frecuencia que los de otros esteroides y ciertas técnicas de fabricación se asocian a una mayor tasa de expulsión. Se comparó entre sí la reacción tisular (RT) a comprimidos de progesterona de distinta textura superficial y con implantes de otros materiales. La comparación fue intra e inter especie. Se fabricaron tabletas con progesterona en polvo (Pp) o con progesterona precomprimida (PreC), constatándose por microscopía electrónica de barrido que la textura superficial de PreC es más lisa que la de Pp. Luego se implantaron bajo la piel de ratas y cobayos usando como controles animales no intervenidos, con implantación simulada, con tabletas de talco/colesterol (control positivo) y con implantes de sílica (control negativo). Los animales se sacrificaron a los 7, 21 ó 90 días. También se colocaron subcutáneamente tabletas de Pp en perros y cerdos y se estudió la RT a éstas a los 30 días. La RT a Pp y PreC no mostró diferencias en rata, pero fue más severa a Pp que a PreC en cobayo. La RT fue granulomatosa a todos los implantes en cobayo, perro, cerdo y sólo a talco/colesterol en rata. Ninguno de un total de 113 implantes fue expulsado. Se concluye que hay diferencias en la RT a implantes subdérmicos entre especies y entre implantes, pero ninguno de los modelos animales remeda el fenómeno de expulsión observado en humano. No hay una RT específica a progesterona. La diferencia de textura superficial entre los implantes de progesterona se asocia a diferentes grados de RT en cobayo.

Financiado por IDRC, Canadá

PRESENCIA DE UROTENSINA II EN NEURONAS QUE CONTACTAN EL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO DEL CANAL CENTRAL DE PECES. (Presence of urotensin II in central canal-cerebrospinal fluid-contacting neurons of fishes). Yulis, C.R., Lederis, K. Instituto de Histología y Patología, Fac. Medicina, Universidad Austral de Chile y Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Calgary.

6 formas diferentes de urotensina II (UII), presentes naturalmente en urófisis de 3 especies de teleosteos (*Gillichthys* UII, *Cyprinus* UII, *A. B y C* y *Catostomus* UII A, B) han sido demostradas. La disponibilidad de anticuerpos específicos contra *Gillichthys* UII que reaccionan cruzadamente con todas las formas conocidas de la molécula, permitió el estudio inmunocitoquímico de la distribución de este péptido en el sistema nervioso central (SN) de *Catostomus commersoni* y otras especies de peces. Se observó la presencia de inmunoreactividad (IR) por UII en la mayoría (90%) de las neuronas neurosecretoras caudales, en colocalización con urotensina I. Estas neuronas proyectan la mayoría de sus prolongaciones hacia la urófisis donde terminan alrededor de vasos sanguíneos. Rostroalmente a la 6ta. vértebra preterminal se demostró la presencia de un sistema sagital de neuronas UII-IR, localizadas ventralmente al canal central a lo largo de toda la médula espinal y del bulbo raquídeo. Sus dendritas se dirigen hacia el canal central donde algunas de ellas contactan con el líquido cefalorraquídeo (LCR). Axones arrosariados originados en estas neuronas forman un plexo medial y un tracto longitudinal bilateral en la médula espinal. Probables dilataciones terminales de estos axones fueron encontrados en la superficie ventrolateral de la médula y en diversas regiones cerebrales. El sistema descrito de neuronas que contactan el LCR fue visualizado incluso, en especies filogenéticamente antiguas de peces cartilagineos (*Hidrolagus Collei*) en los cuales un sistema caudal neurosecretorio no es evidente.

Financiado por Proyecto S-85-39, Dirección Investigación U.A.CH. y Alberta Heritage Foundation for Medical Research.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE D-XILOSA-(NADP<sup>+</sup>)-DESHIDROGENASA DE HIGADO DE CERDO. (Purification and characterization of D-xylose dehydrogenase from pig liver). Zepeda, S. y Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. <sup>1</sup>Departamento de Biología, Universidad de La Serena.

Se ha demostrado la presencia de deshidrogenasas relativamente específicas para pentosas libres en algunos tejidos de mamíferos, una de las cuales cataliza la oxidación de D-xilosa a D-xilonolactona (Ureta y Radjoković, FEBS Lett. 9, 57-60, 1970). Esta D-xilosa-NADP<sup>+</sup> deshidrogenasa se ha identificado en hígado de cerdo y degu pero no había sido purificada ni caracterizada.

D-xilosa-deshidrogenasa se purificó a partir de citosol de hígado de cerdo mediante un procedimiento que se resume como sigue: 1. Absorción negativa en CM-celulosa; 2. Precipitación con sulfato de amonio entre 40-70% de saturación; 3. Cromatografía en DEAE-celulosa; 4. Filtración en Sephacryl S-300; 5. Cromatografía en hidroxil-apatita; 6. Absorción en blue 2-agarosa y elución específica con NADP<sup>+</sup>. La preparación final tiene actividad específica de 5,9 ± 0,7 unidades/mg de proteína y presenta una banda por electroforesis en poliacrilamida-SDS. El pH óptimo es 7,8. El valor de Km para D-xilosa es 7,6 mM y para NADP<sup>+</sup> 0,1 mM. Además de D-xilosa, la enzima puede oxidar L-arabinosa con velocidad máxima menor (50%) y Km 8 veces mayor. NAD<sup>+</sup> no reemplaza a NADP<sup>+</sup> pero es un inhibidor incompetitivo. Por cromatografía de exclusión se encontró un valor de Mr de 63.600. Por electroforesis en poliacrilamida-SDS se calculó un valor de Mr de 33.300, lo que sugiere que la enzima nativa es un dímero de unidades del mismo peso molecular. Gráficas de dobles recíprocos obtenidas de estudios en velocidad inicial resultaron en líneas paralelas lo que sugiere un mecanismo ping-pong.

El aislamiento y caracterización de D-xilosa-NADP-deshidrogenasa permitirá la investigación de la o las vías metabólicas de utilización de D-xilosa en mamíferos. (Financiado por DIB (B-1989-8635) U. Chile).

POSIBLE ROL EN *A. TUMEFACIENS* DEL  $\beta$ 1-2 GLUCANO EN LA OSMOREGULACIÓN. (Possible role in *A. tumefaciens* of  $\beta$ 1-2 glucan in osmoregulation) Angeles Zorreguieta, Sonia Cavaignac, Roberto Geremía y Rodolfo Ugalde. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

*Agrobacterium* y *Rhizobium* sintetizan  $\beta$ 1-2 glucanos, los cuales se encuentran en el espacio periplásmico y en el medio de cultivo. Se ha descrito (Miller y col., Science (1986) 231, 48) que en medios de alta osmolaridad, *A. tumefaciens* C58 no sintetiza el glucano. Estos resultados fueron confirmados utilizando otra cepa de *A. tumefaciens*. Mutantes no virulentas de *A. tumefaciens* que no sintetizan el  $\beta$ 1-2 glucano fueron incapaces de crecer en medios de baja osmolaridad (19 mosM). El crecimiento se restauró cuando la osmolaridad fue de 29 mosM. Estos resultados indicarían una función del glucano en la osmoregulación. Se estudió el sistema enzimático de síntesis "in vitro" del  $\beta$ 1-2 glucano con membranas internas de células que fueron cultivadas a diferentes osmolaridades. Por otro lado, se estudió el efecto de distintos osmolitos, ClNa, ClK, sacarosa y manitol, sobre la síntesis "in vitro" del  $\beta$ 1-2 glucano.

CULTIVO UNIALGAL DE *SCENEDESMUS ACUTUS* (MEYER), EN CONDICIONES DE LABORATORIO. (Unialgal culture of *Scenedesmus acutus* (Meyer) under laboratory conditions). A. Zúñiga, Laboratorio de Limnología, Departamento de Botánica, Universidad de Concepción. (Patrocinio: P. Mancinelli).

La especie *Scenedesmus acutus* (Meyer) se aisló de muestras de agua de laguna Lo Méndez (36, 50' Lat. Sur, 73,2' Long. W.) hasta obtener un cultivo unialgal.

Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de  $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ; fotoperíodo 12:12; estímulo lumínico de  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{seg}$  y medio de cultivo Hoagland al 50%. Se utilizó vasos de cultivo de 500 cc.

El crecimiento se registró dos veces al día mediante el control de densidad óptica, concentración de clorofila "a" y recuento de número de células.

Los resultados permiten definir una fase de adaptación no mayor a 24 horas y una fase de crecimiento exponencial c.a. 7 días.

ESTUDIO LIMNOLOGICO EN EL LAGO VILLARRICA. (Limnological study of lake Villarrica). Campos, H., Steffen, W., y Agüero, G. Instituto de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

La troffa de un lago está relacionada principalmente con el ingreso de nutrientes, fosfatos y nitratos, que permiten un cambio en la naturaleza del fitoplancton. Un mayor aumento de nutrientes llevaría por lo tanto a una eutrofia y un ingreso menor a una oligotrofia. La disponibilidad de nutrientes está también relacionada a factores físicos como luz, temperatura, turbulencia, que están a su vez condicionadas por los caracteres morfométricos del lago y su hoya hidrográfica.

El lago Villarrica pertenece al distrito de lagos araucanos y en él hemos estudiado dos ciclos estacionales en los años 1978 y 1979, y 1984 - 1985 investigando el funcionamiento de este lago. Así se han obtenido las relaciones existentes entre los factores morfométricos (volumen, área, hoya), factores físicos (ciclo térmico, transparencia), factores químicos (nutrientes, composición iónica, sólidos disueltos y otros) y componentes biológicos (fitoplancton, productividad primaria, clorofila, zooplancton, bentos y productividad fctica).

Estas investigaciones han revelado que este lago está recibiendo un aumento de nutrientes, especialmente nitrato, relacionado a la acción del hombre y que ha ido cambiando su nivel trófico de oligotrófico a oligomesotrófico.

Estas investigaciones han sido parcialmente financiadas por el proyecto RS-83-49 de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile.

INTERACTION OF THE HUMAN THYROID AND GLUCOCORTICOID RECEPTORS WITH THE GENES OF THE PROLACTIN FAMILY  
J. Martial, A. Belayew, M. Mathy, M. Voz, J. Louette, P. Eliard, J. Barlow, F. Lemiegre, P. Denayer, I. Economides and G. Rousseau. Laboratoire Central de Génie Génétique, Université du Liège, D-4000 Liège, Belgium, and Unite Hormone and Metabolism ICP-UCL D-1200, Brussels, Belgium.

Despite the homology the human growth hormone (HGH), placenta lactogen (HCS) and prolactin (HPRL) genes have their transcription regulated differently by thyroid and glucocorticoid hormones. To investigate their mechanism of control we have determined whether these genes contain sites that bind the human glucocorticoid and thyroid receptors in vitro. For that, we have used a DNA binding assay.

Two glucocorticoid receptor binding regions were found in the highgene. One of high affinity in the region of the first intron and one of low affinity located within the 290 BP fragment of the 5' flanking DNA. In contrast, the thyroid receptor only binds with high affinity to the 5' flanking region. These sites identified in the HGH gene were found in similar locations in the HCS gene. Within the HPRL gene, the human glucocorticoid receptor interacted specifically with four non-contiguous regions, whereas the thyroid receptor complex showed a high-affinity for five different regions. DNA binding of the two receptor types appeared to depend on the presence of the hormone, yet antagonist-bound glucocorticoid receptor was still capable of interacting specifically with the genes.

In conclusion, this work provides evidence that genes which are regulated by thyroid or glucocorticoid hormones contain specific DNA sequences having a high degree of affinity for their respective receptors.

INVESTIGACION BIO-MEDICA EN EL ESPACIO (Bio-medical research in Space). Feytmans, E. Department of Biology University Faculties of Namur. Belgium.

Life, even in its primitive form, has developed in a gravitational field ; whether gravity represents a stress to which life had to adapt or whether gravity is an essential factor without which the ability to survive will decrease is an open question. Ten years ago, life-scientists began to investigate the effect of microgravity and the work had the character of exploration. Now, the exploration phase has yielded some of the basic data, and the traditional scientific interplay of hypotheses and experiments is developing.

We present here a picture of the present research opportunities as they have emerged from past accomplishments, and we give some prospective views of the problems that can, and should be, investigated. This is done against the background of a brief description of the Spacelab concept. The ensuing part is an attempt to present concisely the nature and scope of the biological and medical problems that have been brought to the fore by the availability of the space environment, and also to answer the question why experiments in space are required for their study. It is followed by more detailed accounts of research opportunities in different areas.

INHIBICION DE LA HEXOQUINASA D (GLUCOQUINASA) POR UNA PROTEINA CITOSOLICA EN PRESENCIA DE FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO. (Inhibition of hexokinase D (glucokinase) by a cytosolic protein in the presence of fructose-2,6-bisphosphate). Hermann Niemeyer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Después de revisar las propiedades generales de las denominadas proteínas reguladoras de la actividad enzimática, se examinará la inhibición de la hexoquinasa D (glucoquinasa) producida por fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) en presencia de un factor obtenido del citosol de hígado de rata. Diversas pruebas indican que este factor es una proteína inhibidora cuya interacción con la hexoquinasa D y otras hexoquinasas está modulada por Fru-2,6-P<sub>2</sub>. La proteína reguladora de las hexoquinasas fue originalmente reconocida en citosol de hígado filtrado en Sephadex G-25, pero está presente también en otros tejidos. Fue purificada parcialmente por no ser retenida en DEAE-celulosa y por precipitación con sulfato de amonio entre 30 y 40% de saturación. La proteína es inestable y es estabilizada por el Fru-2,6-P<sub>2</sub>. La inhibición de las hexoquinasas es dependiente de la concentración tanto de la proteína como del Fru-2,6-P<sub>2</sub>. En presencia de una cantidad suficiente de la proteína como para producir una inhibición completa de la hexoquinasa D, la concentración de Fru-2,6-P<sub>2</sub> requerida para producir un 50% de inhibición es alrededor de 0,5 µM. El peso molecular relativo de la proteína inhibidora es alrededor de 200.000, estimado mediante filtración en columna de Sephacryl. No se conoce el significado fisiológico de esta nueva proteína reguladora.

Financiado por el Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile, y por el Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.

BIOLOGIA MOLECULAR DE LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO.  
Paladini, Alejandro C., Instituto de Química y Físico-química Biológicas (IQIFIB).

Desde 1921, la hormona de crecimiento ha ocupado a numerosos laboratorios en el mundo, tratando de explicar su naturaleza química y los mecanismos moleculares de sus múltiples acciones. Es así que se descubrió que la hormona de crecimiento no es una única entidad sino que bajo ese nombre se agrupa una colección de proteínas similares que comparten funciones y están inmunológicamente relacionadas. Este grupo se integra con las prolactinas y los lactógenos placentarios.

Todos los miembros de esta superfamilia son proteínas formadas por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 200 aminoácidos, con 2 ó 3 puentes disulfuro y extremos libres. Sus estructuras primarias son altamente homólogas.

Está generalmente aceptado que todos los miembros de esta superfamilia tienen en común un gene ancestral que por duplicación y evolución divergente dió origen a los genes actuales.

En el curso de esta exposición se discutirá la evolución molecular de estas proteínas señalándose la aparente paradoja que plantean los lactógenos placentarios. La sutilmente diferente estructura terciaria de estas proteínas homólogas puede explicar la especificidad de especie que hace que los humanos sólo respondan a la hormona de crecimiento de su especie. En apoyo de esta hipótesis se aportarán datos de movilidad de hidrógenos obtenidos en nuestro laboratorio así como abundante información inmunológica y de interacción con receptores celulares.

Nos referiremos también a los estudios químicos de fragmentación de la molécula de la hormona en búsqueda de su posible centro activo así como a la modificación puntual de aminoácidos específicos y su repercusión en la actividad biológica. Se discutirá brevemente la posible formación fisiológica de péptidos activos a partir de la hormona de crecimiento circulante.

STERIC AND HYDRATION FORCES BETWEEN LECITHIN BILAYERS.

Simon S.A., Departments of Physiology and Anesthesiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710.

The steric and hydration repulsive forces between lipid bilayers and the deformability of both gel and liquid crystalline bilayers have been quantitated by X-ray diffraction analysis of osmotically stressed (0 - 2000 atmospheres) liposomes. The bilayer thickness and area per lipid molecule remains nearly constant (to within 4%) in this pressure range as adjacent bilayers move from the equilibrium separation and excess water to touching each other. Arguments will be given to show why the addition of phosphatidylethanolamine is needed for vesicles fusion and why phosphatidylcholine vesicles do not fuse with each other.

APORTES RECIENTES DE LA BIOTECNOLOGIA EN MEDICINA.  
Valenzuela, P. Chiron Corporation, 4560 Horton, Emeryville CA, 94608 y Departamento de Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

Una de las áreas más fructíferas de la revolución biotecnológica ha sido el descubrimiento y el desarrollo de métodos de producción mediante ingeniería genética de una serie de nuevas proteínas humanas y virales con interesantes actividades biológicas e inmunológicas.

En esta conferencia se discutirá el uso de esta tecnología en el desarrollo de nuevas vacunas (hepatitis, herpes, sida). También se discutirá la aplicación de esta tecnología en nuevos conceptos terapéuticos que se usarán en variadas áreas, tales como, prevención del daño celular por agentes oxidantes, cicatrización y tratamiento de heridas y fracturas óseas, coagulación sanguínea, etc.

La discusión abarcará además, recientes resultados acerca de la estructura y modo de acción de nuevos factores de crecimiento que, además de sus funciones normales estarían relacionados con la actividad de oncogénes y por lo tanto relacionados eventualmente con el control del cáncer.

## ESTRUCTURA Y EXPRESION DE GENES

Coordinador: Manuel Krauskopf

SEASONAL ACCLIMATIZATION OF THE CARP FISH. IS DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION PART OF THE ADAPTATIVE RESPONSE? (Aclimatación estacional de la carpa. ¿la respuesta adaptativa implica expresión génica diferencial?). Krauskopf, M., Anthauer, R., Soicochea, O., León, G., Oñate, S., Vera, M.I. and Villanueva, J. Instituto de Bioquímica and Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Eurythermal fishes exposed to seasonal temperature variations adapt physiologically by means of compensatory responses. A prime mechanism underlying the compensatory strategies may be found at the level of the gene expression process.

We have studied the gene expression behaviour during the acclimatization of the fish *Cyprinus carpio*. Ultrastructural observations of liver cells show that cold adaptation leads to a classic segregation of the nuclear components suggesting that RNA pol I transcription is seriously affected. Summer carp isolated hepatocytes are clearly more active in RNA and protein synthesis when compared to liver cells isolated from winter fish. In addition, transcription in the cold season is repressed beyond the level expected solely from a decrease in temperature ( $Q_{10}$ ). More than just RNA pol I mediated transcription could be involved in the physiological adjustment required in connection with the ambient temperature. Thus, changes in the tRNA population occur upon acclimatization. Furthermore, expression of albumin appears to be also affected, suggesting that indeed, differential gene transcription constitutes part of the compensatory response towards the temperature changes. Construction of molecular probes, as well as cytochemical and immunohistochemical analyses are being currently used to assess these observations. The involvement of mitochondrial genomic activity is also being studied using carp mtDNA probes and RNase-gold complexes. Supported by grants from DID UACH RS83-52, FONDECYT 1042/85 and Graduate Program project of OAS.

REGULATION OF EUKARYOTIC GENE EXPRESSION BY cAMP. H. Miller, D. Schlichter, J. Williams and W.D. Wicks, Department of Biochemistry, University of Tennessee, Knoxville, TN 37996-0840 USA.

Transfection experiments have shown that the regulatory element in three genes subject to control by cAMP in animal cells is present in the 5' flanking region just upstream from the promoter. A consensus 12bp sequence lies in the middle of the regulatory region and is also present in other genes subject to control by cAMP. We have examined the ability of nuclear extracts from the livers of cAMP-treated and control rats to bind to restriction fragments from various regions of one of these genes, which encodes hepatic PEP carboxykinase (PEPCK). High affinity, protein dependent, specific binding was detected by nitrocellulose filtration of end-labeled fragments containing the putative regulatory element with extracts from cAMP-treated rats which was several times that observed with control extracts. A synthetic 50mer containing the consensus region exhibited similar differential binding with the nuclear extracts which could be competed away by unlabeled restriction fragments containing the regulatory region but not by those which did not.

The factor(s) present in the treated extracts was found to protect G residues in a 193BP PEPCK fragment from attack by dimethyl sulfate just upstream from the regulatory region. This region has been reported to be crucial for cAMP control in transfection studies with somatostatin and proenkephalin, consistent with a possible role for the factor we have identified.

Supported by NIH Grant GM 31538.

THE STRUCTURE AND EVOLUTION OF VERTEBRATE PROTAMINES. Krawetz, S.A.\*, Connor, W. and Dixon, G.H., Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 4N1 Canada.

A bull P1 protamine cDNA from a bull testis cDNA library has been isolated utilizing a series of oligonucleotide probes. Sequence analysis showed that the cloned mRNA insert extended 317 bp to the poly A tail. Within a 156 bp segment the 51 residue 6750 dalton protamine primary translated protein is encoded. The amino acid sequence coded was for a protamine of the P1 family and is homologous with P1 protamines of other mammalian sperms. The sequence differs from that previously reported for bull protamine P1 by the insertion of a tripeptide CRR at pos. 39-41. Consistent with a previous hybridization analysis, nucleotide sequence comparisons showed that trout protamine was more closely related to that of bull than mouse. However, the bull protamine P1 showed greatest sequence homology with mouse P1. A common nucleotide sequence of 30 bp is conserved between all three of these species.

Primer extension analysis revealed that, as with trout protamine mRNAs, the majority of the untranslated portion of the mRNA lies 3' to the coding segment. Comparisons of their mRNA secondary structures by computer modelling indicates that the mRNAs may fold back onto themselves producing similar, extensively hydrogen bonded, convoluted forms. These models support the view that translational regulation of protamine mRNA may be, partially, dependent on secondary structure. Southern analysis suggests that the bull protamine P1 gene is not sex-linked and is present as one (or relatively few) copy within the bovine genome.

(This work was supported by an M.R.C. operating grant to G.H.D. \*S.A.K. is an AHFMR post-doctoral fellow.)

