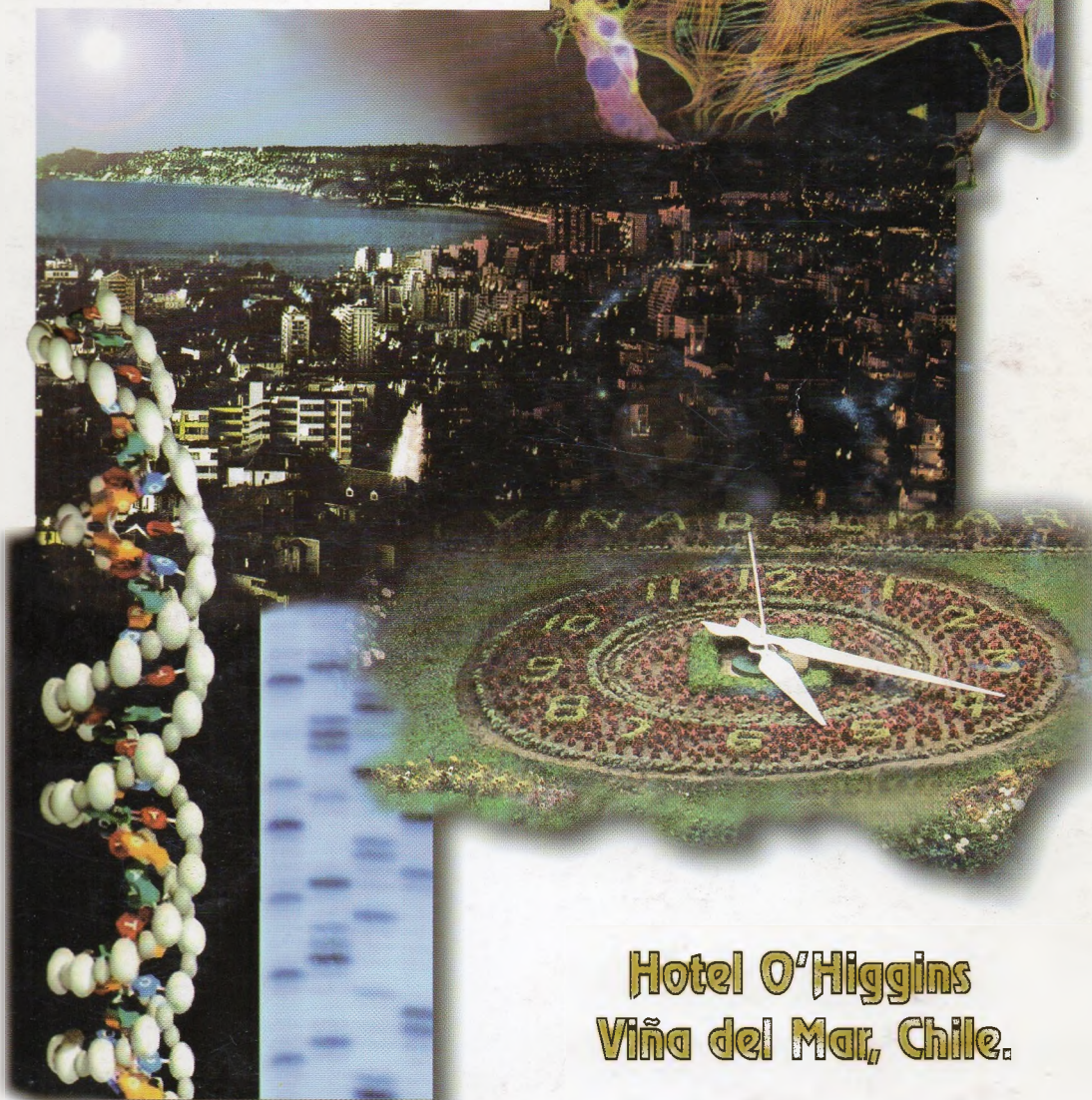
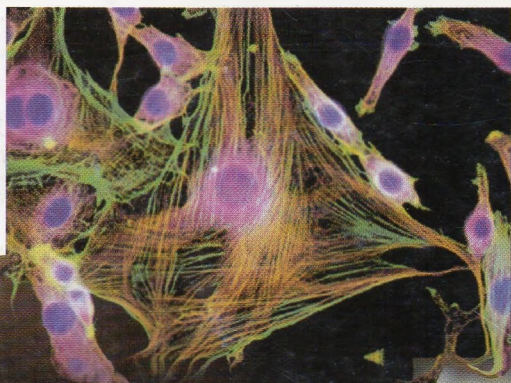