$\alpha$ -TROPOMYOSIN GENE ORGANIZATION: ALTERNATIVE SPLICING OF DUPLICATED "ISOTYPE-SWITCH EXONS" ACCOUNT FOR THE PRODUCTION OF SMOOTH AND STRIATED MUSCLE ISOFORMS. Ruiz-Opazo, N. and Nadal-Ginard, B. Section of Molecular Genetics, Boston University Medical School and Dept. of Cardiology, Harvard Medical School, Boston, MA USA

$\alpha$ -tropomyosin ( $\alpha$ -TM) is composed of two subunits with approximate MW of 33,000 daltons each. This protein in conjunction with the troponin complex plays a central role in the  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of muscle contraction. We have previously isolated and characterized cloned complementary DNAs (cDNAs) for striated and smooth muscle  $\alpha$ -tropomyosin. These studies suggested that these two isoforms might be encoded by the same gene. Here we have determined the complete structure of the  $\alpha$ -tropomyosin ( $\alpha$ -TM) gene, establishing that a single gene with a sequence complexity of 28kb produces the smooth and striated muscle  $\alpha$ -TM mRNA isoforms by differential splicing of a set of exchangeable "isotype-switch exons" involving alternative splicing pathways. The elucidation of the intron/exon organization of  $\alpha$ -TM has revealed its evolutionary origin from a single ancestral gene encoding a discrete actin binding domain. Most interestingly, the examination of the intronic sequences has uncovered potential alternative intramolecular secondary structures (hairpin-loop structures) which might be involved in the tissue-specific expression of the duplicated and mutually exclusive  $\alpha$ -TM "isotype-switch exons."

## BIOQUIMICA DEL CITOCROMO P-450 Y "STRESS" OXIDATIVO

Coordinador: Lionel Gil

QUIMIOLUMINISCENCIA DE ORGANOS DE MAMIFEROS (Chemiluminescence of mammalian organs). Boveris, A. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Los órganos de mamíferos *in situ* presentan una emisión espontánea medible con equipamiento adecuado; esta es, expresada en cps/cm<sup>2</sup>; hígado, 24 ± 2; pulmón, 12 ± 4; cerebro, 60 ± 8; músculo, 13 ± 1; e intestino, 11 ± 3. Esta emisión refleja el estado estacionario de oxy-radicales del tipo ROO<sup>•</sup>. Estos radicales originan en reacciones de terminación una serie de especies excitadas entre los que se cuentan <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y compuestos carbonílicos. El espectro de emisión muestra un predominio (>85%) a longitudes de onda mayores que 600 nm, consistente con la emisión dimolecular del <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. La administración *in vivo* de DABCO produce un aumento de la emisión, es dependiente de oxígeno y se extingue en anoxia; aumenta en hiperoxia y por administración de drogas formadoras de radicales de carbono (Cl<sub>4</sub>C). El aumento *in vivo* de la generación de radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> (a) por autooxidación del metil viologeno, (b) por activación de la xantina oxidasa llevan a un aumento de la emisión. La administración previa de sustancias antioxidantes tipo vitaminas A y E o polifenoles disminuye la emisión iniciada por Cl<sub>4</sub>C. La deficiencia doble en vitamina E y selenio depleciona (90%) de actividad de glutatión peroxidasa del hígado y causa aumento de emisión y posterior reacción. Se concluye que los productos de la reducción parcial del oxígeno producen *in vivo* centros de reacción (radicales libres) del oxígeno y del carbono que llevan a la formación de compuestos peroxilos y de compuestos excitados. El estado estacionario de centros de reacción de carbono parece regulado por el nivel de antioxidantes del tejido.

Con Subsidios de CONICET, SECYT y UBA.

CYTOCHROME P-450 SPIN STATE: REGULATION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE. G.G. Gibson. Department of Biochemistry, Division of Pharmacology & Toxicology, University of Surrey, Guildford, GU2 5XH, England.

Cytochrome P-450 exists as an equilibrium mixture of both low and high spin forms, the relative amounts of which are controlled by both membrane components and substrates. Data will be presented demonstrating that liver microsomal cytochrome b<sub>5</sub> specifically interacts with a purified phenobarbital-induced isoenzyme of cytochrome P-450, forming a tight 1:1 complex (K<sub>d</sub> = 275nM) in which the proportion of high spin haemoprotein was increased from 7 to 30%. This specific interaction between the two haemoproteins resulted in a decrease in the K<sub>d</sub> for the substrate benzphetamine from 111µM to 40µM. Likewise, the presence of benzphetamine was shown to cause a decrease in the K<sub>d</sub> for cytochrome b<sub>5</sub> binding to cytochrome P-450 from 275nM to 90nM. Furthermore, from experiments correlating changes in the rate of first electron reduction (fast phase) with the spin state of the haem-iron existing at pre-equilibrium, data will be presented consistent with a model for spin state control of cytochrome P-450 reduction wherein the high spin form is preferentially reduced. The above results will be discussed in terms of the regulation and functional significance of the cytochrome P-450 spin state.

CYTOCHROME P-450 CATALYZED BIOACTIVATION OF ARACHIDONIC ACID (Rol del citocromo P-450 en la bioactivación del ácido araquidónico). Capdevila, J., Snyder, G.D. and Falck, J.R. Departments of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, UTHSCD, Dallas, Texas 75235 USA.

Microsomal Cytochrome P-450 actively catalyzes the oxygenated metabolism of arachidonic acid to generate products that include six isomeric cis/trans dienols (HETEs), four regioisomeric epoxyacids (EETs) as well as the corresponding 19 and 20 monohydroxy derivatives. Reconstitution of the oxygenase utilizing solubilized and purified components demonstrates a cytochrome P-450 isoenzyme regio specific oxygen insertion.

In addition to their vasoactive properties, the "Epoxygenase" products 5,6-; 8,9-; 11,12- and 14,15-epoxyeicosatrienoic acids are potent and selective *in vitro* stimuli for the release of several peptide hormones such as for ex. luteinizing hormone, growth hormone, vasopressin, insulin and glucagon.

Utilizing a combination of GC/MS techniques we have documented the presence of epoxyacids in samples extracted and purified from rat liver, kidney, brain and pituitaries thus establishing the Epoxygenase as a new member of the Arachidonate Cascade.

REGIO AND STEREOSELECTIVITY OF STEROID HYDROXYLATIONS CATALYZED BY CYTOCHROME P-450 MONOOXYGENASES (Regio y Estereoselectividad en las Hidroxilaciones de esteroides catalizadas por el sistema Citocromo P-450 Monooxigenasas Gil, L.; Orellana, M. and Valdés, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

The wide versatility of the P-450 monooxygenases system in hydroxylating endogenous and exogenous substrates, results from the presence of multiple forms of P-450 isozymes. Testosterone (T) is hydroxylated by rat liver P-450 mainly to positions 2α, 6β, 7α, 16α and 17β, and Androstenedione (A) to positions 2β, 6β, 7α and 16α. Some of these hydroxylations are catalyzed by specific P-450 isozymes, thus the identification of some steroid metabolites is an excellent tool to establish P-450 isozymes contributions to microsomal activities in different tissues. We have recently published an HPLC method to quantify the main products of P-450 catalyzed (T) oxidations (Analytical Letters 17, 883-889, 1984). We have used this method to study the influence of sex and nutritional status in the expression of (T) and (A) microsomal hydroxylases in rat liver. No significant differences have been found between males and females in total (T) oxidative activity, but large differences in the expression of some regio and stereoselective hydroxylases were observed. Nutritional status effects deeply total (T) oxidative activity as well as the expression of some but not all hydroxylases. 7α steroid hydroxylase (P-450a) which is not modified by nutritional status might play a key role in the metabolism of physiological P-450 substrates. These results suggest that sex and nutritional condition modify the proportion of some P-450 isozymes in the liver, which might explain the differences in the activity of some steroid hydroxylases.

Supported by proyect B: 1970-8635, DIB, U. de Chile and 8025 FONDECYT.

SOBRE LOS MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD DEL LINDANO (On the mechanisms of lindane hepatotoxicity). Junqueira, V.B.C.\* , Barros, S.B.M.\*\* , Simizu, K.\* y Videla, L.A.

\* Instituto de Química y \*\* Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. \*\*\* Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Lindane, a pesticide widely used in Brazil, is metabolized by smooth endoplasmic reticulum cytochrome P<sub>450</sub>-system and is able to induce the synthesis of enzymes linked to the metabolism of xenobiotic and endogenous substances. After acute treatment of rats with lindane, liver steatosis have been observed. This morphological change seems to be related with lipid peroxidation, which is proposed as a mechanism to explain other tissue injuries. Indeed, increased amounts of liver cytochrome P<sub>450</sub>, as well as, increased generation of superoxide anion by liver microsomes were measured and can be associated to the high levels of hepatic lipid peroxidation. Also, in the liver of these animals, the activities of superoxide dismutase and catalase are decreased. This fact can contribute to exacerbate lipid peroxidation, in addition to the enhanced capacity of the liver to generate superoxide anion. The glutathione status of hepatocytes is also altered by lindane as demonstrated by the increased hepatic and biliary content of GSSG, with consequent decrease of cellular and biliary GSH/GSSG ratios. We suggest that lindane treatment of rats, leads to an oxidative stress in the liver which can not be overpassed by the common cellular defense mechanisms.

FLAVONOIDS AS CYTOPROTECTIVE AGENTS AGAINST OXIDATIVE STRESS: EFFECT OF SILYBIN DIHEMISUCCINATE ON LIVER LIPID PEROXIDATION. Alfonso Valenzuela. Lab. Bioquímica Farmacológica, INTA. Universidad de Chile.

Silybin dihemisuccinate is a water soluble form of silymarin, a flavonoid extracted from the milk thistle *Silybum maritimum*. Silybin has been proved to be an effective protective agent against the hepatotoxicity of phalloidin,  $\alpha$ -amanitin and carbon tetrachloride. Although the protective mechanism of the flavonoid has not been elucidated, it is generally accepted that exerts a membrane stabilizing action preventing or inhibiting lipid peroxidation. Phenylhydrazine has been known as a hemolytic and hepatotoxic agent capable of inhibit the function of liver microsomal cytochrome P-450 inducing lipid peroxidation. A single intraperitoneal dose of silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by the hydrazine on a hemoglobin-free rat liver perfusion system.

Liver microsomes are highly sensitive to lipid peroxidation when are incubated in the presence of NADPH and Fe<sup>2+</sup>-ADP or t-butyl hydroperoxide. In this situation, the addition of different concentrations of silybin dihemisuccinate to microsomes can inhibit only lipid peroxidation induced by NADPH-Fe<sup>2+</sup>-ADP, assessed as oxygen consumption, spontaneous chemiluminescence or malondialdehyde formation. The low inhibitory effect of the flavonoid observed in the t-butyl hydroperoxide induced peroxidation may be explained by the difference in the free radical species produced during microsomal lipid peroxidation. It is postulated that silybin acts directly by trapping  $\cdot OH$  radicals formed during NADPH-Fe<sup>2+</sup>-ADP microsomal oxidation being incapable of scavenge the t-butoxy free radicals. These properties described for the flavonoid may be the basis of many of its experimental and therapeutical effects observed in the treatment of many liver diseases, were oxidative stress in an important component.

Supported by DIB. Grant B-2399-8613 and by Dr. Madaus GMBH & Co.

INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE LOS CAMBIOS EN LIPO PEROXIDACION (LP) HEPATICA INDUCIDOS POR LA INGESTA AGUDA DE ETANOL (E) EN RATAS. (Age-dependent changes in rat liver lipid peroxidation induced by acute ethanol ingestion). VIDELA, L.A. Unidad de Bioquímica, Dept. Ciencias Biológicas, Fac. Med. Div. Occidente, Universidad de Chile.

Acute E ingestion is able to induce LP in the liver of experimental animals. This effect of E has been shown to be influenced by fasting GSH depletion, iron overload, previous chronic E intake and treatment with antioxidants, and could also be affected by aging in which a free radical reaction mechanism seems to be involved.

The study of the influence of the age of the animals (13-53 weeks) on total liver thiobarbituric acid reactive substances (TBAR) content showed an increase which is maximal in rats of 39 weeks of age, followed by a diminution in the 53 weeks old group, compared to young animals (13 weeks). In this situation, the content of hepatic GSH was decreased with aging while that of GSSG was enhanced in the oldest group studied. Acute E treatment (5 g/kg for 6 hr) resulted in a marked increase in liver TBAR in young animals, together with a decline in GSH content and an enhancement in GSSG. These changes elicited by E were reduced with aging. It is suggested that E-induced oxidative stress in the liver is diminished with aging despite the progressive decrease in glutathione content observed in control animals, probably due to a diminution in the total oxidative activity of the tissue. In fact, *in vivo* E metabolism, total activity of alcohol dehydrogenase and microsomal E oxidation declined with age, concomitantly with a reduction in cytochrome P-450 content and microsomal functions related to oxidative free radical reactions (DIB, U. de Chile, B-1860).

## METABOLISMO DE LIPIDOS

Coordinador: *Flavio Nervi*

INFLUENCE OF BILE ACIDS ON CHOLESTEROL AND TRIGLYCERIDE METABOLISM IN ISOLATED HEPATOCYTES.

Barth, C.A. and del Pozo, R., Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung, Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel, Germany.

In vivo evidence suggests a regulatory influence of bile acids on liver lipid dynamics. However, only isolated liver cell systems allow to determine whether these effects are exerted by direct influence within the hepatocyte (or merely a reflection of interference with intestinal lipid absorption).

Monolayer cultures proved to be particularly suitable because kinetics and cell biology of transcellular bile acid transport display in vivo characteristics (P.N.A.S. (USA) 79, 4985-4987(1982)). 10  $\mu$ M taurocholate inhibited HMG-CoA reductase (E.C.1.1.1.34) completely showing that there is a "direct intrahepatic" regulation of sterol synthesis by bile acids.

Moreover, 50-150  $\mu$ M taurocholate inhibited very low density lipoprotein triglyceride secretion from 30 to 87 % in freshly isolated hepatocytes within 180 min. Data will be presented which strongly suggest an interference with assembly and/or secretion of preformed lipoprotein particles. This effect caused by concentrations occurring physiologically in the portal vein, explains the hitherto poorly understood reciprocal relation between bile acid pool size and rate of secretion and concentration of serum triglycerides.

DROGAS HIPOLIPIDEMIANTE. UNA NUEVA HIPOTESIS SOBRE SU MODO DE ACCION. (Hypo-lipidemic drugs. A new hypothesis on their mode of action). Bronfaan, M. Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

A pesar de que el clofibrato y sus análogos, así como otras drogas hipolipidémicas son ampliamente usados en clínica, en la prevención de la arteriosclerosis, su modo de acción no se conoce. Aparte de su efecto hipolipidémico, estos compuestos producen toda una serie de efectos colaterales en animales de experimentación, los que incluyen hepatomegalia, proliferación peroxisomal y efectos metabólicos varios. Además, estos compuestos han sido propuestos como un nuevo tipo de cancerígenos químicos.

Recientemente hemos podido demostrar que tres drogas hipolipidémicas, el clofibrato y dos de sus análogos, son activados a acil-Coenzima A tioésteres tanto por fracciones microsomales de hígado de ratón, como por acil-coenzima A sintetasa purificada a partir de esa fracción subcelular, y que estos derivados son formados in vivo por el hígado. Estos hechos nos ha llevado a proponer que la activación de estas drogas a acil-coenzima A derivados sería la etapa fundamental en la acción de estos compuestos. En esta exposición, se resumirán las principales evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis, que permitiría explicar, simultáneamente, los diversos y disímiles efectos metabólicos de las drogas hipolipidémicas.

(Financiado por Proyecto DIUC 82/86)

EFFECTO DE LOS ACIDOS GRASOS SOBRE LAS PROPIEDADES FISICAS DE LAS MEMBRANAS Y LA CINETICA ENZIMATICA. (Effect of fatty acids on the physical properties of membranes and the enzyme kinetics). Brenner, R.R., Soulages, J.L. and Castuma, C.E. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), UNLP-CONICET, Fac.de Cs.Médicas, Universidad Nac.de La Plata, La Plata, Argentina.

Usando como modelo a la membrana del retículo endoplásmico del hígado de cobbya, se trató de investigar la relación existente entre la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos constituyentes, las propiedades dinámicas y estructurales de los mismos en la membrana y la cinética de la UDP-glucuronil transferasa. La modificación de la composición de los ácidos grasos se realizó con una dieta carente de grasa. Las propiedades físicas de la membrana y sus lípidos fueron monitoreadas midiendo la anisotropía de fluorescencia del difenilhexatrieno, y la polarización de fluorescencia del ácido parinárico. En ciertos experimentos se usó membranas microsomales y en otros retículo endoplásmico rugoso. Se observó que la dieta deficiente en grasas modificó la proporción relativa de ácidos no saturados y saturados disminuyendo el araquidónico y el linoleico e incrementando el oleico. El índice de dobles ligaduras fue disminuyendo pero no se alteró la proporción relativa de los diversos fosfolípidos y el colesterol. Los cambios de composición fueron acompañados por disminución de la difusión rotacional y lateral de las membranas y sus lípidos. Correlativamente con estos resultados la cinética de la UDP-glucuronil transferasa fue modificada de no micasiana a micasiana, los Kms de las reacciones componentes fueron aumentados y la velocidad máxima disminuida. En consecuencia la composición de los ácidos grasos de la dieta influye en la composición química del retículo endoplásmico modificando las propiedades físicas de la membrana y alterando la cinética de sus enzimas.

INTERACCION DE PEROXISOMAS Y MITOCONDRIAS EN LA OXIDACION DE ACIDOS GRASOS EN HEPATOCITOS.

(Peroxisome-mitochondria interaction in fatty acid oxidation by hepatocytes). Leighton, F., Nicovani, S., Manzano, M., Soto, U. y Necocchia, C. Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Existe un número creciente de evidencias que señalan que los sistemas peroxisomal y mitocondrial interactúan en la oxidación de ácidos grasos por hepatocitos. Esta interacción se observa en la cetogénesis mitocondrial a partir de acetato y ácidos grasos cortos de origen peroxisomal. En el catabolismo peroxisomal de los ácidos carboxílicos hidrofóbicos que las mitocondrias oxidan mal, entre estos C22:1, ácidos saturados de cadena muy larga y ácidos poliinsaturados. En la reoxidación de NADH producido en la oxidación peroxisomal. En la participación de la palmitoil-carnitina transferasa mitocondrial externa en la regulación de la función peroxisomal y en la regulación de la proliferación peroxisomal inducida por drogas y, finalmente, en el requisito de ATP de origen mitocondrial para la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas.

Recientemente hemos establecido que la velocidad de oxidación peroxisomal de ácidos grasos en hepatocitos aislados depende del contenido en ATP de estas células. Los inhibidores mitocondriales y otros que reducen los niveles de ATP, reducen paralelamente la oxidación peroxisomal mientras que la oxidación mitocondrial solo se afecta en condiciones de reducción severa. No está claro a qué nivel se ejerce este efecto, pero las evidencias experimentales descartan la activación de ácidos grasos.

Estas y otras observaciones indican que tal como se ha establecido para otros aspectos del metabolismo en células vegetales, los peroxisomas interactúan con mitocondrias también en células animales.

Financiado por proyectos DIUC 79/86 y FONDECYT 1181/85.

DETERMINANTES INTRAHEPATICOS DE LA EXCRECION BILIAR DE COLESTEROL (Intrahepatic determinants of biliary cholesterol excretion). Nervi, F., Marinović, I., Rigotti, A. y Ulloa, N. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El principal factor conocido capaz de modificar la excreción biliar de colesterol (C) es el flujo biliar de sales biliares. Estudios de este laboratorio han sugerido que la canalización metabólica del C libre a través de las vías de almacenamiento (C ester) o de excreción del hepatocito (C lipoproteico, síntesis de sales biliares) determinan la cantidad de C disponible para ser excretado a la bilis (B.B.A. 753:164, 83; J. Clin. Invest. 74:2226, 84). En este estudio hemos correlacionado las excreciones biliar y sinusoidal de C en ratas macho Wistar alimentadas con dietas que aumentan el C biliar (Diosgenina 1%) o la producción de lipoproteína VLDL (Fructosa 30%). Al agregar 30% Fructosa (Fr) a la dieta con 1% Diosgenina (D) el C biliar disminuyó de  $595 \pm 169$  nmoles/h/g ( $p < .001$ ). El flujo biliar, el débito de sales biliares y el de fosfolípidos no se modificaron. La secreción sinusoidal de C lipoproteico se estudió en el hígado aislado. La secreción de triglicérido en VLDL aumentó de  $95 \pm 26$  a  $414 \pm 100$  nmoles/h/g ( $p < .001$ ) y la de C de  $47 \pm 9$  a  $90 \pm 22$  nmoles/h/g ( $p < .02$ ) en ratas alimentadas con D+Fr. Se aisló además de los perfusados otra fracción de  $d > 1.006$  g/ml, la secreción de C de esta fracción aumentó de  $84 \pm 19$  a  $209 \pm 32$  nmoles/h/g ( $p < .001$ ) en el grupo D+Fr. La síntesis de sales biliares se midió en los mismos grupos con la técnica de depleción del pool de sales biliares. Este parámetro no se modificó. Se concluye que la canalización metabólica del C hepático a través de la vía lipoproteica sinusoidal modifica marcadamente la excreción biliar de C, independientemente de la excreción de sales biliares. Se sugiere además que el pool hepatocitario de C precursor del C de excreción lipoproteica y el de excreción biliar están metabólicamente relacionados a diferencia del pool de C precursor de la síntesis de sales biliares.

## MECANISMOS DE ACCION DE ENZIMAS: METODOLOGIA CLASICA, DE FLUORESCENCIA Y NMR

Coordinadores: *Emilio Cardemil, Octavio Monasterio*

ENZIMAS Y MODELOS QUIMICOS EN LA BIOSINTESIS DE MONOTERPENOS CICLICOS (*Enzymes and chemical models in the biosynthesis of monoterpenes*). Cori, O.; Portilla, G. y Rojas, M.C. Depto. Química, Fac. de Ciencias, Univ. de Chile.

Las carbociclasas de *Citrus limonum* catalizan la síntesis de monoterpenos monocíclicos (Limoneno) y bicíclicos ( y pineno) a partir de geranilbifosfato (GPP), nerilbifosfato (NPP) y linalilbifosfato (LPP). Requieren cationes bivalentes.

Estos mismos cationes ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) catalizan la solvólisis no enzimática de estos tres substratos con formación de prenoles e hidrocarburos cíclicos y acíclicos. El complejo bimetálico ( $RPP-M_2^+$ ) es el complejo más reactivo. La adición de un nucleófilo ( $NaN_3$ ) da lugar además a la formación de un azido-derivado. Cambios en el grupo saliente indican un mecanismo de pares iónicos ( $R^+ \dots OPOPO_2^-$ ).

En la formación enzimática de hidrocarburos los únicos substratos son los complejos bimetálicos de GPP, NPP o LPP ( $RPP-M_2^+$ ).

Las carbociclasas forman solamente el hidrocarburo monocíclico limoneno a partir del enantiomero S del compuesto cíclico terpinilbifosfato. Esto demuestra que los terpenos bicíclicos (pinenos) se forman directamente por plegamiento de los precursores acíclicos, probablemente en una reacción concertada.

Se presentarán datos inéditos de M. Alarcón y V. Avalos. Financiado por DIB, Univ. de Chile y FONDECYT, Chile.

METAL ION ACTIVATION AND ACTIVE SITE STRUCTURE OF YEAST ENOLASE. Nowak, T.  
Department of Chemistry, University of Notre Dame, U.S.A.

Enolase activation by  $Mn(II)$  and enolase binding of  $Mn(II)$  and of 2-phosphoglycerate (2-PGA) using EPR and proton relaxation rate enhancement (PRR) were measured as a function of pH. At pH > 7.0 steady state kinetics showed activation and metal inhibition. One  $Mn(II)$  site per monomer was measured but in the presence of 2-PGA, 3 binding sites are observed. Below pH 6.6,  $Mn(II)$  inhibition weakens and disappears and only 2  $Mn(II)$  binding sites are observed. The third site must be inhibitory. Binding sites I ( $K_D=0.7-2.1 \mu M$ ) and II ( $K_D=9-60 \mu M$ ) are nearly pH independent from pH 7.5 to 5.2. Activation by  $Mg(II)$  elicits a higher  $V_m$  and has a greater  $K_m'$  than with  $Mn(II)$ . Kinetics at subsaturating  $Mg(II)$  with the addition of micromolar  $Mn(II)$  shows a hyperbolic decrease in activity to yield a specific activity as observed with only  $Mn(II)$ . An EPR study shows only one  $Mn(II)$  site per monomer,  $K_D=5.4 \mu M$ , in the presence of 2-PGA and 0.5 mM  $Mg(II)$ . PRR titration studies with 2-PGA or with inhibitors indicate that the  $Mn(II)$  binds at site I while  $Mg(II)$  resides at site (II). Occupancy at site I, the catalytic site, determines the turnover rate. Both  $^{31}P$  and  $^1H$  NMR studies of  $E \cdot Mn \cdot S$  and  $E \cdot Mn \cdot Mg \cdot S$  complexes, where S is substrate or inhibitor, confirm this.

The epoxide derivative of phosphoenolpyruvate (PEP) was synthesized and found to be an inhibitor of enolase but inhibition is reversed by hydrolysis at room temperature. Kinetics of inhibition and product identification are consistent with an active site carboxylate. Treatment with the phosphate derivative ferrate yields loss of activity with loss of 2 arg per monomer. In the presence of 2-PGA only 1 arg is lost. Binding studies of  $Mn(II)$  and 2-PGA to modified enolase suggest modification at the active site.

This research is supported by NIH Grant AM17049.

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE LA ENZIMA GABA TRANSAMINASA  
Jorge E. Chruichich, Departamento de Bioquímica,  
Universidad de Tenn, Knoxville, Tenn, USA

La enzima aislada del cerebro contiene una molécula de cofactor por dímero de proteína.

Estudios hidrodinámicos demostraron que la enzima de un peso molecular de 100,000 posee un tiempo de correlación de 65 nanosegundos. Usando resonancia magnética nuclear se demostró que la señal del cofactor no cambia cuando el pH se varía de 6 a 7.5.

El grupo fosfato del cofactor está en contacto con aminoácidos de carga positiva. La secuencia de un péptido del centro activo ha revelado que el cofactor está unido a una región de la enzima cuya secuencia es diferente de la secuencia de la aspartato aminotransferasa.

La reacción de la enzima con los substratos 3-alanina y 4-aminobutirato fue estudiada usando técnicas espectrofotométricas. Los parámetros  $K_{CAT}$  y  $K_m$  fueron determinados usando métodos cinéticos clásicos. La constante de primer grado correspondiente a la conversión de piridoxal-5-P a piridoxamina-5-P fue determinada usando técnicas espectrofotométricas rápidas. Se encontró que  $K_I$  es idéntica a  $K_{CAT}$ . La cinética de la reacción de la enzima con gabaculina, un inhibidor específico, fue estudiada con métodos espectroscópicos.

TIROSINQUINASAS EN ORGANISMOS FOTOSINTETICOS. (Tyrosine kinases in photosynthetic organisms). Vallejos, R.H.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CONICET, F.M. Lillo, Universidad Nacional de Rosario) Suipacha 531, Rosario, Argentina.

La regulación metabólica por fosforilación-desfosforilación de enzimas es un mecanismo bien conocido y de creciente complejidad. Recientemente se ha encontrado en tejidos animales un grupo de proteinquinasas que fosforilan específicamente en tirosina y que están asociadas con la regulación del crecimiento celular y con oncogenes. Algunas proteínas transformantes retrovirales son tirosinquinasas y hay homología en su secuencia con los receptores de insulina y EGF.

L. Holuigue estudió la fosforilación de proteínas en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*. Analizando los fosfoaminoácidos presentes encontró, trabajando junto con H.A. Lucero y M. Torruella, la presencia de fosfotirosin proteínas tanto en experimentos in vitro utilizando ATP ( $\gamma\text{-}^{32}P$ ) como en experimentos in vivo usando  $P_i^{32}$ . La existencia de tirosinquinasas(s) en *R. rubrum* fue confirmada utilizando sustratos exógenos y mediante la purificación parcial de un extracto libre de células por cromatografía de afinidad.

Comprobada la existencia de tirosinquinasas en una bacteria fotosintética nos preguntamos si estarían presentes también en plantas superiores. El uso de sustratos exógenos específicos para tirosinquinasas nos permitió comprobar su actividad en plántulas de arveja. La purificación por electroforesis de fosfopolipéptidos seguida del análisis de fosfoaminoácidos corroboró su presencia.

Resultados recientes obtenidos por M. Torruella han permitido caracterizar cinéticamente la tirosinquinasas(s) de arveja e identificar a uno de los sustratos endógenos como un polipéptido de 58,5 kDa mediante el uso de anticuerpos anti fosfotirosina.

## ORGANIZACION DEL METABOLISMO

Coordinador: *Tito Ureta*

MEASUREMENTS OF TIME PATTERN CONVERSIONS IN GLYCOLYSIS. Markus, M., Müller, S.C. and Hess, B. Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1, FRG

Theoretical work [1,2] has shown that glycolysis acts as a converter of one time pattern into another: a constant substrate input flux brings about a constant or a periodic response, while a periodic input flux yields different types of periodic, quasiperiodic and chaotic responses.

Measurements were performed with glycolyzing yeast extracts. As input, glucose was injected using a computer controlled pump. As response, the fluorescence of NADH was recorded. A constant input flux yielded constant or periodic responses as expected. For a sinusoidal input flux, 104 response traces were measured at different input amplitudes and frequencies. 74 of these responses were periodic, the periods being 1, 2, 3, 4, 5, 7, or 9 times the input period. 19 responses were quasiperiodic (sums of periodic oscillations). 11 responses were chaotic, i.e. oscillations were obtained having unpredictable amplitudes and frequencies. Several techniques, including stroboscopic plots and determination of the maximum Liapunov exponent, were applied to show that these responses were indeed chaotic.

Regions containing the different types of responses could be outlined on the plane defined by the input amplitude and the input frequency. The location of these regions is in good agreement with the theoretical predictions.

- [1] Markus, M. and Hess, B., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 4394-4398 (1984)  
 [2] Markus, M. and Hess, B., Arch.Biol.Med.Exp. 18, 261-271 (1985)

AMBIGUITOUS ENZYMES: A DYNAMIC ASPECT OF CELLULAR ORGANIZATION. John E. Wilson, Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824 U.S.A.

Cellular location (e.g., "mitochondrial", "nuclear", etc.) is sometimes thought of as an invariant property of enzymes, or more generally, of proteins. Though in many cases such a static view is warranted, in others it clearly is not, and the disposition of a protein within the cell has been found to be influenced markedly by the status of cellular metabolism. It now appears that physical translocation of macromolecular components should be considered as an important factor in regulation of a number of metabolic processes. The word "ambiguitous" has been suggested to denote those enzymes whose intracellular distribution may vary in response to altered cellular metabolism. Brain hexokinase has been proposed as one example of an ambiguitous enzyme. Originally, the enzyme was envisaged to vary in its distribution between a mitochondrially-bound form and a cytoplasmic location, the mitochondrially-bound form being more active and hence change in intracellular distribution being a regulatory mechanism. Though the essentials of this original proposal may be correct, the actual situation now appears to be somewhat more complex, and extensive release of the enzyme into the cytoplasmic compartment probably does not occur under normal circumstances. However, more marked movement between cellular compartments has been observed with several other enzymes (e.g., CTP: phosphocholine cytidyltransferase, protein kinase C) and thus the concept of ambiguitous behavior merits continued consideration as a potential regulatory mechanism in cellular metabolism. A conceptually analogous situation is the movement of glucose transporters between the plasma membrane and intracellular reservoirs, which appears to be of significance in governing glucose transport capability in certain tissues. (Work with brain hexokinase has been supported by NIH Grant NS09910).

THE ORGANIZATION OF GLYCOLYSIS. (Organización de la glicólisis). Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

A fair amount of data exists purporting to show that most glycolytic enzymes do not float freely in the cytoplasm. Instead, the enzymes seem to be reversibly bound to specific proteins of the cytoplasmic matrix or of some membranes. Experiments from several laboratories which show that aldolase, phosphofruktokinase and glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (among other enzymes) are reversible bound to muscle actin will be described. Also, the reversible binding of glyceraldehyde 3-P dehydrogenase, phosphofruktokinase and phosphoglycerate kinase to protein Band 3 of red cell membranes, will be summarized. The functional significance of these interactions, as shown by the fact that several relevant metabolites can affect the binding and also by observations that allosteric properties may differ in the free, as opposed to the bound enzyme, will be given special emphasis.

A few observations from the author's laboratory will be presented: in the frog oocyte isotopic dilution by hexose phosphates of glycogen deposition is observed only if labeled glucose is supplied as extracellular substrate as opposed to microinjected glucose, in which case no isotopic dilution by hexose phosphates occur. Thus, the mode of entry of glucose affects the intracellular path to be followed suggesting extensive compartmentation of glucose metabolism. (Supported by Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile).

# Simposio

## NEUROBIOLOGIA

Coordinadores: *Hugo F. Maccioni, Fernando Orrego*

**EL AMBIENTE MEMBRANACEO DEL RECEPTOR COLINERGICO NICOTINICO** (The membrane environment of the nicotinic acetylcholine receptor) Barrantes, F.J. Instituto de Bioquímica, Universidad Nacional del Sur y CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

In spite of the wealth of biochemical and electrophysiological data which have made the acetylcholine receptor the best characterized neurotransmitter receptor protein, the lipid matrix in which the latter is embedded has received much less attention. Biochemical and biophysical studies conducted in our laboratory are aimed at defining the structural and dynamic properties of the AChR membrane. Lipid compositional studies have been conducted in three *Torpedinidae* species in parallel with metabolic studies using radio-labelled precursors. Unsaturation is characteristically found in most major phospholipids, except for phosphatidylcholine. Long-chain polyunsaturated fatty acids constitute more than 50% of the population. Among these, docosahexaenoate makes up more than 70% in *T. marmorata*. Nitroxide spin labels of stearate (the major fatty acid in PC), as well as cholesterol- and phospholipid-spin probes sense fluid and immobilized lipid populations in AChR membranes. Lipid lateral diffusion appears to be a free process as sensed by fluorescence photobleaching recovery techniques, a property which probably reflects the above-mentioned compositional features of the membrane. Extraction of non-receptor, peripheral proteins is accompanied by depletion of certain minor phospholipid classes, a process which is manifested in changes of AChR dynamic properties: lateral diffusion, rotational correlation time (as measured by phosphorescence anisotropy decay), and distribution of the molecule in the plane of the membrane. The bulk physical properties of the AChR membrane lipids can account for the modifications of the AChR dynamic properties; the exact nature of the protein-lipid interactions remains to be explored.

**BIOSINTESIS Y EXPRESION DE GANGLIOSIDOS DURANTE LA DIFERENCIACION NEURONAL** (Biosynthesis and expression of gangliosides during neuronal differentiation). Maccioni H.J.F., Panzetta P. y Landa C.A. CIQUIBIC (UNC-CONICET) Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5016 Córdoba, Argentina.

Los gangliosidos (G) son un grupo heterogéneo de lípidos ricos en carbohidratos y que contienen ácido siálico. Están presentes en las membranas celulares de cordados y particularmente concentrados en el Sistema Nervioso Central (SNC). Se los ha involucrado en la regulación del ciclo celular, en interacciones celulares, transformación y regeneración celular, etc., pero el rol biológico no está establecido. Durante el desarrollo embrionario del SNC de aves y mamíferos los oligosacáridos de los gangliosidos cambian. Mientras que en estadios tempranos el oligosacárido al cual se unen los ácidos siálicos es un residuo lactosil (G simples), en estadios avanzados es un residuo galactosil-N-acetilgalactosaminil - lactosil (G complejos). Estudios realizados en retina de embrión de pollo en nuestro laboratorio indican que el cambio mencionado a) resulta de la modulación durante el desarrollo de la actividad de G glicosiltransferasas claves que determinan la disminución de G simples y el aumento de G complejos; b) es reproducible en retinas o células retinales de embriones tempranos "desarrolladas" en cultivo; c) ocurre en células neuronales; d) está determinado tempranamente; e) es independiente de contactos celulares histotípicos y del aporte continuo de factores embrionarios; d) es contemporáneo con la transición entre el estado proliferativo y no proliferativo de las neuronas retinales. Se considera posible que la aparición de gangliosidos complejos en la membrana neuronal contribuya al mantenimiento del estado diferenciado de las células neuronales.

**DOMINIOS LIPIDICOS EN LA INTERACCION DE LA ACETILCOLINESTERASA CON LA MEMBRANA PLASMATICA NEURONAL** (Lipidic domains in the interaction of acetylcholinesterase with the neuronal plasma membrane). Inestrosa, N.C. Grupo de Neurobiología Molecular. P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

Las proteínas integrales de membrana están ancladas a ella por interacciones entre la bicapa lipídica y secuencias de aminoácidos hidrofóbicos localizados en los extremos COOH o NH<sub>2</sub>- terminal. Estudios recientes indican, sin embargo, que algunas proteínas usan dominios lipídicos para anclarse a la membrana (VSG del *T. brucei*; Thy-1; Acetilcolinesterasa (AChE)).

En el caso del dímero de la AChE del órgano eléctrico de *Torpedo*, éste puede ser liberado de la membrana por una fosfolipasa c específica para fosfatidil inositol (PI) y luego de ser purificado tiene en su C-terminal un dominio lipídico de 3 kDa, rico en etanolamina, glucosamina, PI y ácidos grasos saturados y no saturados.

En el cerebro de los vertebrados, las formas tetraméricas de la AChE son las más abundantes, sin embargo éstas no son liberadas por fosfolipasa c. Esto nos llevó a marcar el dominio de la enzima que se asocia a la membrana, con un reactivo de afinidad iodinado que al ser fotooxidado se une a las regiones hidrofóbicas de la AChE. Se ha establecido la presencia de un fragmento de 7 kDa que contiene ácidos grasos pero no PI glucosamina y etanolamina.

Podemos concluir que la AChE dependiendo del estado molecular en que se encuentre (dímero o tetramero) usa para su interacción con la membrana neuronal dominios lipídicos distintos.

Financiado por FONDECYT (1015/85) y NIH (NS-16577).

**ASPECTOS MOLECULARES DE LA "ANSIEDAD": n-BUTIL CARBOLINA 3 CARBOXILATO, UN LIGANDO ENDOGENO DEL RECEPTOR A LAS BENZODIAZEPINAS** (Molecular aspects of 'anxiety': n-butyl carboline 3 carboxylate, an endogenous ligand of the benzodiazepine receptor). Medina, J. H., Peña, C., Novas, M.L., Paladini, A.C., De Robertis, E. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina (UBA) Paraguay 2155 e Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, Buenos Aires, Argentina.

El cerebro de los mamíferos contiene sitios receptores específicos para benzodiazepinas (BDZ) que median las acciones ansiolíticas, anticonvulsivantes, sedativas y miorrelajantes de estas drogas. La existencia de sustancias endógenas que interactúan con los receptores BDZ en condiciones fisiológicas ha sido una cuestión de creciente relevancia biológica y fuente de considerables especulaciones, particularmente en relación con su probable participación en la fisiopatología de la "ansiedad".

Recientemente, a partir de cerebros bovinos hemos aislado, purificado e identificado al n-butyl carbolina 3 carboxilato (n-CCB) como un componente natural y genuino del SNC. Este compuesto presenta las siguientes propiedades y características:

1. Compite específica y selectivamente por los receptores BDZ ( $K_i = 3 \text{ nM}$ ) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4952, 1986)
2. Su administración intraperitoneal (30 mg/kg) o intracerebroventricular (40 µg) a ratones disminuye el umbral a las convulsiones inducidas por ácido 3 mercaptopropiónico. Este efecto proconvulsivante es bloqueado por el antagonista específico de BDZ RO 15-1788.
3. En el test conductual de actividad exploratoria en un medio ambiente desconocido posee efectos opuestos (dosis dependiente) a aquellos provocados por la administración de BDZ.
4. Sus niveles aumentan selectivamente en la corteza cerebral de animales sometidos a una situación aguda de stress. Este incremento se previene con la administración previa de diazepam.

GLUTAMATE AS A BRAIN CORTEX NEUROTRANSMITTER.  
Orrego, F., Miranda, R., Doria de Lorenzo, M.C.,  
Riveros, N., Fiedler, J. and Villanueva, S.  
Laboratory of Neurochemistry, Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Universidad de Chile.

We first studied, in 1975, whether exogenously added  $^3\text{H}$ -glutamate (Glu) could be released by selective electrical stimulation of rat brain cortex slices in vitro. The results were negative, possibly because exogenous Glu is taken up mainly by glial cells. Similar results were obtained later, when endogenous Glu was labelled with  $^{14}\text{C}$ -U-glucose, probably because of insufficient labelling of the transmitter pool. We then turned to study the presence of excitatory substances in isolated, purified brain cortex synaptic vesicles (SV), and found that they contain substantial amounts of an endogenous ligand for kainic acid (KA) receptors. Such ligand was found to be glutamate. Next, using highly purified SVs, and a sensitive radioreceptor assay for endogenous Glu, that uses high specific activity  $^3\text{H}$ -KA as a ligand, we were able to estimate that each single glutamatergic brain cortex SV, contains 3600 Glu molecules. This value compares well with the number (6,000) of acetylcholine molecules in a quantum.

These findings, taken together with the presence of well defined glutamate receptors in the brain cortex, provides firm proof that Glu is a bona fide cerebrocortical neurotransmitter.

Supported by Projects DIB B 1590, Univ. de Chile; and Fondecyt N° 1018.

## ENFERMEDAD DE CHAGAS: BIOQUIMICA DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*

Coordinadores: *Juan J. Cazzulo, Nórbel Galanti*

HETEROGENEITY OF *Trypanosoma cruzi* SURFACE ANTIGENS DETECTED BY MONOCLONAL ANTIBODIES. Alves, M.J.M., Abuin, G., Gonçalves, M.F., Kuwajima, V.V. and Colli, W.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 20780, São Paulo, Brasil.

Qualitative and quantitative heterogeneities were detected on the surface of several strains and clones of epimastigote forms of *T. cruzi* as judged by their agglutinability with lectins and a monoclonal antibody that recognizes two surface polypeptides of molecular weight 55,000 and 59,000. Two other monoclonal antibodies, specific for the trypomastigote stage which partially inhibit (50-70%) *T. cruzi* invasion of cell monolayers and recognize a surface glycoprotein of molecular weight 85,000 (Tc-85), were also able to immunoprecipitate, from metacyclic trypomastigotes, three polypeptides with molecular weights different from 85,000 (82,000 - 78,000 - 74,000) thus showing a variability in the molecular size of Tc-85.

Such phenotypic heterogeneity displayed on the surface of *T. cruzi* could be a reflection of a genetic heterogeneity in the parasite populations. However, some of the variations observed could be explained by modulation of antigen expression due to particular physiological conditions. Differences in molecular weight could also be due to post-translational modification of proteins and/or to highly antigenic epitopes common to otherwise completely different proteins.

Supported by UNDP/World Bank/WHO, FAPESP, CNPq and FINEP.

FERMENTACION AEROBICA DE LA GLUCOSA POR AMASTIGOTES DEL *TRYPANOSOMA CRUZI* DURANTE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION A EPIMASTIGOTES (Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* amastigotes during growth and differentiation to epimastigotes). Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O.M., Cannata, J.J.B. y Cazzulo, J.J.

Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", Ministerio de Salud y Acción Social, Argentina; Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar; Cátedra de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y Centro de Investigaciones Bioenergéticas, CONICET, Argentina.

Los amastigotes de cultivo axénico de *Trypanosoma cruzi* desarrollados a 28°C, alcanzan la fase estacionaria después de dos generaciones, se diferencian a epimastigotes y en ese momento reanudan el crecimiento. Los amastigotes fermentan la glucosa hasta succinato y acetato y no excretan NH<sub>3</sub>; presentan actividades altas de hexoquinasa y PEP-carboxiquinasa y muy baja de citrato sintasa. El citocromo *c* está ausente y el citocromo tipo *b* está presente en muy bajo nivel. Los amastigotes catabolizan la glucosa y producen succinato y acetato a velocidades considerablemente menores. Presentan niveles más bajos de hexoquinasa y PEP-carboxiquinasa y mucho más altos de citrato sintasa y citocromos *c* y tipo *b*. Excretan NH<sub>3</sub> al medio, lo cual es índice del catabolismo de amino ácidos. Estos resultados sugieren que los amastigotes tienen un metabolismo esencialmente glucolítico, y que adquieren la habilidad de oxidar sustratos como los amino ácidos solo después de diferenciarse en epimastigotes.