RESUMENES

REUNION IBEROAMERICANA DE BIOQUIMICA, BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOLOGIA CELULAR

30 de Octubre al
3 de Noviembre de 2000



Hotel O'Higgins
Viña del Mar, Chile.

XXIII REUNION ANUAL SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE

XIV REUNION ANUAL SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR DE CHILE

XXVI REUNION ANUAL SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
EN ASOCIACION CON LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

REUNION IBEROAMERICANA DE BIOQUIMICA, BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOLOGIA CELULAR

30 de Octubre al 3 de Noviembre 2000

**Viña del Mar
Chile**

**XXIII REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE**

**XIV REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD
DE BIOLOGIA CELULAR DE CHILE**

**XXXVI REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA
DE INVESTIGACION BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**EN ASOCIACION CON LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

Auspiciadores

Alfatron
Amersham-Pharmacia Argentina
Andes Import
Arquimed
Biodynamics
Bios Chile I.G.S.A.
ETC International
Fermelo S.A.
Genesys
Life Technologies
Lobov y Cia. S.A.
Merck Química Chile Ltda.
Pharma Bril
Rainin
W. Reichmann y Cía. Ltda.
Roche
Sigma Aldrich Argentina
TLC Ltda.
Winkler Ltda.

Patrocinantes

DID, Universidad de Chile
Fundación Ciencia para la Vida
Fundación para la Biología Celular
PABMB
Pontificia Universidad Católica de Chile
Universidad Austral

Programa

LUNES 30 OCTUBRE

14:30-17:00 **INSCRIPCION**

17:-17:30 **INAUGURACION**
Salón Independencia

17:30-18:30 **CONFERENCIA INAUGURAL**
Salón Independencia

MOLECULAR ANALYSIS OF THE EVOLUTION OF EMBRYONIC PATTERN FORMATION.

Dr. Nipam H. Patel
Preside: Roberto Mayor

18:30 a 20:30 **SESIONES DIAPOSITIVAS I-IV**

SESION DIAPOSITIVAS - I Microbiología I
Salón Tatroo

Presidente: A. Venegas
Secretario: O. Orellana

- 18:30 **EXPRESION DE GENES DE *HELICOBACTER PYLORI* EN *ESCHERICHIA. COLI* Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM* PARA EVALUAR SU USO COMO ANTIGENOS EN UNA VACUNA ORAL VIVA.** Gajardo, J., Martínez, P., Palacios, J.L. & Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 18:45 **CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. typhi* Ty2 INDUCIDAS EN ANAEROBIOSIS Y SU RELACION CON EL PROCESO DE INVASION A CELULAS EPITELIALES HUMANAS *in vitro*.** Bucarey, S. y Mora, G., Laboratorio de Microbiología, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 19:00 **SECRECION DE PROTEINAS HIBRIDAS A TRAVES DEL SISTEMA SECRETOR DE PROTEINAS TIPO I DE *Erwinia chrysanthemi*** Palacios, J., Martínez, P., Uribe, F., Socías, T. García V. & Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 19:15 **METALOTIONEINAS EN EL TRYPANOSOMA CRUZI.** Maya, J.D.; Rodríguez, A.; Repetto, Y. y Morello, A. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 19:30 **LA TRIPTOFANIL-tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* TIENE UN SEGMENTO INTERNO PRESCINDIBLE PARA SU FUNCION** Zúñiga R., Salazar, J.C. y Orellana O. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina Universidad de Chile.
- 19:45 **ANALISIS GENOMICO Y FUNCIONAL DE LA FORMACION DE GLUTAMINIL Y ASPARRAGINIL-tRNA EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*.** Orellana, O., Salazar, J.C. y Zúñiga, R. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 20:00 **LA EXPRESION DEL OPERON *fabH1F* DE *BACILLUS SUBTILIS* ESTA RELACIONADA CON EL NIVEL INTRACELULAR DE MALONIL-CoA.** Schujman, G.E. y de Mendoza D. Area Microbiología, IBR-CONICET, Fac. Cs. Biquímicas y Farmacéuticas, UNR.
- 20:15 **TOXICIDAD DIFERENCIAL DE METABOLITOS DE POLICLOROBIFENILOS PARA LA BACTERIA *E. coli*.** Herrera, C., González, M. y Seeger, M. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

SESION DIAPOSITIVAS II - Bioquímica y Estructura de Proteínas
Salón Real Audiencia

Presidente: N. Carvajal
Secretario: A. M. Jabalquinto

- 18:30 **PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y CINETICAS DE FORMAS RECOMBINANTES DE ARGINASA DE HIGADO** López, V., Fuentes, M., Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

- 18:45 **MUTAGENESIS EN EL SITIO DEL METAL LIBRE DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE A. *Succiniciproducens*.** Jabalquinto, A. M., Cabezas, M., Laivenieks, M., Zeikus, J. G. y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y Michigan State University.
- 19:00 **CARACTERIZACION PARCIAL DEL RECEPTOR PARA PEROXIDASA DE LA MUCOSA INTESITAL DEL PEZ *Cyprinus carpio*.** Santander, C., Concha, M.I., Villanueva, J. y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 19:15 **TERMODINAMICA Y CINETICA DE LA RENATURACION *in vitro* DE α - Y β -TUBULINA RECOMBINANTE.** López, M. *Brunet, J., Lagos, R. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. *Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.
- 19:30 **INTERMEDIARIO EN LA RENATURACION DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*** Baez, M., Rodríguez, P., Guixé, V. y Babul, J., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 19:45 **MAPEO PROTEOLITICO DE LA SUBUNIDAD MENOR gpNu1 DE LA TERMINASA λ .** Araya, P., Valenzuela, P., Rosemblatt, M., Murialdo, H., Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB. Avenida Marathon 1943, Santiago.
- 20:00 **EMPAQUETAMIENTO MOLECULAR DE R-FICOERITRINA DE *G. chilensis*. INTERACCIONES Y ANALISIS DE SUPERFICIES** Bunster, M., Contreras-Martel, C., Bruna C., y Martínez-Oyanedel, J. Lab. Biofísica Molecular, Dept. Biología Molecular. Fac. Cs. Biol. Universidad de Concepción
- 20:15 **APLICACION DE METODOS DE REGULARIZACION PARA LA DETERMINACION DEL ESPECTRO DE AFINIDADES EN SISTEMAS PROTEINA-LIGANDO** Adroer, J.; Garcés, J.L.; Mas, F.; Puy, J. y Cascante, M. Departamento de Química Física y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Química, Universitat de Barcelona (UB). C/ Martí i Franquès, 1. E-08028 BARCELONA (ESPAÑA); Departament de Química, E. T. S. Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida (UdL). Av. Rovira Roure, 177. E-25198 LLEIDA (ESPAÑA).