ACTIVIDADES PROTEOLITICAS EN *TRYPANOSOMA CRUZI* (Proteolytic activities in *Trypanosoma cruzi*). Cazzulo, J.J. y Bontempi, E.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar e Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", Buenos Aires, Argentina.

*Trypanosoma cruzi* contiene actividad proteolítica sobre diversos sustratos, entre ellos proteínas solubles del propio parásito. Hemos purificado hasta homogeneidad proteica, a partir de epimastigotes de la cepa Tulahuén 2, una proteasa ácida, que degrada seroalbumina bovina, hemoglobina y proteína soluble de *T. cruzi* (pH óptimo de 3 a 4) y caseína (pH óptimo de 5). La enzima es una glicoproteína monomérica, de peso molecular 60,000, que es retenida por Con A-Sepharosa y eluida con  $\alpha$ -metil-D-manósido y  $\alpha$ -metil-D-glucósido. Es fuertemente inhibida por reactivos de tioles (fluoresceína mercuriacetato y p-cloromercuribenzoato), tosil lisil clorometil cetona y leupeptina; el fenilmetilsulfonil fluoruro y el EDTA no la afectan. El  $\beta$ -mercaptoetanol y el glutatión reducido activaron la proteasa y revertieron la inhibición por organomercuriales. La enzima es particulada, con una latencia del 40% en fracciones obtenidas por mortereado, y presenta un perfil de solubilización por digitonina similar al de la  $\alpha$ -manosidasa. Los datos experimentales sugieren que se trata de una proteasa lisosomal, con propiedades similares a las de la Catepsina B.

ACCION DE SUSTANCIAS TRIPANOCIDAS SOBRE SINTESIS DE PROTEINAS "IN VITRO" EN TRIPANOSOMATIDOS. (Effect of trypanocidal drugs on protein biosynthesis "in vitro" by trypanosomatids). González, Néilda S. y Cazzulo, Juan José.

Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Univ. de Buenos Aires (Argentina).

Las drogas tripanocidas efectivas contra el *Trypanosoma cruzi* usadas actualmente en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son dos nitroheterociclododerivados: nifurtimox (N<sub>f</sub>) y benzimidazol (B<sub>2</sub>). Stoppani, Riche y col., han demostrado que, entre otros efectos, estas drogas inhiben la incorporación de precursores a macromoléculas (DNA, RNA y proteínas) "in vivo".

Hemos estudiado el efecto de drogas tripanocidas en la síntesis proteica "in vitro". Para ello se aislan polisomas, enzimas activantes y factores tanto de *T. cruzi* como de *Crithidia fasciculata* cosechados en fase exponencial temprana, midiendo la incorporación de S<sup>35</sup>-metionina a material insoluble en ácido tricloroacético, en ausencia o presencia de la droga. Tanto N<sub>f</sub> como B<sub>2</sub> fueron inactivos hasta una concentración de 0.8 mM. En cambio, otras drogas efectivas contra la tripanosomiasis africana, pero no contra la enfermedad de Chagas, como Berenil (Be), Antricyde (Ant) y Suramina (S) fueron fuertemente inhibitorios a concentraciones más bajas (0.2 mM).

Paralelamente se estudió el efecto de esas sustancias en la distribución polisomal de lisados obtenidos en presencia de las drogas. En este caso, N<sub>f</sub> y B<sub>2</sub> promovieron la degradación de polisomas, no así Be, Ant y S. Estos resultados sugieren que N<sub>f</sub> y B<sub>2</sub> no tienen efecto primario sobre la síntesis de proteínas sino que alterarían algún otro evento metabólico indirectamente relacionado.

EFFECTOS DE ANTIOXIDANTES QUIMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA CADENA RESPIRATORIA DEL TRYPANOSOMA CRUZI. (Effects of chemical antioxidants over the growth and the respiratory chain of T. cruzi).

Morello, A., Aldunate, J., Ferreira, J., Repetto, Y. y Letellier, M.E. Departamento de Bioquímica y Química. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Casilla 70086 Santiago - 7 Chile.

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo T. cruzi. Este mal es endémico en Centro y Sudamérica; en Chile afecta aproximadamente a 400 mil personas. Las drogas actualmente en uso no son satisfactorias. El estudio de las diferencias bioquímicas entre parásito y huésped ha contribuido a explicar el modo de acción de drogas en uso y experimentales.

Se realizaron experimentos con epimastigotes intactos de T. cruzi (cepa Tulahuen). Los antioxidantes usados fueron tert-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-p-cresol (BHT), ácido gálico y sus propil y metil ésteres, catequina y ácido ascórbico.

El BHA y el BHT fueron los mejores inhibidores del crecimiento de T. cruzi a concentraciones bajo 0,5 mM, seguidos por el ácido gálico y sus ésteres y la catequina. El ácido ascórbico no tuvo efecto.

El consumo de oxígeno de epimastigotes fue inhibido en un 90% por 1 mM BHA o BHT. El ácido gálico y sus ésteres inhibieron el consumo en menor proporción. Al estudiar los cambios de los niveles redox en la cadena respiratoria (NAD(P), citocromos b, c y a) por efecto de estos inhibidores se comprobó que el NAD(P) se redujo y todos los citocromos se oxidaron. Esto indicaría que estos compuestos químicos actúan inhibiendo la cadena respiratoria en el segmento NAD(P)-citocromo b.

Experimentos realizados con tripomastigotes de Trypanosoma brucei indican que BHA inhibe el consumo de oxígeno y actuaría en forma similar a como lo hace sobre T. cruzi. Financiado por UNDP/WB/WHO/TDR, por CONICYT-CHILE y por la Universidad de Chile (grant. B-1854).

# Simposio

## ENSEÑANZA DE LA BIOQUIMICA I

Coordinador: *Arnaldo Foradori*

ORGANIZACION DE UN SISTEMA DE DIVULGACION CIENTIFICA MASIVA (Organization of a system for providing scientific information to the general public). Belocopitow E.

Centro de Divulgación Científica y Técnica.  
Sede: Instituto de Investigaciones Bioquímicas.  
Patricias Argentinas 435. 1405 Buenos Aires.  
Se encara la concientización de los argentinos sobre la necesidad de un mayor uso de la ciencia y su producto, la tecnología. Se propone la introducción de esta temática en los medios de comunicación social (Diarios, revistas, radio y TV) en forma intensiva. Se concluyó que el mejor hacedor de la información a introducir en dichos medios, sería una simbiosis, de investigador científico, quien proveería la información, y de periodista quien la procesaría para hacerla entendible, atractiva y capaz de penetrar en los medios masivos.

Esta asociación de investigador científico y periodista operaría en las instituciones en que desarrollan su trabajo los investigadores, las que normalmente cuentan con una buena biblioteca, constantemente actualizada.

Este sistema fue ensayado y sus resultados serán expuestos.

Se prevee la extensión del sistema ensayado a otros centros de concentración de investigadores científicos de nuestro país.-

LA ENSEÑANZA DE PREGRADO DE BIOQUIMICA EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA P.U.C. (Pregrade Biochemistry Teaching at the Medical Faculty of the P.U.C.).

Dr. Foradori A. Depto de Hematología/Oncología y UDA de Laboratorios clínicos - Fac. Medicina - Pontif. Univ. Católica - Santiago (Chile).

La estructura curricular para la enseñanza de la Medicina en la facultad de la Univ. Católica contempla 3 etapas de Formación e Información: 1.- Básico (corresponde a la Docencia de Asignaturas como Matemática, Física, Química General y Orgánica, Biología general y Citología etc), esta entregada a las Facultades ad hoc y en la Facultad de Medicina se completa el Estudio de la Biología del Hombre normal y la preparación científica básica (6 semestres); 2.- Patología y sus agentes (corresponde al estudio intensivo de los Agentes de las Enfermedades y las características morfológicas incluye Microbiología, Patología General Especial). En esta etapa además se analizan las drogas y fármacos vigentes (2 semestres); 3.- Clínica (se aplican los conocimientos previos a la persona enferma y se delinea la estrategia de recuperación de Salud (8 semestres con 4 de práctica inclusiva). La Bioquímica prop. tal se estructura en el tercer semestre y su contenido curricular se caracteriza por la integración de conocimientos de Química General y Orgánica con fenómenos Biológicos Relevantes (Biomoléculas, Metabolismo Intermedio, Biología Molecular e Hidrosalino. Se destaca la Metodica de auto aprendizaje con clases expositivas de refuerzo realizados por un grupo de Médicos Bioquímico. En forma periódica (aprox. c/2 semanas) se realizan seminarios de discusión y análisis de publicaciones relevantes o casos de interés que refuerzen el contenido a las clases. También es relevante la entrega previa a las clases expositivas del material gráfico que se usa en las clases. Lamentablemente la actividad experimental se ha suprimido (sólo se mantiene en forma optativa). Se presenta el modelo de docencia de la macromolécula de Hemoglobina y transporte de Oxígeno.

MUCHO SE PUEDE HACER ANTES QUE LLEGUEN LAS COMPUTADORAS. (Much can be done before the computers arrive). *Saffran, M.* Department of Biochemistry, Medical College of Ohio, Toledo, Ohio 43699 USA.

Computers are potentially great aids to learning and teaching. Until computers become available some of the characteristics of the computer can be reproduced by other teaching methods. (1) Student participation in learning can be achieved through classroom discussions and by the preparation of audiovisuals and examination questions by students. (2) Game-playing can be achieved by contests in biochemical knowledge and problem solving among individuals and between teams. (3) Instant feedback and evaluation are achieved by various forms of objective examinations. (4) Repetition and drill, especially in algebraic manipulations (e.g. buffers, enzyme kinetics), can be achieved with nomograms and slide rules. (5) A Computer Game can be used to combine most of the characteristics by having an instructor or even a student play the role of the computer, while other students take turns as "users". The rest of the class are spectators and learn through the efforts of the participants, while they wait for their own turn to play the game. The Computer Game prepares instructors and students for the coming of computers by teaching the steps used in developing and using computer-assisted instructional programs. (6) Some of the graphic power of computers can be approached by conventional audiovisual methods, particularly the overhead projector.

## ENSEÑANZA DE LA BIOQUIMICA II

Coordinador: *Luis Izquierdo*

ENSEÑANZA DE POSTGRADO EN BIOQUIMICA EN CHILE. EL PROGRAMA DE DOCTORADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. (Postgraduate teaching in Biochemistry in Chile. The doctorate program of the Faculty of Sciences of the University of Chile).

Babul, J. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las universidades chilenas ofrecen actualmente cinco programas de Magister y cuatro de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular. El Programa de Doctorado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile es el más antiguo y se inició en 1971. Depende administrativamente de la Escuela de Postgrado de esa Facultad, sin embargo cuenta con la colaboración de numerosos investigadores de otras facultades, tanto de la Universidad de Chile como de otras universidades del país.

La actividad fundamental del Plan de Estudios es la realización de la tesis, pero además incluye cursos, seminarios (bibliográficos, de investigación, de avances de tesis) y unidades de investigación. Finalizados los cursos recomendados, se debe aprobar un Examen de Calificación en el que se exige la presentación de una revisión bibliográfica crítica. Posteriormente, se debe presentar un proyecto de tesis bajo el patrocinio de un profesor. El trabajo de tesis se evalúa anualmente (avances de tesis). La defensa de tesis es una presentación oral ante una comisión ad hoc. El Examen de Grado es un acto público donde el candidato muestra su trabajo a la Comisión de Postgrado y a la comunidad académica. Desde 1971 ingresaron 78 alumnos (60% Bioquímicos, 14% Licenciados en Biología, 13% Químicos Farmacéuticos), 26 se graduaron (73% Bioquímicos, 20% Licenciados en Biología) y 30 se retiraron (50% por cambio a otro Programa). El promedio de duración de la residencia es de 5,5 años. El 70% de los graduados se desempeña en universidades chilenas.

EL PROGRAMA DE POSGRADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE SAO PAULO. (The graduate program at the Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of Sao Paulo. A study case). Chaimovich, H. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

The aim of this presentation is to describe the evolution of the graduate program at the Department of Biochemistry of the Institute of Chemistry at the University of São Paulo (QBQ). The program. Leading to MSc and PhD degrees, started in 1970 placing a heavy emphasis in research for both degrees. The evolution of scientific production, as measured by the total number of publications from the QBQ, shows a rapid increase from 1970 up to 1978 where a (slow rising) plateau was reached. In the last five years publications amount to ca. 1.4/research advisor/year and the value of the parameter [publications/(MSc + PhD)] is ca.4. These figures show a good correlation with the initial investment made in the Department by a Project-oriented program judged, by an international panel on a merit basis. After 15 years, the adolescence problems of the program, including expansion, redefinition of goals, new investments, areas of interest are begging to be felt. The problems of the graduate program will have to be solvent within the framework of the Brazilian Policy for Science and Technology for the next decade which includes, as one of its major goals, a ten-fold increase in the number of scientists involved in Biotechnology, including Biochemistry.

## METABOLISMO DE OLIGO Y POLISACARIDOS I

Coordinador: *Horacio G. Pontis*

POLISACARIDOS SOLUBLES DE ALGAS. (Soluble polysaccharides from seaweeds). Matsuhiro, B. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Los polisacáridos de interés económico de macroalgas de las divisiones Phaeophyta y Rhodophyta localizados en la pared celular o en la matriz intercelular, pueden extraerse con agua a diferentes pH.

Poco se conoce sobre las rutas bioquímicas y biofísicas de la síntesis, transporte, secreción y ordenamiento extracelular de los mismos.

Las estructuras químicas de estos polisacáridos varían desde estructuras irregulares a otras más regulares con menor número de monosacáridos constituyentes con la evolución de las algas.

Los polisacáridos extraídos de especies de las familias Gigartinales y Gelidiales (Rhodophyta) se estudiaron por hidrólisis total, metanálisis, fraccionamiento, metilación, cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas. De los resultados obtenidos y de otros de literatura, se concluye que todos los polisacáridos de algas rojas, carragenanos, irideanos y agaranos son mezclas de galactanos con diferente grado de sulfatación y diferente contenido de 3,6-anhidrogalactosa.

Interesantes resultados, que no concuerdan con algunos descriptos en la literatura se han encontrado para los polisacáridos provenientes de diferentes fases del ciclo de vida de *Chondrus canaliculatus*, *Iridaea membranacea*, *I. ciliata* e *I. laminarioides*.

De *Lessonia trabeculata* (Phaeophyta) por extracción secuencial se obtuvieron diferentes polisacáridos cuyas estructuras corresponden a laminarano, fucanos y ácido alginico.

GLYCOGEN SYNTHESIS IN THE MICROINJECTED FROG OOCYTE. (Síntesis de glicógeno en oocitos microinyectados de rana). Radojković, J. and Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Stage VI frog oocytes metabolize glucose mainly for glycogen synthesis inasmuch as neither glycolysis nor gluconeogenesis are operative at this stage because of the absence of phosphofructokinase and fructose-1,6-bisphosphatase activities. Thus, these cells serve as a convenient model for the study of polysaccharide deposition from glucose.

Unlabeled microinjected glucose 6-P, glucose 1-P, fructose 6-P or UDPglucose do not dilute the incorporation of microinjected labeled glucose even at a ten-fold excess. On the other hand, CO<sub>2</sub> production is markedly depressed by the intermediates with the only exception of UDPglucose. A rather drastic change can be observed if the intermediates are microinjected in cells incubated in a medium containing labeled glucose. Under these conditions, isotopic dilution was observed with the exception of fructose 6-P.

The results suggest that a classic pathway of glycogen synthesis operates in amphibian oocytes incubated in a glucose-containing medium. However, microinjected glucose seems to follow a different pathway which does not involve glucose 6-P, glucose 1-P or UDPglucose. The participation in this pathway of amylo-1,6-glucosidase seems unlikely. A few preliminary experiments suggesting the participation of triose-P in the suggested pathway will be presented. (Supported by the Departamento de Investigación y Bibliotecas, Universidad de Chile).

SUCROSIL OLIGOSACARIDOS: SU ROL COMO SUBSTANCIAS PROTECTORES FRENTE A FENOMENOS ADVERSOS EN PLANTAS. UNA VISION GENERAL. (Sucrosyl oligosaccharides: its role as protecting substances against adverse conditions in plants. An overview.) Pontis, H.G. Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, y Centro de Investigaciones Biológicas (F.I.B.A.), Casilla de Correo 1348, 7600 Mar del Plata.

Los sucrosil oligosacáridos, o sea aquellos basados en la molécula de sacarosa, constituyen un grupo importante dentro de los oligosacáridos primarios. Se encuentran libres en las células vegetales en cantidades significativas. Son el resultado de que en algún momento de la evolución de las plantas se "inventaron" actividades enzimáticas capaces de sintetizar oligosacáridos adicionando restos glicosilos, ya sea a la mitad glucosa o a la mitad fructosa de la sacarosa. Se encuentran ampliamente distribuidos y cumplen una función no solamente de reserva sino que también aparecen como cumpliendo una función protectora frente a algunas situaciones de stress, en particular fría.

Esta función está bien estudiada para los oligosacáridos de la familia de rafinosa donde se ha demostrado la dependencia con la temperatura y además con el fotoperíodo. En el caso de la familia de fructanos, se ha determinado una correlación entre la temperatura del suelo y el nivel de cada término de una serie de fructanos presentes en tubérculos de *Helianthus tuberosus*, mientras que en aquellas plantas como trigo, donde la parte aérea está expuesta a las distintas condiciones climáticas, se observa una acumulación de polímeros después de un shock de frío. Este último sistema se usa para determinar cómo se afectan las distintas actividades enzimáticas al producirse la situación de stress y su cese.

Apoyado por CONICET y CIC.

FOSFORILASA EN AMILOPLASTOS DE TUBERCULO DE PAPA. (Phosphorylase in potato tuber amyloplasts). Tandecarz, J.S., Moreno, S. y Cardini, C.E. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Se han descripto en células de plantas superiores múltiples formas de fosforilasa separables por métodos cromatográficos o electroforéticos. Steup y Laszko (Planta 145, 69, 1979) lograron definir claramente fosforilasas citosólicas y plastidiales en tejidos fotosintéticos. Se ha postulado que amiloplastos y cloroplastos están ontogénicamente relacionados. Sin embargo, es probable que los mecanismos que operan en la formación y degradación de almidón de reserva en amiloplastos sean diferentes de los que operan en la asimilación de almidón en cloroplastos, donde el control se ejercería vía el translocador de fosfato. Por medio de técnicas inmunológicas, Schneider y col. describieron la localización de fosforilasa exclusivamente en amiloplastos de tubérculo de papa durante el período de acumulación de almidón, sugiriendo que la enzima podría desempeñar también un papel en la síntesis y no sólo en la degradación del polisacárido.

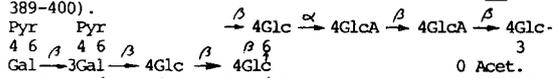
Se estudió el perfil de fosforilasa de amiloplastos de tubérculo de papa y se encontró una forma molecular principal capaz de sintetizar "in vitro" un  $\alpha$ -glucano unido a proteína en ausencia de polisacárido exógeno. Se encontró que esta enzima, al igual que la fosforilasa de cloroplastos, tiene menor afinidad por los glucanos aceptores que la citosólica de hoja de espinaca y que la fosforilasa I de papa. Se hace un estudio comparativo de las propiedades estructurales y cinéticas de las enzimas plastidiales y citosólicas.

METABOLISMO DE OLIGO Y POLISACARIDOS II

Coordinador: *Rodolfo Ugalde*

BIOSINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS EN RHIZOBIUM TRIFOLII. (Exopolysaccharide biosynthesis in *Rhizobium trifolii*) Dankert, M.A., Bossio, J.C. and Iñón de Iannino, N. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y CONICET, Buenos Aires, ARGENTINA.

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por los rizobios parecen desempeñar un papel crítico en la etapa de infección a la raíz de las leguminosas. Las estructuras de muchos de estos EPS han sido aclaradas, pero se sabe poco de su biosíntesis. *Rhizobium trifolii* infecta y no dula trebol rojo y produce un EPS con la siguiente estructura (Robertsen et al. (1981) Plant Physiol. 67, 389-400).



Se está estudiando la síntesis in vitro de este EPS utilizando células permeabilizadas con EDTA como fuente de enzimas y UDP-Glc, UDP-GlcA, UDP-Gal, PEP y Acetyl CoA, indistintamente radiomarcados, como dadores de azúcares y de piruvato y acetato respectivamente. En una primera etapa se ha estudiado la síntesis de precursores lipídicos y se ha logrado aislar una serie de compuestos con las propiedades esperables: son solubles en cloroformo-metanol-agua (1:2:0,3); por tratamiento a pH2, 10', 100°C liberan distintos oligosacáridos; en medio al calino producen los respectivos ésteres fosfóricos cíclicos, y por reducción con H<sub>2</sub>Pt liberan los difosfóricos, etc. Fraccionados por cromatografía en columnas de DEAE celulosa se obtienen dos grupos de compuestos. En la fracción I se ha podido caracterizar al trisacárido GlcA  $\xrightarrow{\beta}$  4GlcA  $\xrightarrow{\beta}$  4Glc y a su derivado acetilado (por hidrólisis y reducción total y parcial, permetilación, degradación enzimática, etc.) Dentro de la fracción II se ha logrado identificar, por criterios similares, al octasacárido correspondiente a la unidad repetitiva y a su derivado mono o dipiruvilado.

ROLE OF POLYSACCHARIDES IN PLANT INFECTION BY RHIZOBIUM AND AGROBACTERIUM. (Rol de polisacáridos en la infección de plantas por *Rhizobium* y *Agrobacterium*). R. Ugalde, A. Zorreguieta, S. Cavaignac, R. Geremia and A. Coira. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, F.C.E. y N., Fundación Campomar and CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Plant infection by *Rhizobium* or *Agrobacterium* leads to the formation of nitrogen fixing nodules or tumors. Bacterial polysaccharides have been proposed to have a role in plant infection by these bacteria. In *R. meliloti* we have described a cell wall polysaccharide containing galactose and galacturonic acid that leads to increased competitiveness. This effect was attributed to faster nodulation. *Rhizobium* and *Agrobacterium* form  $\beta$ 1-2 cyclic glucan, through a protein linked intermediate. This protein intermediate is a 235 K inner membrane protein. Avirulent attachment defective mutants of *A. tumefaciens* do not form  $\beta$ 1-2 glucans due to the absence of the 235 K protein. A *R. meliloti* mutant which induces formation of pseudonodules was found not to form  $\beta$ 1-2 glucans and like the avirulent mutants of *A. tumefaciens* not to have the 235 K inner membrane protein. These results suggest a role for  $\beta$ 1-2 glucans in plant infection by *Rhizobium* and *Agrobacterium*.

# Simposio

## GLICOPROTEINAS

Coordinador: *Federico Leighton*

**SINTESIS Y UTILIZACION DE NUEVAS SONDAS FOTOREACTIVAS DE RIVADAS DE NUCLEOTIDOS DE PIRIMIDINA** (Synthesis and use of new photoreactive probes derived from pyrimidine nucleotides) C. Abeijón<sup>+</sup>, J.M. Capasso<sup>+</sup>, D. Tal, W.F. Vann y C.B. Hirschberg. <sup>+</sup>Depto. Biología, FCEyN (UBA) Buenos Aires Argentina y Dept. of Biochem. St. Louis University, St. Louis, MO. 63204.

La técnica de marcado por fotoafinidad ha sido exitosamente utilizada para identificar un gran número de proteínas que interactúan con ATP y GTP, mediante sus azido derivados. Desafortunadamente se ha carecido hasta ahora de derivados fotoreactivos de nucleótidos pirimídicos.

Nosotros hemos conseguido sintetizar 3'-O-(4-Benzoil) Banzoil-Citidina 5'-nucleótidos, tanto con tres fosfatos (BB-CTP), como con uno (BB-CMP). La estructura de los mismos ha sido confirmada por: 1) Cromatografía de intercambio iónico, 2) Cromatografía en capa delgada de celulosa, 3) Análisis de productos después de hidrólisis química y enzimática, 4) Comportamiento cromatográfico después de irradiación con UV, 5) Análisis espectrofotométrico y 6) Espectrometría de <sup>1</sup>H-NMR.

El BB-CTP resultó ser sustrato de enzima CMP-Ac. Siálico sintetasa; y el BB-CMP un potente inhibidor competitivo del transportador de CMP-Ac. Siálico del Golgi, lo cual demuestra que el grupo fotoreactivo no altera la interacción de estas moléculas con los centros activos de las proteínas correspondientes.

Cuando una preparación cruda de la enzima CMP-Ac. Siálico sintetasa de *E. coli* fue irradiada en presencia de BB-CTP y fraccionada en geles de poliacrilamida, una sola banda pudo ser detectada por radioautografía, en medio de un gran número de ellas que son detectadas por tinción con plata, lo cual demuestra la sensibilidad y especificidad de las nuevas sondas.

**DETERMINANTES DEL FENOTIPO EN CELULAS EPITELIALES: ESTUDIO EMPLEANDO GENES NATIVOS Y MODIFICADOS DE GLICOPROTEINAS VIRALES.** González, A., Rizzolo, L., Gottlieb, T. y Sabatini, D.D.

Depto. Biología Celular, NYU MED CTR, USA, y Fac. Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

Las células de epitelios transportadores poseen polos apicales y basolaterales funcional y morfológicamente diferentes, separados por uniones estrechas. Este fenotipo parece ser mantenido dinámicamente por un sistema que seleccionaría y transportaría glicoproteínas específicas desde el Golgi a la membrana plasmática de uno u otro polo. Las ideas básicas sobre este tráfico vectorial de proteínas, cuyo mecanismo es desconocido, han surgido de estudios en células MDCK infectadas con virus que poseen envoltura. En esta línea celular, derivada de riñón de perro, la yemación del virus influenza ocurre preferencialmente por el polo apical, en cambio, la del virus de la estomatitis vesicular se produce por el polo basolateral. En ambos casos, este proceso es precedido por la acumulación de las respectivas glicoproteínas de la envoltura viral, hemaglutinina (HA) y proteína G, en el dominio correspondiente de la membrana plasmática. Estas proteínas exhiben segmentos citoplásmicos, intramembranosos y extracelulares con respecto a la bicapa.

En el actual trabajo hemos utilizado un conjunto de técnicas de DNA recombinación y de transfección de genes en células eucariotas para analizar los determinantes moleculares del tráfico intracelular de estas proteínas. Las evidencias sugieren que la HA y la proteína G contienen en su estructura la información necesaria para su inserción asimétrica en distintos polos de las células MDCK, independientemente de otras proteínas virales. Para que esta información sea efectiva serían necesarios sus segmentos intramembranosos y citosólicos. La proteína G contendría, además señales que la incorporarían a la vía endocítica.

**ENZIMAS LISOSOMALES. SINTESIS Y TRANSLOCACION HACIA LOS LISOSOMAS.** (Lysosomal enzymes. Synthesis and targeting to lysosomes).

\*Couso, R., Lang, L. y Kornfeld, S.

The Washington University School of Medicine. Department of Internal Medicine and Biological Chemistry. \*Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires, ARGENTINA

La síntesis y transporte de las enzimas lisosomales hacia los lisosomas en células de mamíferos, ha sido objeto de un intensivo estudio en esta última década. Las enzimas lisosomales sintetizadas "de novo" adquieren en los oligosacáridos residuos fosfomanosa que actúan como marcador de reconocimiento que media la unión a receptores específicos (receptores de manosa-6P) y "targeting" hacia los lisosomas.

Si bien se conocía que organismos eucarióticos simples poseen enzimas lisosomales, no se sabía si los mismos utilizaban el "pathway" de la manosa-6P para la translocación de las mismas hacia los lisosomas. En este estudio se demuestra que la ameba del suelo *A. castellanii* y la ameba vegetativa del "slime mold" celular *D. discoideum* poseen una enzima que, utilizando como sustrato UDP-GlcNAc, transfiere glucosamina-1P a oligosacáridos de alta manosa. La especificidad de sustrato de las enzimas de ambas amebas se estudió en paralelo con la ya conocida UDP-GlcNAc: enzima lisosomal N-acetil glucosamina fosfotransferasa de Golgi de hígado de rata, primera enzima responsable de la síntesis del marcador de reconocimiento (manosa-6P) en mamíferos. La enzima de *A. castellanii* es similar a la enzima de mamíferos en cuanto a que es capaz de reconocer el determinante proteico común presente en las enzimas lisosomales. Por el contrario la transferasa del *D. discoideum* no posee dicha propiedad.

**TOPOGRAFIA DE LA GLICOSILACION EN EL APARATO DE GOLGI Y RETICULO ENDOPLASMICO** (Topography of glycosylation in the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum) Carlos B. Hirschberg, Claudia Abeijón, Juan Capasso, Susan L. Deutscher, Mary Perez and Naziha Nuwayhid. Department of Biochemistry, St. Louis Univ. School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA.

La glicosilación y sulfatación de proteínas y glicosaminoglicanos ocurre en el lumen del retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi (AG). Dado que los donantes de azúcares y sulfato en dichas reacciones (nucleótidos azúcar y PAPS) se sintetizan en el citosol, surge la pregunta: ¿De qué manera estos sustratos son transportados hacia el lumen de los anteriores organelos? Utilizando enfoques bioquímicos, de biología celular y genéticos, hemos demostrado que en la membrana del AG existen transportadores específicos de nucleótidos azúcar y PAPS. Estos sustratos serían transportados desde el citosol hacia el lumen a través de un intercambio con el nucleósido mono fosfato correspondiente.

Por otro lado, en el RE, la N-glicosilación se inicia con la adición de la N-acetilglucosamina, manosa y glucosa al dolicol fosfato. Hemos demostrado en la membrana del RE la presencia de transportadores de UDP-GlcNAc y UDP-glucosa pero no de GDP-manosa, lo cual sugiere que la síntesis de dolicol-oligosacáridos ocurre asimétricamente con respecto a la membrana del RE.

Podemos concluir que la glicosilación de macromoléculas presenta una topografía diferencial con respecto a la membrana de distintos organelos.

THE MECHANISM OF PROTEIN N-GLYCOSYLATION IN TRYPANOSOMATIDS. Parodi, A.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", A. Machado 151, 1405 Bs.As. N-glycosylation in eucaryotes is initiated by the transfer of an oligosaccharide (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) from P-P-dolichol to asparagine residues in incompleated polypeptide chains. Once transferred, the oligosaccharide moieties are processed (removal and addition of monosaccharides) to yield high mannose-, hybrid- or complex-type saccharides. We have previously reported that, depending on the species, trypanosomatids synthesized and transferred to proteins "in vivo" P-P-dolichol-linked Man<sub>6,7</sub> or Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. We have now conducted a cell-free characterization of the enzymatic defects responsible for this phenotype: all species tested were defective in the formation of Glc-P-dolichol, the donor of glucoses in the complete oligosaccharide. Species that "in vivo" transferred Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> or Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> were devoid of the 7th., 8th., and 9th. mannosyltransferases or of the 8th. and 9th. transferases, respectively. On the other hand we have observed in the pathogen *Trypanosoma cruzi* another so far unique feature in protein N-glycosylation: the modification of the oligosaccharide transferred upon differentiation. Whereas in epimastigotes (insect vector stage) and in amastigotes (mammalian intracellular stage) the sole compound transferred was Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, in trypomastigotes (bloodstream stage, infective form) both Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> and Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> were transferred. The structure of Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> formed by processing of protein-linked Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> was different from that of Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> transferred from the P-P-dolichol derivative. Supported by WHO and CONICET.

RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO (HC): ESTRUCTURA, BIOSINTESIS Y PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA. (Growth hormone receptor: structure, biosynthesis and purification of the glycoprotein). Szecówka, J. Dept. of Physiol., U. Massachusetts Med. Center y Depto. de Ciencias Fisiol., P. U. Católica de Chile.

<sup>125</sup>I-HC se ligó con receptores específicos en la membrana celular de adipocitos de rata. Esta unión se hizo covalente con sustrato de succinimidato. Usando electroforesis en condiciones reductoras, el producto principal de estas reacciones se identificó como un complejo de un peso molecular (PM) de 130 kDa (receptor + <sup>125</sup>I-HC).

La lectina de trigo (100 nM) inhibe el ligamen específico de HC. Para obtener claras evidencias que el receptor es una sialoglicoproteína, se realizaron experimentos con dos glicosidasas: Con neuraminidasa (5 U/ml) el PM del receptor disminuyó 10 kDa, y con endoglicosidasa F 20 kDa. Para dilucidar las vías de biosíntesis y la importancia de carbohidratos en el receptor, se realizaron experimentos con dos inhibidores de la glicosilación de proteínas: Con swainsonina el PM del receptor sintetizado "de novo" disminuyó 10 kDa, y con tunicamicina 20 kDa. Sin embargo, aquellas formas del receptor, incompletamente glicosiladas, se incorporan en la membrana celular y conservan su capacidad del ligamen específico de HC.

El Triton X-100 solubilizó el receptor, preservando su especificidad y afinidad. El carácter sialoglicoprotéico del receptor permitió su purificación a homogeneidad en dos subsecuentes cromatografías de afinidad: 1- con la lectina de trigo, 2- con HC. El receptor purificado tiene PM aproximado de 500 kDa y está formado por cuatro proteínas, aparentemente unidas con puentes disulfuros, de PM: 180, 130, 105 (la subunidad del ligamen) y 80 kDa.

PROTEINAS CROMOSOMALES:  
 PROLIFERACION Y DIFERENCIACION CELULARES

Coordinador: *María Imschenetzky*

**DOMINIOS ESTRUCTURALES DE PROTEINAS INVOLUCRADAS EN COMPLEJOS NUCLEOPROTEICOS DEL NUCLEO CELULAR.** (Estructural domains of proteins involved in nucleoprotein complexes of the nucleus). Bach, M., Parera, M. y Palau, J. Depto. Biología Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo, C.S.I.C., Barcelona, España.

Los cambios conformacionales en complejos nucleoproteicos facilitan con toda seguridad el funcionamiento de diversos procesos celulares, entre los que cabe incluir la proliferación y la diferenciación. Nuestro laboratorio ha venido estudiando la conformación del grupo de proteínas HMG de alto peso molecular -M. Carballo et al., *Embo J.* 2, 1759(1983), M. Carballo et al., *Embo J.* 3, 1255(1984). En estos trabajos se demuestra que existe una función diferenciada de los diversos dominios que incluye la interacción con el DNA y la interacción con la histona H1. En la actualidad se ha procedido a establecer una regionalización de la interacción con la histona H1 y se ha demostrado que el dominio C-terminal de la histona H1 es la región más idónea para interactuar con el dominio C-terminal de la proteína HMG. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos de enclaje en la cromatina que facilitan los cambios de compactación originados en diversos procesos biológicos. Otra proteína estudiada (el antígeno nuclear SS-B) está relacionada con el transporte de ácidos nucleicos de pequeño tamaño (SN RNA). Los resultados indican que en la molécula de SS-B existe un dominio estructural de 30KD que está fosforilado a distintos niveles y presenta interacción máxima con los conjuntos de RNA. Existen además otros 2 dominios de 17 y 6 KD que probablemente están implicados en la función de transporte en la célula de un flujo muy diverso de ácido ribonucleico.

**ATYPICAL CHROMOSOMAL PARTICLES DURING EARLY EMBRYOGENESIS OF SEA URCHINS.** M. Imschenetzky, M. Puchi, and R. Massone. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile.

During early developmental stages of sea urchins three sets of genes are sequentially expressed: those genes coding for CS chromosomal proteins; those coding for early histone variants ( $\alpha$  type) and those coding for late variants ( $\alpha, \beta, \gamma$ , and  $\epsilon$  types). This differential gene expression determines shifts in nucleosome populations that have been demonstrated by nuclease digestion studies. At present the nature of the very early nucleoparticles is unknown.

To obtain information about the protein components that are forming the very early nucleoparticles we have isolated and characterized the CS chromosomal proteins by conventional methods. The results obtained revealed that, unlikely the typical histone complement, seven major proteins are found, specified CSA; CSB; CSC; CSD; CSE; CSF and CSG. The electrophoretic migration of these proteins is consistent with histones but their amino acid compositions are markedly different. In addition each one of these major fractions is electrophoretically heterogeneous in two dimensional gels.

To obtain a direct evidence on the involvement of CS chromosomal proteins in nucleoparticles present in very early cleavage cells, the isolation of particles derived from nucleases digestion was performed on 1% agarose gels and their protein content was analyzed by PAGE/SDS gels. The results obtained indicate that seven major proteins are forming these particles, these fractions comigrate with the CS chromosomal proteins isolated by classical methods.

Taking all these data together it seems clear that during early developmental stages the chromatin is arranged into particles different from the nucleosomes. The term embryosomes is proposed to nominate these particles. (Proyectos: 20.31.06, 2031.11. U. de Concepción. 1082/85 FONDECYT.

**STUDIES ON SPERMIOGENESIS, FERTILIZATION AND DEVELOPMENT WITH *Choromytilus chorus*.** (Estudios sobre espermiogénesis, fertilización y desarrollo en *Choromytilus chorus*) L.O. Burzio, M. Brito, J. Carcano, A.M. von Christar, I. Concha, J. Figueroa, E. Gutiérrez and J.C. Vera. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

In the sperm of most animals the DNA is associated with basic proteins, which vary significantly in each particular species. Three major basic polypeptides were identified in the sperm of *Ch. chorus*. They were purified using selective solubilization with acetic acid and HCl, and by chromatography on Sephacryl S-200 equilibrated with 10 mM HCl and 6 M urea. The most abundant polypeptide has a MW of 4,500 and the amino terminal residue is Pro. More than 50% of the amino acids correspond to Lys plus Arg. This characteristics are typical of protamine-like proteins. The other two components shared several properties of histones H1. Several evidences suggest that these polypeptides could be used as differentiation markers during spermiogenesis in *Ch. chorus*.

The optimal conditions for fertilization and development of *Ch. chorus* embryos were established (oocytes:sperm ratio to avoid polyspermy; incubation temperature; salinity and number of embryo per ml). At 72 h post fertilization more than 70% of the fertilized oocytes developed the primary shell. The different development stages have been used to study the switch of histones during the differentiation process. (Supported by Grants S-85-10; FONDECYT 1039-85; Graduate Program Project of OAS).

**SUBCELLULAR LOCALIZATION OF HUMAN HISTONE mRNA AND THE INVOLVEMENT OF THE 5' LEADER SEQUENCE IN HISTONE mRNA STABILITY** (Localización subcelular de RNAm de histona humana y la relación de la secuencia "leader" 5' en la estabilidad del RNAm de histona). Stein, G. and Stein, J. University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL. USA.

It is well established that cell cycle dependent human histone mRNA is selectively destabilized when DNA synthesis is terminated. Mechanisms accomplishing this selective destabilization may require specific targeting sequences or structures within the mRNA itself. In addition, the microenvironment in which the histone mRNAs reside contribute to the ability of the cell to modulate histone mRNA stability in conjunction with DNA synthesis.

To identify destabilization targeting sequences or structures in a cell cycle dependent human H<sub>3</sub> histone mRNA, we have constructed fusion genes in which fragments of the histone mRNA coding region are fused to fragments of genes not expressed in a cell cycle dependent manner. Two of these fusion constructs suggest that the first twenty nucleotides of the H<sub>3</sub> histone mRNA leader region are sufficient to couple histone mRNA stability with DNA replication.

To assess the possible relationship between the microenvironment of the histone mRNAs and the regulation of histone mRNA levels, we have examined the subcellular distribution of histone mRNA. The distribution of histone mRNAs on free and membrane bound polyosomes was examined as well as the association of histone mRNA containing polyosomes with the cytoskeleton. Histone mRNAs were localized predominantly on the free polyosomes. In addition, histone mRNAs were found on the cytoskeleton fraction which suggests that the histone mRNA containing polyosomes are associated with the cytoskeleton.

PROTEINAS CROMOSOMALES EN TRYPANOSOMA CRUZI (Chromosomal proteins in *Trypanosoma cruzi*). Toro, C.; Morales M. y Galanti, N. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas. Presenta tres formas: amastigote (intracelular y replicativa), epimastigote (extracelular y replicativa) y tripomastigote (extracelular, no replicativa e infectiva). En este trabajo se describe la presencia de histonas y de proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética (HMG) en *T. cruzi*.

Se obtuvo cromatina de epimastigote en cultivo y se extrajo histonas en  $H_2SO_4$  0.4 N y proteínas HMG en ácido perclórico 0.75 M. Las proteínas cromosomales dializadas y liofilizadas se analizaron en geles de poliacrilamida en una y en dos dimensiones.

Se demostró la presencia de 6 proteínas básicas de bajo peso molecular y carentes de triptofano, con características de migración similares a histonas de espermios de erizo de mar, hígado de rata y timo de ternera. La electroforesis en dos dimensiones mostró la presencia de variantes en la mayoría de las histonas de *T. cruzi*. Por solubilidad en ácido tricloroacético 5%, en ácido perclórico 0.75 M y en diferentes concentraciones de NaCl, una de estas proteínas presentó características similares a  $H_4$ .

Por otra parte, se encontró proteínas con características de solubilidad y de movilidad electroforética que corresponden a las HMG de timo de ternera.

En consecuencia, la cromatina de *T. cruzi* presenta constituyentes proteicos similares a los descritos para eucariontes superiores, aunque existen diferencias evidentes. Estos resultados permitirán estudiar la eventual participación de estas proteínas cromosomales en procesos de proliferación y diferenciación de *T. cruzi*. (Proyectos B-2365/8613 D.I.B.; FONDECYT y UNDP/WB/WHC/ TDR ID 820599).

## INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

Coordinadores: Carlos Jerez, Alejandro Venegas

AVANCES RECIENTES EN LA SINTESIS DE DNA Y RNA. SINTESIS QUIMICA DE GENES, CLONAMIENTO, EXPRESION. (Recent developments in DNA/RNA synthesis. Chemical gene synthesis, cloning and expression). Alvarado Urbina, G.<sup>a</sup>, Chiarello, R.<sup>b</sup>, Crea, R.<sup>c</sup>. a-Meigenetics Research Corporation, 1716 Woodward Dr. Ottawa, Canada. b-IGB Products Ltd., 14310 Catalina St. San Leandro, CA 94577 USA. c-Creative Biomolecules Inc. 35 South St. Hopkinton, MA 01748 USA.

El desarrollo reciente de la síntesis automatizada de ácidos nucleicos sobre soporte polimérico ha permitido la construcción de oligonucleótidos en forma eficiente y rápida, como resultado la síntesis total de genes es factible. Ejemplos de diseños y de síntesis de genes de 455 a 1600 pares de bases serán presentados. Estrategias de diseño de genes de tipo 'cassette' serán analizadas, conjuntamente con la expresión en *Escherichia Coli*, mediante vectores diseñados para alto nivel de expresión. Obtención de análogos- mutagénesis sitio-específica. La síntesis automatizada de fragmentos de 15 a 52 bases se efectuó utilizando diversos soportes poliméricos con la activación *in situ* de fosforamidas (1). El sintetizador automático es controlado por un computador personal- IBM o Commodore-64. La descripción completa del aparato, como asimismo diferentes programas serán presentados.

Análisis completo de los fragmentos sintéticos, métodos de purificación, ligamiento, clonamiento y expresión serán presentados. La comprobación de estructuras se efectuó por secuenciación del DNA mediante los métodos de Sanger y de Maxam y Gilbert.

(1). Alvarado Urbina G., et al. (1986) Biochem. Cell Biol. Vol. 64, 548-555.

MECANISMO Y VELOCIDAD DE MUTACION DEL DNA MITOCONDRIAL DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*. SU UTILIZACION EN EPIDEMIOLOGIA. (Mechanism and rate of evolution of the mitochondrial DNA in *Trypanosoma cruzi*. Its uses in epidemiology.). C. Ibanez, R. Macina, J.L. Affranchino y A.C.G. Frasch. "Fundación Campomar", A. Machado 151, 1405 Buenos Aires, Argentina

Resultados obtenidos en diferentes laboratorios sugieren que uno de los dos componentes del DNA mitocondrial de los tripanosomatidos, los minicírculos, varían rápidamente en su secuencia. En el caso del parásito sudamericano *Trypanosoma cruzi*, nuestro grupo demostró que stocks de laboratorio poseen clases diferentes de minicírculos (FEBS Lett. 169:139, 1984 y Mol. Biochem. Parasitol. 11:169, 1984), constituidos cada uno de ellos por grupos de moléculas casi homogéneas (Biochim. Biophys. Acta 782:26, 1984) que difieren aún entre clones de parásitos obtenidos de un mismo aislamiento (Mol. Biochem. Parasitol. 16:61, 1985). Para conocer el mecanismo molecular que genera esta diversidad se secuenciaron tres moléculas pertenecientes a una misma clase de minicírculos. En cada molécula se acumulan independientemente mutaciones puntuales (1/64 pares de bases), principalmente transiciones (19/23). La velocidad de mutación fue estudiada analizando una clase de minicírculos en 11 subclones obtenidos a partir de un clon del parásito luego de 600 generaciones de crecimiento continuo (791 días). Dos sitios polimórficos (TaqI y HaeIII) fueron detectados, lo que permitió calcular una velocidad de mutación preliminar y mínima de  $2 \times 10^{-8}$  sustituciones por par de bases por generación. La utilización de moléculas clonadas como marcadores genéticos demostró que existe un número limitado de parásitos en la naturaleza y que parásitos obtenidos de humanos y triatomas en regiones alejadas de Argentina y Chile son similares.