SESION DIAPOSITIVAS III - Estrés Oxidativo

Salón Independencia

Presidente: M. T. Núñez

Secretario: S. Miranda

- 18:30 **ESTUDIO DE BIOGENESIS DE ALDR, UNA PROTEINA DE MEMBRANA PEROXISOMAL EN CELULAS CHO** Toro, A., Venegas, A. y Santos, M. J. Departamentos de Biología Celular y Molecular y Microbiología y Genética Molecular, Universidad Católica de Chile.
- 18:45 **EVIDENCIAS CITOQUIMICAS Y BIOQUIMICAS DE UNA ATPasa EN LA MEMBRANA PEROXISOMAL HUMANA** Araya, C., Skorin, C., Leighton, F., Koenig, C. y Santos, M. J. Departamento de Biología Molecular y Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 19:00 **METABOLISMO DE α -TOCOFEROL (VITAMINA E) EN RATONES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B, TIPO I (SR-BI).** Mardones P, Strobel P, Miranda S, Leighton F, Krieger M, Quiñones V, Rigotti A. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina y Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile; Biology Department, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA.
- 19:15 **ELEVACION DE VITAMINA C PLASMATICA POR CONSUMO MODERADO DE VINO** Strobel P, Pérez DD, *Castillo O, *Rozowski J, *Marshall G, Leighton F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas y *Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 19:30 **MECANISMO PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES POLIFENOLICOS SOBRE LA ACTIVACION ENDOTELIAL** Miranda S#, Martin-Nizard F*, Furman C*, Briand O*, Duriez P*, Leighton F#. * Institut Pasteur, INSERM U325, Lille, France, #Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Prog. Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Fac. Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.
- 19:45 **ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS ENDOTELIALES CAUSADO POR LDL Y HDL OXIDADA. PROTECCION POR ACIDO PROTOCATEQUICO** Zambrano, C., Fonca, R. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Prog. Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas. Fac. Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.
- 20:00 **EL ESTRES OXIDATIVO INDUCIDO POR HIERRO REGULA LA EXPRESION DE CALRETICULINA.** Núñez, M.T. Tapia, V., Vergara, A. y Osorio, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.
- 20:15 **DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR HIERRO EN CELULA DE COLON CACO-2.** Núñez, M.T., Tapia, V., Núñez-Millacura, C., y Okada, S. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile y Okayama University Medical School.

SESION DIAPOSITIVAS IV - Biología Vegetal

Salón Blanco Encalada

Presidente: M. Bunster

Secretario: L. Meza-Basso

- 18:30 **EXPRESION DE UN GEN cry1Ab DE *Bacillus thuringiensis* EN CEPAS DE *B. subtilis* y *B. licheniformis* COLONIZANTES DEL FILOPLANO DEL TOMATE.** Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., González, E. y Meza-Basso, L. Instituto Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.
- 18:45 **MANIPULACION DE LA EXPRESION GENICA DE ALENO OXIDO SINTASA MEDIANTE ARN-ANTISENSE Y SOBRE-EXPRESION PARA MODIFICAR EL CONTENIDO DE ACIDO JASMONICO EN PLANTAS TRANSGENICAS.** Ramírez, J., Sánchez, C., Cárdenas, L. y Peña-Cortés, H. Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile
- 19:00 **CARACTERIZACION DE LA EXPRESION GENICA DE ZEAXANTINA EPOXIDASA (ZE) EN PLANTAS DE TOMATE.** Dorta, F., Ramírez, I., Cárdenas, L. y Peña-Cortés, H. Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile
- 19:15 **EL PRECURSOR SDH2-RPS14 ES PROCESADO PROTEOLITICAMENTE PARA GENERAR RPS14 MITOCONDRIAL EN MAIZ.** Figuerola, P. y Jordana, X. Departamento Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 19:30 **IDENTIFICACION DE UNA FOSFATASA DE PROTEINAS DE LA FAMILIA PP2A EN *Solanum tuberosum* L.** Raíces, M., Chico, J.M., Muñoz, M.J. y Téllez-Iñón, M.T. INGEBI-CONICET y FCEyN-UBA. Vuelta de Obligado 2490 2do (1428) Buenos Aires, Argentina.
- 19:45 **ROL PROTECTOR DE LAS POLIAMINAS EN DISCOS DE HOJA DE GIRASOL SOMETIDOS A ESTRES POR METALES PESADOS.** Groppa, M.D.; Tomaro, M.L. and Benavides, M.P. Cátedra de Química Biológica Vegetal, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
- 20:00 **NATURALEZA DE LA INSENSIBILIDAD AL ABA EN GENOTIPOS DE SORGO CON SUSCEPTIBILIDAD CONTRASTANTE AL BROTAJO PRECOSECHA.** Carrari, F., Pérez-Flores, L., Osuna-Fernández, R., Enciso, S., Sánchez, R., Benech-Arnold, R. y Iusem, N. FCEyN UBA Argentina, UAM-Iztapalapa, Facultad de Ciencias, UNAM, México. IFEVA UBA, Argentina.
- 20:15 **BASES MOLECULARES DE LA TRANSFERENCIA DE LUZ EN LA R-FICOERITRINA DE *Gracilaria chilensis*** Martínez-Oyanedel, J., Contreras-Martel, C., Bruna, C. y Bunster, M. Laboratorio de Biofísica Molecular, Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biológicas, Universidad de Concepción