USO DEL BACTERIOFAGO *Mu* COMO HERRAMIENTA GENETICA. (Use of bacteriophage *Mu* as a genetic tool). de Mendoza, D.<sup>1</sup>, Gramajo, H.C.<sup>1</sup> y Viale, A.M.<sup>2</sup>. Departamento de Microbiología y CEFOSI<sup>2</sup>. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, 2000 Rosario, República Argentina.

El bacteriófago *Mu* es un transposon gigante encerrado en la cubierta de un virus que utiliza la transposición como estilo de vida. Los fagos mini-*Mu* son derivados del bacteriófago *Mu* que poseen delecciones internas y que carecen de las funciones líticas del fago parental. Cuando se induce la replicación de los mini-fagos cada réplica es producto de un proceso de transposición y durante la replicación puede promover reordenamientos genómicos tales como fusión de replicones y transposición de genes a plásmidos.

Nuestro grupo de trabajo utilizó estas últimas propiedades de mini-*Mu* para realizar experimentos *in vivo* tales como: mutación de genes clonados en cósmidos, fusión de operones, construcción de bibliotecas genéticas y expresión regulada de genes.

ARENAVIRUSES HAVE AN 'AMBISENSE' CODING STRATEGY. Víctor Romanowski. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

The Arenaviridae family comprises some 13 immunologically related enveloped viruses. Some of them cause severe although not widely spread human diseases such as Lassa fever and Bolivian and Argentinian haemorrhagic fevers.

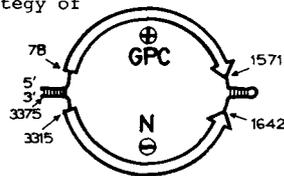
The genetic information of arenaviruses is contained in two species of single-stranded RNA designated L and S. Genetic and biochemical analyses have demonstrated that L RNA codes for a large polypeptide (RNA polymerase?) and the S RNA codes for the nucleocapsid N protein and the GPC polypeptide, an intracellular precursor for the envelope glycoproteins G1 and G2.

Complementary DNA cloning and sequencing of arenavirus S RNA confirmed these coding assignments, and showed a novel coding strategy.

A GPC protein translated from a viral sense mRNA (5' half of S RNA) and a N protein translated from a viral-complementary mRNA (3' half of S RNA) are the basic features of the 'ambisense' coding strategy of arenavirus S RNA.

Subgenomic RNA species with the size and polarity predicted for the N and GPC mRNAs have been found in infected cells.

The structure of the S RNA of LCM arena virus is depicted on the diagram (nucleotide numbers are indicated).



ELEMENTOS CIS QUE REGULAN LA EXPRESION DE LOS LSP1 GENES EN *Dros. melanogaster*. (Cis-acting elements that regulate the expression of the LSP1 genes in *Dros. melanogaster*). Sunkel, C.E., Delaney, S.J. and Glover, D.M. Cancer Research Campaign, Department of Biochemistry, Imperial College, LONDON SW7 2AZ, England.

The Larval Serum Protein 1 genes (LSP1) have been used as a model system for the study of developmental gene regulation in Eukaryotes. The 3 genes are located in different chromosomes, are expressed coordinately during the 3rd larval instar and only in the fat body. We set out to characterize the 5' end cis-acting elements that regulate these genes. The 5' end of all 3 genes was sequenced and the data analyzed using computer analysis. The biological assay defined to study the cis-elements involved the use of whole organism transformation techniques. A chimeric gene containing 5' end sequences from LSP1 a or b directing the expression of a marker gene CAT (chloranphenicol acetyl transferase) was introduced in embryos and stable lines established of the different chimeric genes.

The results of the sequence analysis revealed that the structure of all 3 genes is very similar. Within the coding region a and b share the closest homology which breaks down outside it. 5' end shows only two small regions of homology between all 3 genes located within the first 400bp. These could be related to cis-acting controlling elements which have been maintained even though the genes have been dispersed. Other regions of homology were found. They included the TATA box, the CAP site and a probable protein secretion signal located within the coding region. The results of the whole organism transformation indicate that temporal and tissue specific control signals are contained in 5' end regions of 388bp for LSP1a and 480bp for LSP1b. Although tissue and temporal expression is retained, the level drops considerably. Temporal and tissue specific expression is abolished when only 80bp of 5' end sequence are used and the level of expression is very low.

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS PROTEINAS

Coordinador: Jorge Babul

EL ESTADO PLEGADO DE LAS PROTEINAS: FORMACION, ESTABILIDAD Y SU RELACION CON LA FUNCION. (The folded state of proteins: acquisition, stability and its relation with function).

Babul, J., Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las proteínas adoptan conformaciones plegadas complejas y, pese a su diversidad en arquitectura molecular, tienen propiedades comunes que constituyen una "imagen de consenso". El 90% de los residuos de aminoácidos de la mayoría de las proteínas participa en hélices  $\alpha$  (38%), láminas  $\beta$  (20%) y dobleces (32%). En las proteínas de gran tamaño se observan dos o tres unidades estructurales globulares o dominios.

No se conocen los mecanismos que determinan el estado plegado, pero se sabe que son determinantes la secuencia de aminoácidos y la proporción relativa de residuos polares y no polares. Aún cuando existe suficiente flexibilidad en los principios que relacionan la secuencia con el plegamiento, sólo una fracción muy pequeña de los polipéptidos posibles es capaz de plegarse en una conformación estable. La estabilidad está dada principalmente por el gran número de interacciones débiles presentes simultáneamente y la estructura del solvente acuoso.

Una estrategia útil para separar las variables estructurales y funcionales es producir por mutación génica el cambio de uno o pocos aminoácidos que provoque diferencias funcionales. Se presentará el caso de una mutante de fosfofructoquinasa-2 que produce un defecto en el crecimiento de *E. coli*. La enzima contiene un cambio en uno o dos aminoácidos y difiere de la enzima normal en su estabilidad, orden de interacción con los sustratos y productos, susceptibilidad a la inhibición por MgATP y en el efecto de los sustratos sobre la estructura cuaternaria.

Financiado por DIB-Universidad de Chile, Fondecyt, PNUD-UNESCO CHI 81-001 y OEA.

CONFORMATIONAL TRANSITION OF POLYMER CHAINS IN DILUTE SOLUTION. (Transición conformacional de cadenas poliméricas en solución diluida). Gargallo, L.<sup>a</sup>, Radić, D.<sup>a</sup>, Hernández-Fuentes, I.<sup>b</sup>, Horta, A.<sup>b</sup>. a) Laboratorio de Físico-Química Molecular, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile. b) Universidad Complutense de Madrid, España.

The viscometric and dielectric behaviour of poly(dibenzyl itaconate) (PDB<sub>2</sub>) in 1-4 dioxane as a function of the temperature were studied. The viscometric relationships in 1-4 dioxane at different temperatures were established. The viscometric results show discontinuities in the intrinsic viscosity  $[\eta]$ , specific viscosity  $\eta_{sp}/c$  and Mark-Houwink-Sakurada exponent. Dielectric constant ( $\epsilon$ ) measurements were carried out as a function of temperature from 16 to 33°C (see figures 1 and 2).

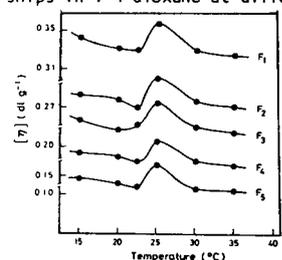


Figure 1

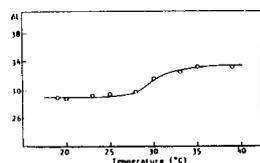


Figure 2

The results from the dielectric behaviour agree with the viscometric results. For PDB<sub>2</sub> in 1-4 dioxane, an anomalous behaviour of intrinsic viscosity (coil volume) and dielectric constant (chain polarity) occurs around 25°C.

In conclusion, a conformational transition of polymer chain is probably responsible.

PREDICCIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA. UNA HERRAMIENTA ÚTIL PARA EL CRISTALOGRAFO DE PROTEINAS.

(Secondary structure prediction. A useful tool for a protein crystallographer). Hilda Cid, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La determinación de la estructura terciaria de una proteína requiere de la obtención de cristales de buena calidad de la enzima nativa y de sus derivadas de átomos pesados, proceso que puede demorar varios años. En el intertanto, importante información acerca de la configuración espacial de la enzima y de su sitio activo puede obtenerse por una combinación de estudios químicos y predicción de estructura secundaria, a partir de la secuencia.

Esta idea ha sido desarrollada a través de varios años en el laboratorio de Biofísica de la Universidad de Concepción, donde se ha desarrollado un método de predicción y se ha aplicado en combinación con el método de Chou y Fasman en las siguientes proteínas: diversas protaminas de peces, fructosa 1,6-bisfosfatasa, neurotoxinas de venenos de serpientes, proteínas salivales ricas en prolina y B-lactamasas obtenidas de diversas fuentes.

En la totalidad de estos casos ha sido posible proponer un modelo estructural capaz de explicar los datos experimentales disponibles y sugerir nuevos experimentos para su verificación.

Dado que se trabaja con una predicción, y no una de terminación, se complementa la estructura propuesta con medidas de parámetros físico-químicos, como difracción circular y determinación de radio de giro por medidas de fluorescencia. Se propone utilizar cálculo de energías conformacionales mínimas para ajustar zonas de predicción dudosas.

PREDICIONES SOBRE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO, BASADAS EN LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS Y EN MODIFICACIONES QUIMICAS. (Predictions on the growth hormone three-dimensional structure, based on its amino acid sequence and chemical modifications.) Santomé, J.A., Ermacora, M., Rivero, L., Nowicki, C., Wolfenstein-Todel, C., Cascone, O. y Biscoglio de Jimenez Bonino, M.J.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA - CONICET).

En nuestro laboratorio se han modificado, con distintos reactivos químicos, los residuos de triptofano, tirosina, lisina, metionina, arginina, histidina y ácidos aspártico y glutámico de las hormonas de crecimiento de mamíferos - en condiciones que no provocaron modificaciones conformacionales detectables por difracción circular.

La cinética de las reacciones se siguió determinando el grado de modificación de cada residuo, previo fraccionamiento enzimático de la molécula y aislamiento de los péptidos que los contenían.

Se individualizaron, así, segmentos de la cadena polipeptídica cuyos distintos residuos de aminoácidos reaccionaron fácilmente frente a los respectivos reactivos específicos, y otros, con residuos que lo hicieron parcialmente o que no reaccionaron. Podría deducirse que esos segmentos son, respectivamente, total, parcialmente y no accesibles al solvente.

Con esta información, sumada a la resultante de determinar: a) la distancia entre tirosinas y lisinas mediante reactivos bifuncionales, b) la estructura secundaria con métodos predictivos y c) la hidrofobicidad e hidrofiliencia de las distintas regiones de la cadena polipeptídica - se propone un modelo tridimensional de la hormona de crecimiento bovina.

## AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DE RECEPTORES Y PROCESOS DE TRANSDUCCION

Coordinador: *Pedro Labarca*

**FOTOTRANSDUCCION EN UN FOTORECEPTOR DE INVERTEBRADO.** (Phototransduction in an invertebrate photoreceptor). Bacigalupo, J., Johnson, E. Lisman, J. Depto. Biología, Fac. Ciencias, U. de Chile y Dept. of Biology Brandeis Univ. Waltham, MA, E.E.U.U.

La fototransducción involucra una cadena de eventos que culmina con un cambio de actividad de canales iónicos. Nuestro interés está enfocado a entender las últimas etapas de la transducción. Hemos caracterizado los canales activados por luz haciendo registros de patch clamp en célula (*J. Gen. Physiol* 87: 73; 1986). En registros obtenidos durante un estímulo luminoso se pueden distinguir 2 tipos de eventos unitarios, con conductancias de 15 y 40 pS. Ambos tienen un potencial de inversión entre 0 y 10 mV y una probabilidad de apertura marcadamente dependiente del potencial. Con el objeto de estudiar los canales en condiciones más definidas que en la célula, retiramos la pipeta del fotorreceptor dejando el lado intracelular de la membrana expuesto al baño. El baño se perfundió con diversas soluciones conteniendo como ión principal K y distintas concentraciones de Ca libre. El Ca participa en la adaptación del receptor a la luz inhibiendo la conductancia activada por luz. En  $10^{-7}$  M Ca observamos una alta actividad del canal de 15 pS, que en estas condiciones perdió la dependencia de la luz.  $10^{-6}$  M Ca inhibieron el canal. Esto indica que una acción directa del Ca sobre el canal podría producir la adaptación. Estudios dirigidos a identificar el transmisor responsable de la excitación son ahora posibles en este sistema y los estamos llevando a cabo.

Proyecto NSF INT-8610625.

**TRANSDUCCION Y RESONANCIA ELECTRICA EN CELULAS CILIADAS DEL SISTEMA VESTIBULO-AUDITIVO.** (Transduction and electrical resonance in hair cells from the vestibulo-auditory system). Robles, L. Departamento de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, Univ. de Chile.

El proceso de transducción mecano-eléctrica en el sistema vestibulo-auditivo de los vertebrados se lleva a cabo en las células ciliadas del oído interno. Estas células, ubicadas en estructuras especializadas en la transmisión de vibraciones mecánicas, se caracterizan por poseer en su superficie apical un haz de pseudo-cilios (estereocilios) que se mueven siguiendo al estímulo mecánico. Estudios recientes, utilizando la técnica de "patch-clamp" en células ciliadas vestibulares completas de rana (*Hudspeth, A. J., Science* 230, 745) y de pollo (*Ohmori, H., J. Physiol* 359, 189), muestran que el desplazamiento del haz de cilios en la dirección de su eje de simetría produce una modulación de la corriente de transducción que entra a la célula. Estímulos calibrados de alrededor de 1  $\mu$ m de amplitud máxima dan una relación sigmoidea entre corriente y desplazamiento, con la corriente máxima al mover los estereocilios en el sentido de los más largos y la mínima al moverlos en el sentido opuesto. Análisis de ruido indica que el aumento de la corriente de transducción se produce por la apertura de unos 300 canales, de alrededor de 13 pS de conductancia, ubicados en la superficie apical de cada célula ciliada. Por otra parte, cuando estas células se estimulan con pulsos de corriente depolarizante muestran oscilaciones amortiguadas del potencial de membrana a frecuencias que son características de cada célula. Esta resonancia eléctrica podría ser explicada por la interacción entre canales voltaje dependientes de  $Ca^{++}$  y canales de  $K^{+}$  activados por  $Ca^{++}$  que han sido identificados en la superficie basolateral de las células. En estos animales y en la tortuga la resonancia eléctrica de las células ciliadas actúa como un filtro que reduce la amplitud de las respuestas a estímulos de frecuencias diferentes a la frecuencia característica de cada célula ciliada.

**EXPRESION DE RECEPTORES EN OOCITOS DE XENOPUS.** (Expression of receptors in oocytes of *Xenopus*). Inestrosa, N.C. Grupo de Neurobiología Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago.

El sistema del oocito de *Xenopus laevis* ofrece grandes ventajas para estudiar la traducción de RNA mensajeros. En efecto, el oocito posee una gran eficiencia en la traducción de mRNAs exógenas, junto a una gran fidelidad en la producción de proteínas maduras. En 1981, Barnard y Miledi describieron por primera vez la aplicación de este sistema a un problema neurobiológico. Después de microinyectar mRNA obtenido del órgano eléctrico de *Torpedo* a oocitos, estos sintetizaron e incorporaron a su membrana, receptores colinérgicos nicotínicos, los cuales eran funcionalmente activos ya que respondían con una depolarización de la membrana a la aplicación de acetilcolina y la respuesta era eliminada en la presencia de alfa-bungarotoxina.

Considerando que aparte del receptor colinérgico la mayoría de los otros receptores se encuentran en el cerebro donde es muy difícil estudiarlos, es que el oocito de *Xenopus* aparece como un excelente sistema para analizar receptores de interés neurobiológico. Entre los receptores ya expresados en oocitos tenemos los de Serotonina, Glutamato, Glicina y GABA. Los mRNAs utilizados fueron obtenidos de cerebro de distintos animales, incluyendo: pollo, rata y hombre. Las respuestas del oocito a los agonistas son rápidas (1 seg) o lentas (10 seg), las corrientes pueden ser o no oscilatorias y los potenciales reversos varían entre 0mV y -20mV. De los receptores estudiados el que se expresa más eficientemente es el de Serotonina.

Financiado por DIUC y Stiftung Volkswagenwerk

**EPITHELIAL RESPONSES OF MAMMALIAN TONGUE AND THEIR INVOLVEMENT IN TASTE TRANSDUCTION.** Simon, S.A. Departments of Physiology and Anesthesiology, Duke University Medical Center Durham, North Carolina 27710.

The responses of mammalian tongue, placed in a modified Ussing chamber, to salt (KCl), NaCl,  $NH_4Cl$ , TEACl, sweetener (D-Glucose, Sucrose) and bitter-tasting quinine were investigated. These experiments were conducted to further explore the new paradigm of taste transduction that correlates the electrical behavior of lingual epithelium with neural responses under symmetric ionic conditions. The epithelial responses are inhibited by ouabain and removal of oxygen, demonstrating that the tongue is an actively transporting epithelium. When increases in short circuit current, for rabbit tongue, induced by hyperosmotic concentrations of several salts were compared, the following sequence was found:  $KCl > NH_4Cl > NaCl > TEACl$ . These results are consistent with previously published integrated chorda tympani responses as well as behavioral studies which showed that rabbits prefer KCl to NaCl. In comparison, the sequence for dog tongue was  $NaCl > NH_4Cl > KCl > TEACl$ . Pharmacological studies using ouabain and amiloride suggest that  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $H^+$  all traverse the tongue through different pathways. Different responses to NaCl and Sucrose between the front and the rear regions of the tongue, as determined neurophysiologically or psychophysically, are also found in isolated epithelium.

## BIOLOGIA, IDEOLOGIA Y SOCIEDAD

Coordinador: *Ennio A. Vivaldi*

EL CARACTER SOCIAL DEL QUEHACER CIENTIFICO.  
(The Social Character of Scientific Practice).  
Echeverría, R. Instituto de Sociología, Universidad Católica de Chile.

Los desarrollos producidos en las ciencias biológicas han representado avances significativos en el reconocimiento de determinantes biológicos de la conducta humana, incluyendo el comportamiento social. Con ello se ha replanteado la relación entre lo biológico y lo social, lo que se ha traducido en diversos esfuerzos desde las ciencias biológicas de explicación de fenómenos que previamente parecían reservados a disciplinas como la sociología. La sociobiología representa tan sólo un esfuerzo, entre muchos otros, en esta dirección.

En esta nueva compenetración entre la biología y las ciencias sociales, la primera es la que ha modificado los términos previos de la relación, al producir resultados que despiertan un interés creciente entre los científicos sociales. Sin embargo, una vez que los sociólogos dirigen su atención hacia la biología —más allá de la discusión que pueda establecerse sobre los usos y abusos que socialmente se hagan de sus resultados— no siempre se comprueba un adecuado reconocimiento de parte de los biólogos sobre el carácter social de todo quehacer científico, el biológico incluido, y, por lo tanto, de los determinantes sociales que inciden en dicho quehacer. Se trata, en consecuencia, de insistir en el condicionamiento al que se halla sometida la práctica investigativa de las ciencias biológicas, desde el punto de vista de factores sociales diversos, como lo son los ideológicos y los institucionales.

¿ EXISTE FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS PARA EXPLICAR LA AGRESIÓN?.

L. Valladares. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, Universidad de Chile.

En 1915, E.O. Wilson publicó su libro "Sociobiología: la nueva síntesis". En esta obra Wilson trató de presentar, basándose tanto en los hechos como en la teoría, una visión panorámica acerca de la naturaleza y fundamentos biológicos del comportamiento animal social, la sociobiología. La reacción inicial del libro fue muy favorable, sin embargo, al cabo de algunos meses se produjo un furibundo ataque, por parte de un grupo de notables científicos que se autodenominaron "Grupo de Ciencia para el Pueblo dedicado al Estudio de la sociobiología". No solo las ideas de Wilson fueron atacadas, sino que se acusó al propio autor de estar aliado con los pensadores políticos más reaccionarios. A partir de ese instante se inició uno de los más interesantes y polémicos desafíos de la ciencia biológica de los últimos años. Creemos que es provechoso someter a consideración la controversia de la sociobiología, y para esto he tomado como modelo la agresión.

El estudio de los orígenes del comportamiento agresivo, criminal y antisocial es uno de los aspectos del proceder humano que continuamente ha absorbido el interés de los científicos. Es mi intención examinar qué argumentos pueden esgrimirse a favor de la sociobiología de la agresión y cuales en contra de ella; la controversia de la sociobiología es una controversia biológica y debe, por tanto ser analizado desde un punto de vista de esta ciencia.

¿ HAY FACTORES GENÉTICOS QUE CONDICIONAN EL ACCESO DIFERENCIAL A LOS ESTRATOS SOCIOECONÓMICOS ? .  
Valenzuela C.Y. Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Existe un gradiente socioeconómico en Chile. Los estratos socioeconómicos altos presentan frecuencias de grupo sanguíneo A y Rh(-) superiores. La hipótesis que sustentábamos y parecía explicar este gradiente se basaba en dos factores histórico-culturales: a) La particular miscegenación inicial de la población chilena y su relación con la estratificación social y b) El matrimonio discriminado por estrato socioeconómico. Los métodos de contrastación de estas hipótesis son los estudios de muestras de dadores de sangre clasificados según la estratificación propuesta por el Prof. O. Sepúlveda y las técnicas normadas de marcadores genéticos o los estudios de muestras de individuos tomados de grupos de estratos conocidos. Nuestras hipótesis se han revelado insuficientes para explicar los siguientes resultados: 1) Se encontró el mismo gradiente sociogenético para ABO en Inglaterra. 2) El estrato más alto chileno tiene frecuencias genéticas más altas de los alelos A y Rh(-) que las poblaciones europeas. 3) El gradiente interactúa con el sexo en Chile e Inglaterra. 4) No se encontró el gradiente para el alelo B que debería comportarse igual que el A.