20:30-21:30 **COCKTAIL**
MARTES 31 OCTUBRE

9:00 – 11:00 **SIMPOSIOS**

Salón Blanco Encalada

ESTRUCTURA Y FUNCION DE PROTEINAS

Coordinadores: Mirta Biscoglio y Miguel Angel de la Rosa

CYTOCHROME C₆ AND PLASTOCYANIN: HOW TWO STRUCTURES SO MUCH DIFFERENT CAN PLAY THE SAME PHYSIOLOGICAL ROLE? De la Rosa M.A., Hervás M., Navarro J.A., Díaz-Quintana A., De la Cerda B., Molina-Heredia F.P., Balme A. and Murdoch S. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y CSIC, Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla, Spain

RECEPTOR NICOTINICO A ACETILCOLINA. CONTRIBUCION AL DELINEAMIENTO DE SITIOS DE UNION DE LIGANDOS. Biscoglio, M.J. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

LA SUBUNIDAD BETA DEL CANAL DE K⁺ ACTIVADO POR Ca²⁺ COMO RECEPTOR DE ESTROGENOS. Latorre, R. Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia Chile.

CHARACTERIZATION OF PROTEIN STRUCTURE USING ELECTROPHORETIC MICROPREPARATIVE TECHNIQUES AND MASS SPECTROMETRY. Hellman U. Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-751 24 Uppsala, Sweden.

Salón Independencia

DAÑO OXIDATIVO: EXPRESION GENICA Y ANTIOXIDANTES

Coordinadores: Federico Leighton y José Viña

EFFECTO DE LAS DIETAS VEGETARIANA, MEDITERRANEA, OCCIDENTAL Y DEL CONSUMO MODERADO DE VINO, SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO AL ADN. Leighton F., Foncea R., Espinoza M., Strobel P., Pérez D.D., Castillo O., Rozowski J. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile

DAÑO OXIDATIVO AL ADN: OCURRENCIA IN VIVO Y PROTECCION POR ANTIOXIDANTES. Fraga, C. G. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

DAÑOS EN EL ADN Y FOTOSENSIBILIZACION. Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M. H. G. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

DAÑO OXIDATIVO AL DNA MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO Y LA APOPTOSIS. IMPORTANCIA PARA EXPLICAR LA DIFERENTE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS. Viña J., Pallardó F.V., Sastre J., Depto. Fisiología, Universidad de Valencia, España.

11:00- 11:30 CAFE

11:30 a 13:00 CONFERENCIA PABMB

Salón Independencia

ENERGY INTERCONVERSION BY THE SARCOPLASMIC RETICULUM CA^{2+} -ATPASE: ATP HYDROLYSIS, CA^{2+} TRANSPORT, ATP SYNTHESIS AND HEAT PRODUCTION.