PRI 831040279 DIB U. de Chile.

EL DETERMINISMO BIOLÓGICO . (Biological determinism).  
Vivaldi, E.A. Departamento de Fisiología y Biofísica. Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

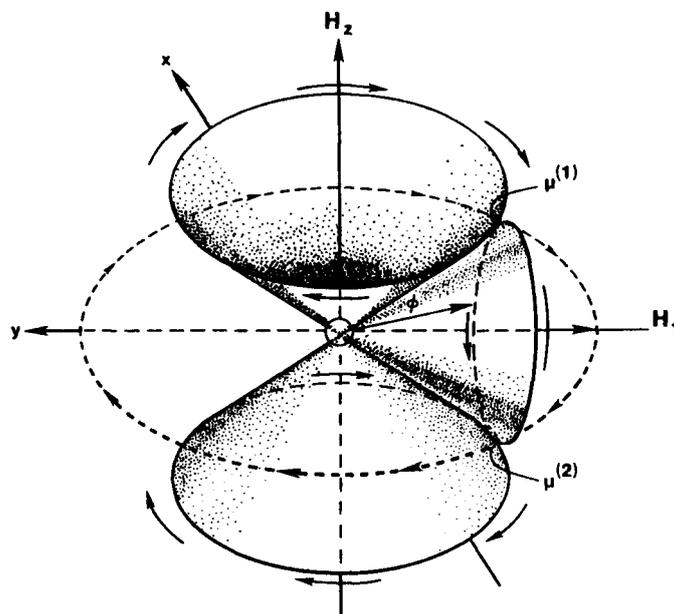
Un sistema social debe reproducir sus propias condiciones de existencia no solo para su mantención a futuro, sino como requisito para su estabilidad presente. La práctica social de sus integrantes debe generar la aceptación de un conjunto de convicciones acerca del carácter de variantes de los determinantes de la organización social. Estos determinantes pueden ubicarse fuera de los seres humanos, o ser considerados parte de su naturaleza intrínseca. En este último caso, la organización social existente puede ser explicada como el resultado necesario e inmutable, la compleja expresión fenotípica, de una realidad biológica previamente presente en sus individuos.

Conceptos como evolución, adaptación y selección natural han inspirado entusiastas especulaciones sociobiológicas que hacen aparecer el presente como una optimización insuperable. A veces, simples analogías entre rasgos de sociedades humanas y de otros seres vivos, han servido de fundamento para sostener un determinante biológico común. Sin embargo, las bases neurales del comportamiento humano socialmente relevante, así como la especificación genética de esas bases neurales, son áreas del conocimiento cuyo desarrollo actual está lejos de permitir el reduccionismo pretendido. Ciertamente, son insuficientes para declarar obsoletos conceptos como libertad humana o cambio social.

Si bien las interpretaciones biológicas del quehacer social parecen infundadas, ellas ofrecen un interesante campo para interpretaciones sociológicas del quehacer biológico. En particular, para estudiar la influencia que sobre los biólogos ejercen tanto el sistema de poder político en que su quehacer se inserta, como aquellas ideas que la sociedad tiene sobre sí misma y que contribuyen a su propia estabilidad.

SIMPOSIO Y TALLER INTERNACIONAL  
RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR  
EN BIOQUIMICA

Macromoléculas y Metabolitos  
Estructura, función e interacciones



8 al 10 de Enero de 1986

CLUB DE CAMPO DEL COLEGIO MEDICO, LA DEHESA 2245

SANTIAGO, CHILE

**Participantes:** L.J. Berliner (The Ohio State University, USA), G. Canessa (Univ. de Concepción, Chile), E. Cardemil (Univ. de Santiago de Chile), M. Castillo (Univ. de Chile), A. Cornish-Bowden (Univ. of Birmingham, England), B. Frydman (Fac. de Farmacia y Bioquímica, Argentina), M. González (Instituto de Química Orgánica de Síntesis, Argentina), A.S. Mildvan (Johns Hopkins University, USA), O. Monasterio (Univ. de Chile), M. Pieber (Comisión Chilena de Energía Nuclear), A.G. Redfield (Brandeis University, USA), J.C. Slebe (Univ. Austral de Chile), A. Urzúa (Univ. de Santiago de Chile).

**Coordinador:** Dr. Octavio Monasterio, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile. Telefono: 2713891.

**Patrocinadores:** PNUD-UNESCO CHI/84/003. Sociedad de Biología de Chile y Universidad de Chile.



## ASPECTOS PRACTICOS DE NMR DE ALTA RESOLUCION.

## Practical Aspects of High Resolution NMR.

M. Becerra. Provinco Ltda. Santiago, Chile.

La tecnica NMR ha logrado avances extraordinarios, sobre todo en los ultimos 10 anos. Con la incorporacion de la tecnica de Fourier, se logro superar, en forma substancial, los problemas de sensibilidad y velocidad de analisis, permitiendo ademas, el desarrollo de experimentos especiales. Con estos, hoy se logra obtener una considerable informacion sobre la estructura molecular y de practicamente todos los nucleos que presentan el fenomeno de NMR, tanto en soluciones como en solidos. Asimismo, el desarrollo reciente de instrumentos que permiten efectuar espectroscopia *in vivo* y tomografia, estan comenzando a escribir un nuevo capitulo de esta tecnica, con proyecciones incalculables. Sin duda, los avances en el campo de los computadores, tecnicas de super conductividad, secuencias de pulsos y desarrollo de software han sido fundamentales para estos logros. Sin embargo, la rapidez de estas evoluciones, impone exigencias nuevas como la separacion especial de los operadores y usuarios, en el uso de los instrumentos y en la interpretacion de la informacion obtenida. Particularmente, el uso de magnetos superconductores obliga a aprender su operacion y mantenimiento con el manejo y suministro de liquidos criogenicos. Con todo, esta tecnica analitica es la que ha tenido, posiblemente, la evolucion mas espectacular en un periodo de tiempo sumamente corto.

Presentaremos una breve resena historica senalando los mayores adelantos, una breve descripcion de la tecnica de Fourier comparada con el sistema continuo para analizar en mayor detalle factores como sensibilidad, operacion de los instrumentos incluyendo la factibilidad del uso de magnetos superconductores en Chile. Luego del desarrollo de la tecnica NMR-Fourier, han surgido una gran cantidad de secuencias de pulsos, tanto en una como en dos dimensiones. La informacion que permite obtener es espectacular, sobre todo de los nucleos mas importantes como  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Asimismo, han sido la base para el desarrollo de la tomografia por NMR cuyas proyecciones son insospechadas.

Describiremos, brevemente, algunos experimentos en una dimension (INEPT, DEPT), presentando ejemplos reales. Asimismo, detallaremos los diferentes experimentos en dos dimensiones, tanto homonuclear como heteronuclear (HOMO-2D-J HETERO-2D-J, HETERO-2D-correlacionada), mostrando ejemplos de aplicaciones reales.

## EPR (ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE) IMAGING OF BIOLOGICAL SPECIMENS.

Imágenes de Especímenes Biológicos con EPR (Resonancia Paramagnética Electrónica)

Lawrence J. Berliner, Antonello Sotgiu, and Hirotada Fujii, Department of Chemistry, Ohio State University, Columbus, Ohio 443210.

The promise of new methods of non-invasive detection of tissues, organs and physiological metabolites has come recently with the advent of magnetic resonance

imaging and *in vivo* NMR. The other magnetic resonance imaging modality, is electron paramagnetic resonance (EPR), or electron spin resonance (ESR), which detects paramagnetic free radical species directly in biological systems. The involvement of free radical processes in mechanisms or carcinogenesis and aging have been studied intensively in the past principally by *in vitro* methods. More recently, free radical species have been suggested in heart disease (myocardial ischemia).

We have been attempting non-invasive detection, diagnosis and imaging of tissues and organs utilizing ESR (electron spin resonance) spectroscopy. ESR imaging has similar resolution to NMR, but with the important advantages of higher sensitivity and, in the case of spin labels, specific information about molecular environment. It has already been demonstrated that both detection and imaging of natural and extraneously introduced free radicals in biological systems is very powerful. The results of these studies may lead to new procedures of diagnosis of molecular diseases.

### LASER PHOTO-CIDNP NMR OF $\alpha$ -LACTALBUMIN

Laser-Foto-CIDNP NMR de  $\alpha$ -Lactoalbúmina.

Lawrence J. Berliner, Department of Chemistry, The Ohio State University, Columbus Ohio 43210, U.S.A.

The large intensity enhancements of NMR lines observed for the products of free radical reactions have fascinated chemists for over two decades. The effect is called chemically dynamic nuclear polarization (CIDNP). Basically, it arises from a spin selection process acting during recombination of radical pairs, which leads to greatly distorted population differences of nuclear spin state levels. The last few years have seen the application of CIDNP to biochemical problems where the aim is to obtain structural information on biological macromolecules and on their interactions with ligands. CIDNP effects can be generated in amino acid residues by light irradiation of a protein solution in the presence of a flavin dye. Photo excitation of the dye is accomplished by laser irradiation of the solution directly in the NMR probe. The CIDNP effects arise from reversible electron or hydrogen atom transfer reactions of the photoexcited dye with aromatic amino acids. Back reaction of the intermediate radical pairs leads to nuclear spin polarization. This, in turn, results in strong and specific intensity enhancements in the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of the side-chain protons of histidine, tyrosine, and tryptophan. Since for the photoreaction contact is necessary between the photoexcited dye and the amino acid side chains, the method tests for side-chain surface accessibility. Compared to other surface probes, it has the high intrinsic resolution of NMR and the capability of identifying individual surface residues that can be distinguished from those lying in the interior of a protein.

$\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA), a principal milk whey component, functions as a "modifier" protein in lactose biosynthesis. The unique structural changes which accompany the association of one molecule each of galactosyltransferase and the  $\alpha$ -LA manifest themselves in an altered specificity from N-acetylglucosamine to glucose acceptors.  $\alpha$ -Lactalbumins from different mammalian species show a great deal of sequence homology. The primary structure is also similar to that of lysozyme. No crystal

structure has been reported, but a molecular model of bovine  $\alpha$ -lactalbumin has been calculated from energy minimization on the basis of the lysozyme crystal structure. Photo-CIDNP spectra have been obtained for five different  $\alpha$ -lactalbumins and the results have been compared with predictions based on the atomic model and with other surface exposure data. The spectra contain lines of all three polarizable amino acid residues. Cross-polarized lines were also identified and comparison with spectra from the different species afforded assignments for most of the polarized lines. Our work also monitors the extremely strong binding of calcium to  $\alpha$ -LA, causing a unique conformational change monitored by intrinsic fluorescence and CIDNP.

### APLICACIONES DE LA ESPECTROSCOPIA DE $^{19}\text{F}$ -NMR Y $^1\text{H}$ -NMR EN MONOMEROS Y POLIMEROS SINTETICOS.

#### Applications of $^{19}\text{F}$ -NMR and $^1\text{H}$ -NMR Spectroscopy in Synthetic Monomers and Polymers.

G.S. Canessa. Polímeros, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

El uso más frecuente dado a la espectroscopía NMR corresponde a la determinación de estructura de moléculas orgánicas de bajo y alto peso molecular. Sin embargo, es posible en algunos casos utilizar la espectroscopía NMR para determinar la constante de formación de un complejo de transferencia de carga, la velocidad de polimerización de un par de comonómeros, la conformación de una molécula, la secuencia configuracional de un homopolímero y evidencias en el mecanismo de una copolimerización.

Al copolimerizar anhídrido maleico (AM) con 1,1-bis(p-fluorfenil) etileno (BPFFE) con AIBN en THF a  $60^\circ\text{C}$  se obtiene un copolímero y un aducto 1:2 rico en AM. Si la reacción se realiza en benceno a  $0-5^\circ\text{C}$  iniciada por luz UV, se obtiene también un copolímero y un aducto 2:1 entre AM y el solvente. Se utilizó la espectroscopía de  $^1\text{H}$  y  $^{19}\text{F}$ -NMR para identificar y caracterizar los compuestos (1).

El anhídrido difluormaleico (ADFM), monómero aceptor de electrones (A), forma complejos de transferencia de carga con monómeros dadores de  $\bar{e}$  (D), como fenilviniléter, p-dioxeno, etc.

Determinando el desplazamiento químico de la señal de  $^{19}\text{F}$ -NMR del monómero aceptor sin monómero dador de  $\bar{e}$ , y determinando la variación de la señal observada al agregarle cantidades crecientes del monómero dador de  $\bar{e}$ , es posible determinar la constante de formación del complejo en forma gráfica (2).

En la síntesis del anhídrido difluormaleico se obtiene como productos intermedios los ácidos clorotrifluorsuccínico (ACITFS) y trifluorsuccínico (ATFS). El espectro de  $^{19}\text{F}$ -NMR del ACITFS fue analizado como un sistema ABX utilizando un programa de computación multinúcleo LACON para simular el espectro. Se comprobó que hay restricción de la rotación alrededor del enlace simple  $-\text{CF}_2-\text{CFX}-$  por lo que se postula el rotámero 1 como la conformación más probable para esa molécula (2).



## Bibliografía

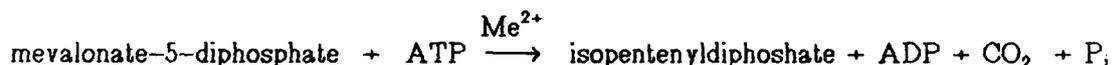
1. Canessa G., y Regel W. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **25**, 52-60 (1980).
2. Regel W. and Canessa G. *Makromol. Chem.* **181**, 1703-1715 (1980).
3. Canessa G. *Bol. Soc. Chil. Quim.* **26**, 25-37 (1981).
4. Resultados a publicar.

STEREOCHEMICAL COURSE AT PHOSPHORUS OF THE REACTION  
CATALYZED BY MEVALONATE DIPHOSPHATE DECARBOXYLASE AS  
DETERMINED BY  $^{31}\text{P}$ -NMR.

Determinación por  $^{31}\text{P}$ -NMR del curso estereoquímico del fósforo en la reacción catalizada por la mevalonato difosfato descarboxilasa.

Emilio Cardemil, Radha Iyengar and Perry A. Frey. Departamento de Química, Universidad de Santiago de Chile and The Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison.

The determination of the stereochemical course of enzymic phosphoryl transfer reactions depend on the availability of a chiral substrate analog at phosphorus and an experimental way of determining the chirality of the generated reaction product. The synthesis of chiral ATP $\gamma$ S at  $\gamma$ P by  $^{17}\text{O}$  and  $^{18}\text{O}$  replacement of  $^{16}\text{O}$  has solved the problem for a number of enzymic reactions, while the analysis of the product is made possible by taking advantage both of the  $^{18}\text{O}$  chemical shift on the  $^{31}\text{P}$ -NMR and the  $^{17}\text{O}$  quadrupolar effect on the same  $^{31}\text{P}$ -NMR signal. We have used this approach to determine the stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by chicken liver mevalonate-5-diphosphate decarboxylase:



We found that ATP $\gamma$ S behaves as an appropriate substrate analog for the enzyme (relative rate for ATP $\gamma$ S/ATP = 0.01), thus allowing us to use ( $\gamma$ -S)[ $\beta$  $\gamma$ - $^{17}\text{O}$ ;  $\gamma$ - $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP $\gamma$ S in the stereochemical study. The [ $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ] thiophosphate generated was stereospecifically incorporated in the  $\beta$  position of ( $\beta$ -S)[ $\beta$ - $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP $\beta$ S and ( $\beta$ -R)[ $\beta$ - $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP $\beta$ S, and both samples were analyzed by  $^{31}\text{P}$ -NMR. The analysis showed that the reaction under study proceeds with inversion of the configuration at phosphorus, thus suggesting a single displacement mechanism for the formation of the ternary complex containing the enzyme and its two substrates.

Supported in part by FNC-Chile and National Institute of General Medical Sciences, U.S.A.

APLICACIONES DE ESPECTROSCOPIA DE NMR EN PRODUCTOS  
NATURALES CHILENOS. TERPENOS Y ALCALOIDES.

Applications of NMR Spectroscopy to Chilean Natural Products. Terpenes and Alkaloids.

**Mariano Castillo**, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los objetivos de nuestra línea de investigación apuntan al estudio químico sistemático de especies vegetales endémicas— incluyendo organismos marinos— a la búsqueda de productos naturales bioactivos (con particular énfasis en insecticidas de origen natural y compuestos con actividad hipotensora) y al estudio del posible rol ecológico de estos metabolitos secundarios.

En el transcurso de estas investigaciones hemos tenido amplias oportunidades de aplicar diversas técnicas de NMR en la resolución de las estructuras químicas de los diversos metabolitos secundarios aislados, que generalmente corresponden a moléculas de bajo peso molecular (entre 300 y 600 Dalton).

Particularmente informativos han resultado los trabajos en curso con diterpenos del tipo clerodano aislados de *Compuestas y Labiadas*, como asimismo con alcaloides derivados del tropano aislados de géneros endémicos.

En el caso de los diterpenos, los análisis de los espectros de  $^{13}\text{C}$  han sido los más informativos, dado que se trata de moléculas con pocos grupos funcionales lo que no permite una separación adecuada de las señales de los protones. La esteoquímica total de la molécula se determina también con precisión a partir de NMR de  $^{13}\text{C}$ . En cambio, la dilucidación estructural de los alcaloides derivados del tropano se basa fundamentalmente en NMR protónica, aún cuando NMR de  $^{13}\text{C}$  permitiría aclarar otro detalles estructurales finos.

Se ilustrarán estas generalidades con algunos problemas específicos.

USE OF  $^{31}\text{P}$  NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE AND CHIRAL  $[\gamma-(S)-^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}]\text{ATP}$  TO INVESTIGATE THE STEREOCHEMICAL COURSE OF THE REACTIONS CATALYSED BY KINASES

Uso de  $^{31}\text{P}$  Resonancia Magnética Nuclear y  $[\gamma-(S)-^{16}\text{O},^{17}\text{O},^{18}\text{O}]\text{ATP}$  Quiral para Investigar el Curso Esteoquímico de Reacciones Catalizadas por Quinasas.

**Athel Cornish-Bowden**. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile (on leave of absence from: Department of Biochemistry, University of Birmingham, P. O. Box 363, Birmingham B15 2TT, England)

Determination of the stereochemical course of substitution reactions at phosphorus atoms became possible with the development of methods of synthesizing and stereochemically characterizing phosphate derivatives in which some of the  $^{16}\text{O}$  atoms bound to the phosphorus atom are replaced by oxygen isotopes or by sulphur, thereby

introducing chirality at phosphorus into molecules that are normally non-chiral. Although methods of determining the stereochemistry of these compounds have been proposed based on circular dichroism and on mass spectrometry, the method that has proved most successful in practice has used  $^{31}\text{P}$ -NMR.

As developed in Lowe's laboratory at Oxford, the method of determining the stereochemical course of reactions catalysed by kinases use chiral [ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP as substrate, and analyses the stereochemistry of the phosphorylated product by relating it to the known stereochemistry of the glucose 6-[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]phosphate produced in the corresponding reaction catalysed by hexokinase, or, in the case of hexokinase itself, by analysing this product itself. The analysis is carried out by cyclizing and methylating the glucose 6-[ $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]phosphate to give a cyclic triester from which one (at random) of the three original terminal oxygen atoms is lost and the other two are converted into chemically distinct states, one becoming an oxo group and the other becoming part of a methoxy group. The  $^{31}\text{P}$ -NMR analysis then takes advantage of the fact that an  $^{18}\text{O}$  atom introduces a small chemical shift in the  $^{31}\text{P}$  atom to which it is attached, whereas a  $^{17}\text{O}$  atom causes such extreme line broadening that in effect any  $^{31}\text{P}$  atom involved in a bond to a  $^{17}\text{O}$  atom disappears from the  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum.

This approach has been applied to hexokinase D from rat liver (Pollard-Knight *et al.*, 1982), and has shown that this enzyme, in common with other kinases that have been studied, catalyses a reaction that proceeds with inversion of configuration at phosphorus.

Pollard-Knight, D., Potter, B. V. L., Cullis, P. M., Lowe, G. & Cornish-Bowden, A. (1982), *Biochem. J.* 201, 421-423.

## ANALISIS CONFORMACIONAL DE DERIVADOS DEL OCTAHIDROFENANTRENO

### Conformational Analysis of Octahydrophenanthrene Derivatives.

M. Gonzalez. U.N.R. IQUIOS 200 Rosario, Argentina.

Con el objeto de estudiar la geometria del receptor responsable de la accion analgesica, se prepararon sinteticamente una serie de compuestos derivados del 4a,metil octahidrofenantreno, cada uno de los cuales posee una estereoquimica definida, a traves de la secuencia sintetica. Para definir completamente la geometria del ligando fue necesario definir tambien su conformacion mas probable en solucion. Se discutira el uso de NMR de protones para la estimacion de la conformacion preferida.

ANALISIS POR  $^{13}\text{C}$  NMR DEL METABOLISMO DE GLUCOSA-[1- $^{13}\text{C}$ ] EN CRITHIDIA FASCICULATA. EVIDENCIA DE LA FIJACION DE  $\text{CO}_2$  POR LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA.

Analysis by  $^{13}\text{C}$  NMR of the Glucose-[1- $^{13}\text{C}$ ] in *Crithidia fasciculata* Evidence of the  $\text{CO}_2$  Fixation by Fosfoenolpyruvate carboxykinase.

B. Frydman<sup>a</sup>, C. de los Santos<sup>a</sup>, G. Buldain<sup>a</sup>, J.J.B. Cannata<sup>b</sup> y J.J. Caszulo<sup>c</sup>.  
Facultades de Farmacia y Bioquímica<sup>a</sup> y de Medicina<sup>b</sup> (Universidad de Buenos Aires) e Instituto Nacional de Diagnostico e Investigacion de la Enfermedad de Chagas<sup>c</sup>, Buenos Aires, Argentina.

El metabolismo de la glucosa en el parásito *Crithidia fasciculata* se estudio *in vivo* haciendo uso de la técnica de  $^{13}\text{C}$  NMR. Se encontro que bajo condiciones anaerobias la glicolisis de glucosa-[1- $^{13}\text{C}$ ] formaba principalmente etanol-[2- $^{13}\text{C}$ ], succinato-[2- $^{13}\text{C}$ ] y glicerol-[1,3- $^{13}\text{C}_2$ ]. Estos productos eran excretados al medio de incubacion, pero en las celulas fue posible detectar tambien fosfoenolpiruvato-[3- $^{13}\text{C}$ ], ademas de los metabolitos mencionados. Por adiccion de bicarbonato de sodio a la mezcla de incubacion se pudo detectar L-malato-[3- $^{13}\text{C}$ ] entre los metabolitos excretados, mientras que la relacion etanol:succinato = 2 encontrada en ausencia de bicarbonato cambiaba a una relacion = 0,6 en presencia de este ultimo. Esto era debido a un desplazamiento del equilibrio entre la carboxilacion del fosfoenolpiruvato que conduce al succinato, y la decarboxilacion del piruvato que conduce al etanol. La adiccion de 25%  $\text{D}_2\text{O}$  a la mezcla de incubacion llevo a la formacion de etanol-[2- $^{13}\text{C}$ , 2-D] producido por la incorporacion de  $\text{D}^+$  al piruvato en reacciones mediadas ya sea por la piruvato quinasa o la enzima malica. No se encontro incorporacion de  $\text{D}^+$  en el L-malato, lo que excluye la posibilidad que este ultimo se origine en la carboxilacion de piruvato, y refuerza la evidencia que el L-malato se origina en la carboxilacion del fosfoenolpiruvato a oxaloacetato por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. La formacion de succinato[2- $^{13}\text{C}$ , 2-D] bajo las mismas condiciones refleja la incorporacion de  $\text{D}^+$  durante la reduccion del fumarato. Cuando las incubaciones se llevaron a cabo en 100%  $\text{D}_2\text{O}$  se encontro mayor incorporacion de deuterio en algunos metabolitos, lo que refleja la existencia de NADD y de reacciones enzimaticas mas impermeables al intercambio con deuterio.

NUCLEAR RELAXATION AND OVERHAUSER EFFECT STUDIES OF ENZYME-SUBSTRATE INTERACTIONS.

Uso de Relajación Nuclear y Efecto Overhauser en el Estudio de Interacciones Enzima-Sustrato.

Albert S. Mildvan, Department of Biological Chemistry and Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205.

Paramagnetic effects of enzyme-bound metal ions on  $1/T_1$  of substrate nuclei at several magnetic fields have been analyzed to yield metal-nucleus distances on enzymes (1). Interproton NOE's at two magnetic fields have yielded local correlation

times and interproton distances on enzymes (2). These distances have been used to deduce the locations, conformations, and arrangements of enzyme-bound substrates. Active site binding has been established by displacement experiments with competitive inhibitors, and by evaluation of substrate exchange rates from  $1/T_2$  measurements.

On cAMP-dependent protein kinase, the substrate  $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{ATP}$  has a high anti glycosyl angle ( $\chi = 80 \pm 10^\circ$ ) and an  $\text{O}_1'$  endo ribose pucker (3). The bound pentapeptide (Arg-Arg-Ala-Ser-Leu) and heptapeptide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) substrates exist in highly extended coil conformations with no internal H-bonds, as determined by distances from  $\text{Mn}^{2+}$  to backbone  $\text{C}\alpha$  and amide (NH) protons of these peptides (4).

On both rabbit muscle adenylate kinase (194 amino acids) and on a 45 amino acid fragment of this enzyme (residues 1-45) which binds MgATP with comparable affinity, MgATP has a glycosyl angle,  $\chi = 65 \pm 20^\circ$  and a  $3'$ -endo ribose pucker. On both enzyme and peptide, bound MgATP and  $\text{Cr}^{3+}\text{ATP}$  interact with hydrophobic residues (ile, leu, val, or thr). 2D NMR, C.D., and FTIR spectroscopy indicate this peptide to be structured in solution with regions of  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet, consistent with the X-ray structure of this portion of the enzyme. A model of the peptide, based on the X-ray structure of the enzyme, accommodates MgATP in a manner consistent with the NMR distances (2).

On the large fragment of DNA Polymerase I, the substrates MgATP and MgTTP and the substrate analog AMPCPP have an anti glycosyl torsional angle ( $\chi = 50 \pm 15^\circ$ ) and an  $\text{O}_1'$  endo deoxyribose pucker ( $\delta = 100 \pm 20^\circ$ ), appropriate for nucleotide residues of B-DNA. Templates and primers do not alter these conformations. In contrast, enzyme-bound dGTP exists in at least two conformations in the absence of template, one of which is  $\text{syn}^-$ , while in the presence of oligo(rU)  $43 \pm 9$  only a single B-like conformation is detected possibly due to the formation of a G-U wobble base pair. The enzyme-bound templated oligo(rU) and oligo(rA) are partially immobilized, and are held in a conformation such that their average nucleotides are more B-like than A- or Z-like. NOE studies indicate that the enzyme binds substrates near at least two hydrophobic residues including ile, and an aromatic residue, probably tyr. The enzyme binds templates near cationic arg and/or lys residues, and a hydrophobic residue (5, 6).

Enzymes thus bind unique and specific conformations of flexible substrates, usually highly extended forms which maximize enzyme-substrate interactions.

(1) *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B* **299**, 56 (1981); (2) *Biochem.* **24**, 4680 (1985); (3) *Biochem.* **22**, 3439 (1983); (4) *Biochem.* **23**, 3161 (1984); (5) *Biochem.* **24**, in press (1985); (6) *Biochem.*, submitted.

NUCLEAR RELAXATION RATES STUDY OF GTP( $\gamma$ F)-TUBULIN INTERACTION USING  $^{19}\text{F}$ -NMR.

Estudio de la Interacción Tubulina-GTP( $\gamma$ F) Mediante Velocidades de Relajación Utilizando  $^{19}\text{F}$ -NMR.

Monasterio, O. and Timasheff, S. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, U de Chile, Santiago, Chile, and Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, Massachusetts, U.S.A.

Tubulin is dimer of MW 110,000 which self-assembles in the presence of GTP and  $\text{Mg}^{2+}$  to form microtubules (1). It has generally been believed that tubulin possesses two sites at which a guanine nucleotide phosphate (GTP or GDP) can be non-covalently bound. One of these sites (the N-site) appears to hold the nucleotide firmly and does not exchange it with nucleotides in solution. The nucleotide at the other site (the E-site) is supposed to be in rapid equilibrium with free nucleotide in solution. Tubulin has one mole of magnesium tightly bound per mole of dimer.

To study the relationship between the E-site and the metal site we synthesized  $\text{P}^3$ -fluoro  $\text{P}^1$ -5'-guanosine triphosphate [GTP( $\gamma$ F)] an analog of GTP. The inhibitory effect of this analog on both the polymerization and the colchicine-dependent GTPase activity of calf brain tubulin were studied. Our results (2) demonstrated that this analog was a reversible competitive dead-end inhibitor with respect to GTP on the colchicine-induced GTPase activity with a  $K_i$  value of  $1.8 \pm 0.6 \times 10^{-4}$  M. It binds to the E-site competitively with respect to GTP, diminishing the rate and extent of tubulin polymerization.

The distance separating the high-affinity binding site for the divalent metal ion and the exchangeable nucleotide binding site was evaluated by using high-resolution  $^{19}\text{F}$ -NMR (3). The  $^{31}\text{P}$  and  $^{19}\text{F}$  NMR spectra of GTP( $\gamma$ F) were studied, both the fluorine and the  $\gamma$ -phosphate were splitted in a doublet with a coupling constant of 936 Hz. Tubulin purified by the method of Wisenberg (4) incubated with 1 mM  $\text{Mn}^{2+}$ , after one cycle of assembly, replaces  $\text{Mg}^{2+}$  only partially, 60%, at the high affinity binding site. After colchicine treatment of tubulin to stabilize it, GTP( $\gamma$ F) was added and the 254 MHz  $^{19}\text{F}$  relaxation rates measured within the first four hours. Longitudinal and transversal relaxation rates were determined at two concentrations of GTP( $\gamma$ F) and variable concentrations of colchicine-tubulin-Mn(II), (paramagnetic complex), or the ternary complex with magnesium (diamagnetic complex). The analysis of the relaxation data indicates that the rate of exchange of GTP( $\gamma$ F) from the exchangeable nucleotide site has a lower limit of  $2.35 \times 10^5 \text{ sec}^{-1}$  and the metal and exchangeable nucleotide binding sites are separated by an upper distance of 6 Å. These data confirm that the high affinity bivalent cation site is situated in the same locus that the exchangeable nucleotide, forming a metal-nucleotide complex.

- (1) *Ann. Rev. Biochem.* 49, 565-591 (1980); (2) and (3) *Biochemistry*, submitted; (4) *Biochemistry* 9, 4110-4116 (1970).

**APLICACIONES DE NMR EN MEDICINA.****Applications of NMR to Medicine.**

M. Pieber. Comisión Chilena de Energía Nuclear.

La espectroscopía de NMR es una metodología de análisis no destructiva, no invasiva, basada en la absorción de energía en el rango de la radio frecuencia por parte de los núcleos de átomos que poseen momentos magnéticos.

Durante los últimos diecisiete años esta técnica ha permitido grandes logros en el estudio de las estructuras de productos naturales y sintéticos. Su aplicación en medicina fue sugerida en 1971 por Raymond Damadian del Centro Médico de la Universidad del Estado de Nueva York, siendo Paul Lauterur el pionero en la técnica de obtención de imágenes (Zeugmatografía o tomografía de imágenes).

La tomografía de NMR está actualmente logrando grandes éxitos en el campo de la medicina para el análisis morfológico de tejidos, órganos y organismos enteros. La tomografía mas utilizada hoy en día es aquella para núcleos de hidrógeno, que representa el elemento químico mas abundante en los seres vivos. Sin embargo, tomografía a base de otros átomos de interés biológico, tales como el sodio y el fósforo, constituyen el desafío mas próximo de esta tecnología.

Con el desarrollo actual de esta metódica es posible obtener valiosas informaciones acerca de lesiones a nivel de tejido cerebral, vesícula biliar, vasculares, hepáticas, renales, etc. y en general de tejidos blandos, incluyendo la tomografía de cuerpo entero. Si bien, la de hidrógeno de tejido óseo no es posible, dado el bajo contenido de agua de éstos, algunas alteraciones pueden ser detectadas.

Por otra parte, de gran utilidad han resultado las técnicas de NMR mas convencionales al estudio de transtornos nutricionales y metabólicos especialmente aquellos relacionados con el metabolismo energético del fósforo. Así, por ejemplo, el síndrome de Mc Ardle, que es una enfermedad genética caracterizada por un debilitamiento muscular, ha podido ser diagnosticada en pocos minutos mediante la información obtenida de los metabolitos fosforados del músculo.

Los riesgos que esta técnica involucra pueden estimarse como mínimos, en comparación con cualquier otro tipo de tomografías. Los posibles riesgos están siendo evaluados en animales de experimentación y si los hubiera éstos podrían derivar de la magnitud de las intensidades de los campos magnéticos utilizados. Por ello y por ahora se han establecido normas preventivas de seguridad, en cuanto a las máximas intensidades de campo magnético utilizable para tomografía de diferentes órganos.

La única limitación importante radica en que no se puede aplicar a pacientes que tengan prótesis metálicas o marcapasos, lo que en el futuro será subsanable cuando dichas inserciones sean reemplazadas por plásticos.

El avance tecnológico que aún se pueda lograr en tomografía de NMR es indudable y se extenderá por muchos años mas.

El desarrollo actual de esta técnica es comparable al que tenían los rayos X a principio de este siglo. En unos diez o veinte años mas es posible que se pueda obtener completa información del interior morfológico y metabólico del organismo humano.

Por ahora, los equipos de mayor alcance que utilizan imanes superconductores son demasiado costosos, ya que requieren por lo menos de un espacio de unos 50 m<sup>2</sup> de instalación, una serie de equipos auxiliares y un costo de mantención muy elevado.

En resumen, el uso de la tomografía de NMR se proyecta como la gran metodología del futuro. Una vez que alcance el desarrollo adecuado y se pueda disponer de un equipo de multipropósito de costo razonable, lo probable que esta metódica proporcionará la técnica de diagnóstico mas cuantitativa y confiable, nunca antes alcanzada, ni siquiera con el conjunto total de las técnicas de diagnóstico actualmente en uso.

## PROTON NMR STUDIES OF MACROMOLECULES.

### Estudio de Macromoléculas por NMR de Protones

A.G. Redfield. Departaments of Biochemistry and Physics, Brandeis University, Waltham, U.S.A.

I will briefly review studies of tRNA structure and dynamics using one dimensional nuclear Overhauser effect and dynamic NMR in H<sub>2</sub>O. Then I will describe development of isotope labeling (<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N) in conjunction with proton NMR to simplify the proton spectrum of larger molecules by removing all proton NMR signals, in a difference spectrum, except those of protons attached to labeled carbons or nitrogens. In collaboration with others (1), we have used labels of this type to isolate the ring NH resonances of a tRNA with its cognate aminoacyl tRNA synthetase, and of T4 lysozyme amide protons. The basic NMR strategy (2) is difference spectroscopy using either decoupling, or Hahn spin echoes with a heteronuclear 180° pulse applied at the same time as the proton 180° pulse. Difference spectra are taken with the heteropulse either at (or near) resonance, and far off resonance. Two dimensional <sup>15</sup>N (or <sup>13</sup>C)-proton spectra are also useful (2). By double labeling of neighboring carbonyl carbons (unpublished) we have been able to identify resonances of all six phenylalanine amide protons in T4 lysozyme, from the carbonyl-carbon-to-amide proton splitting, and then to get geometric information about the surroundings of these protons. In the case of *E. coli* tRNA<sup>Gln</sup>, we show that the two pseudouridines near the anticodon are contacted by the enzyme. This strategy should be generally applicable to macromolecules and complexes in the range of 50 KD or possible larger.

1. R. Griffey, R. Dahlquist, M. Weiss, M. Jarema, D. Soll, R. Swanson, and P. Hoben, unpublished.
2. R. Griffey *et al.*, *Biochemistry* **29**, 4395 (1985).

USE OF  $^{19}\text{F}$  AND  $^{31}\text{P}$ -NMR SPECTROSCOPY AND CHEMICAL MODIFICATION FOR DETECTION OF STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN ENZYMES. FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE AND ASPARTATE AMINOTRANSFERASE.

Uso de la espectroscopía  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ -NMR y modificación química en el estudio de la relación estructura-función en enzimas. Fructosa-1,6-bisfosfatasa y Aspartato-aminotransferasa.

Slebe, J.C., Hubert, E., Reyes, A. y \*Martínez-Carrión, M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile and \*Department of Biochemistry, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, U.S.A.

In order to inquire into the relationships of protein structure to function, natural and synthetic spectroscopic probes, which report the properties of their local environments, can be used. If two approaches, chemical modification and NMR spectroscopy are used simultaneously, more specific answers about the nature and properties of the protein residues affecting the probe should be extractable. We have employed both insertion of sensitive physical probes (2-4) and selective chemical modification (5,6) on specific regions of fructose-1,6-bisphosphate (Fru- $\text{P}_2\text{ase}$ ) and aspartate aminotransferase (GAT); the allosteric AMP-binding site of Fru- $\text{P}_2\text{ase}$  and the active site of GAT.

Studying the AMP binding domain in pig kidney Fru- $\text{P}_2\text{ase}$  we found that carbamylation leads to the formation of an active enzyme derivative which has lost cooperative interactions among AMP sites but retains sensitivity to inhibition by AMP (5). Pulsed Fourier transformed  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra in free AMP reveals a signal that is coupled to the methylene protons of the sugar, with  $J_{\text{HP}}$  of 5.0 Hz. Proton noise decoupling results in a single signal with a pH-dependent chemical shift with deprotonation of the phosphate resulting in a shift of the  $^{31}\text{P}$ -resonance to lower fields. Two  $^{31}\text{P}$ -NMR signals are observed in the enzyme-AMP complex, one of them remain unchanged upon titration, the other present pH-dependence. Since subtilisin-treated enzyme only shows the signal corresponding to the pH-dependent one, it appears that AMP-phosphate group is bound to a pocket that do not allow its ionization between pH 6 to 9. Carbamoylated enzyme behaves as native enzyme. Analysis of chemical shifts of  $^{31}\text{P}$ -resonances shows identical AMP site environments for all subunits in either native or modified enzymes.

In the case of GAT, a pyridoxal-phosphate (PLP) dependent enzyme, a covalent intermediate with a fluorinated substrate and the coenzyme can be prepared *in vitro* and inserted into the apoenzyme (7). The active site domain has a high affinity for selecting compounds of the type phosphopyridoxyl- $\text{X}^{\text{F}}$  where  $\text{X}^{\text{F}}$  is trifluorethylamine, trifluormethylmethionine or  $\alpha$ -trifluormethylalanine. NMR spectra of the enzyme-bound  $^{19}\text{F}$ -substrate-coenzyme complex is monitored as a function of pH, ionic strength and temperature (2,3). Analysis of the chemical shifts and line shapes of the  $^{19}\text{F}$ -resonance shows identical active site environments for both subunits and the presence of a group with a pK value of 8.3. In a reversal of customary procedure, the NMR inferences are used to design an independent chemical method for the selective modification of the residue of the active site and the detection of its pK value

(3,6). The kinetics of inactivation by  $\text{KN}^{14}\text{CO}$  at variable pH show that a group with a pK of 8.0 is carbamoylated at a rate of  $146 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Isolation and characterization of this groups shows that it is Lys-258 which is carbamoylated preferentially to the other 18 lysyl residues in the protein. Apotransaminase carbomoylated at lys-258 can accept PLP and the fluorinated-PLP compounds. However, the resonance signals are then void of the ionization effects patent in enzymes with free Lys-258.

In conclusion, we showed how chemical modification studies can help: a) to acquire knowledge of the microenvironment provided by Fru- $\text{P}_2$ ase to the AMP and b) in the clarification of assignments of the amine groups affecting a  $^{19}\text{F}$  spectroscopic probe in the active site of GAT.

1. Benkovic, S.J. and deMaine, M.M. (1982) *Adv. Enzymol.* 58, 45-82.
2. Slebe, J.C. and Martinez-Carrion, M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2093-2097.
3. Martinez-Carrion, M., Slebe, J.C., Boettcher, B. and Relimpio, A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1853-1858.
4. Slebe, J.C., Hubert, E., Reyes, A. and Martinez-Carrion, M. (1984). Proc. IV PAABS Meeting, Abstract 589.
5. Slebe, J.C., Herrera, R., Hubert, E., Ojeda, A. and Maccioni, R. (1983). *J. Prot. Chem.* 2, 437-443.
6. Slebe, J.C., and Martinez-Carrion, M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5663-5669.
7. Relimpio, A., Slebe, J.C. and Martinez-Carrion, M. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 625-634.

#### APLICACIONES DE NMR A LA DETERMINACION ESTRUCTURAL DE ALCALOIDES: 6a,7-DEHIDROBOLDINA.

##### Applications of NMR to the Estructural Determination of Alkaloids: 6a, 7-Dehydroboldine.

A. Urzúa. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, USACH.

Los alcaloides aporfínicos corresponden a un amplio grupo de compuestos derivados biogénicos de 1-benciltetrahydro-isoquinolinas; se han descrito un gran número de estos compuestos o de derivados biogénicos de ellos y la determinación estructural se ha basado principalmente en espectroscopia de NMR de  $^1\text{H}$ .

En esta presentación se discutirá la determinación estructural de un nuevo alcaloide aporfínico aislado de la mezcla de alcaloides de *Peumus boldus*, que es utilizada en la formulación de algunos medicamentos.

La separación cromatográfica de la mezcla de alcaloides fenólicos dio una fracción de compuestos muy inestables. Por purificación de esta fracción se obtuvo un compuesto cristalino de p.f. 178–179°,  $M^+$  m/z 325,1284 que concordó con la fórmula molecular  $C_{19}H_{19}NO_4$ . El compuesto no mostró actividad óptica y su espectro de UV sugirió la presencia de un cromóforo de 6a,7–dehidroaporfina.

El espectro de NMR de  $^1H$ , se asignó a una 6a,7–dehidroaporfina sustituida en C-1, C-2, C-9 y C-10. Las señales a  $\delta$  3,04 (s, 3H),  $\delta$  3,81 (s, 3H) y  $\delta$  4,02 (s, 3H) fueron asignadas a un grupo N–metilo y a dos grupos metoxilo. Dos singletes anchos a  $\delta$  5,92 (1H) y  $\delta$  6,14 (1H) que desaparecen con la adición de  $D_2O$  se asignaron a dos protones fenólicos; los multipletes a  $\delta$  3,20 (2H) y  $\delta$  3,26 (2H) fueron asignados a los hidrógenos de C-4 y C-5 y el singlete a  $\delta$  8,75 (1H) al H-11.

La posición relativa de los grupos hidroxilo y metoxilo y la asignación de las resonancias de los protones aromáticos fueron obtenidas mediante experimentos de efecto nuclear Overhauser en NMR de  $^1H$ .

La irradiación de los singletes correspondientes a los grupos metoxilo a  $\delta$  3,81 y  $\delta$  4,02 mostraron respectivamente un 9,9 y 6,2% de incremento en la señal del singlete de H-11 ( $\delta$  8,75) demostrando que los grupos metoxilo están situados en C-1 y C-10. La irradiación del singlete del N–metilo ( $\delta$  3,04) mostró un incremento de 8,6% en la señal del singlete de H-7 ( $\delta$  6,51), alternativamente la irradiación del singlete correspondiente de H-7 mostró respectivamente incrementos de 1,4% en la señal asignada al N–metilo y 8,4% en la señal del singlete de H-8. Finalmente la irradiación del singlete de H-3 mostró un incremento de 0,9% en la señal del multiplete del metileno del C-4 ( $\delta$  3,20).

Con estos datos se logró establecer la estructura de 6a,7–dehidrobaldina. Esta estructura se confirmó por síntesis parcial a partir de boldina.