Dr. Leopoldo de Meis

Preside: Juan C. Slebe

13:00- 14:30 ALMUERZO

14:30-17:00 SESIONES DIAPOSITIVAS V-VIII

SESION DIAPOSITIVAS V - Expresión Génica y Transducción de Señales

Salón: Independencia

Presidente: B.L. Caputto

Secretario: M. Montecino

14:30 **SINTESIS DE FOSFOINOSITIDOS EN CELULAS NIH 3T3. REGULACION POR EL GEN DE EXPRESION TEMPRANA *c-fos*.** Renner, M.L.; Borioli, G; Bussolino, D; Guido, M y Caputto, B.L. CIQUIBIC (CONICET) Depto. Qca. Biol. Fac. Cs. Químicas, UN Córdoba

14:45 **C-FOS SE ASOCIA AL RETICULO ENDOPLASMICO Y ACTIVA EL METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS.** Gil G.A., Bussolino DF, Borioli G, Diema CD, Guido ME y Caputto BL CIQUIBIC, CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC

15:00 **UN NUEVO SISTEMA DE REGULACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ACIDO ARAQUIDONICO CONTROLADO HORMONALMENTE.** Mele P.G., Maloberti P., Bey P., Cano F. y Podestá E.J. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, Argentina.

15:15 **ACTIVACION DE LAS PROTEINAS KINASAS DEL ESTRES POR IGF-1 Y SORBITOL EN CULTIVOS DE CARDIOMIOCITOS.** Ocaranza P., Gonzalez-Jara F, Lavandero S. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

15:30 **PARTICIPACION DE LA ALDOSA REDUCTASA EN LA ACCION ANTI-APOPTOTICA DEL IGF-1.** Gálvez A., Ulloa JA, Lavandero S. Dpto Bioquímica y Biol Molecular. Fac de Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

15:45 **LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G (GRKs) 2 Y 3 SON RESPONSABLES DE LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR A HISTAMINA H2.** Shayo, C., Fernández, N., Lemos, B., Monczor, F., Mladovan, A., Baldi, A. y Davio, C. FCEyN, UBA.; IBYME, CONICET; FFyB, UBA.

- 16:00 **EXPRESION DEL GEN DE OSTEOCALCINA: INFLUENCIA DEL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL SOBRE SU REGION PROMOTORA.** Gutiérrez, J., Imschenetzky, M., Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 16:15 **METILACION DEL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA DE RATA COMO MECANISMO REGULADOR DE LA TRANSCRIPCION TEJIDO-ESPECIFICA.** Villagra, A., Sierra, J., Imschenetzky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 16:30 **INHIBICION DE LA β OXIDACION PEROXISOMAL POR ACIL-CoAS DE DROGAS : ¿UN NUEVO MECANISMO DE ACTIVACION DE PPAR α POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES?** Gatica A., Bronfman M. Unidad de Bioquímica Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.
- 16:45 **IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA VARIANTE DE PROCESAMIENTO DE DlgA DE *Drosophila*.** Mendoza C. y Sierralta J. Programa de Fisiología y Biofísica ICBM. Fac. Medicina. U. de Chile.

SESION DIAPOSITIVAS VI - Enzimología

Salón Tatoo

Presidente: V. Guixé
Secretario: E. Cardemil

- 14:30 **MULTIPLICIDAD ENZIMATICA Y CARACTERIZACION DE MANGANESO PEROXIDASAS RECOMBINANTES DE *Ceriporiopsis subvermispota* y *Phanerochaete chrysosporium*.** Larrondo, L. F., Stewart, P., Cullen D., Salas, L., Lobos S. y Vicuña R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, EE.UU. 3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, F.C.Q.F., U.Ch.
- 14:45 **FOTOENTRECruzamiento de INTEGRASA DE MOLONEY-MuLV Y SUSTRATOS CON 5- IODODESOXIURIDINA (5-IdU).** Pinar, M.B., Vera, J., León, O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 15:00 **ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL tRNA CON LA TIROSIL-tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*.** Salazar, J.C., Lefimil, C. Zúñiga, R. y Orellana, O. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.
- 15:15 **ESTUDIOS CINETICOS Y MARCACION POR AFINIDAD DE DOS ISOAPIRASAS.** Espinosa V., Kettlun AM, Valenzuela MA. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- 15:30 **FUNCION DE Arg336 Y Arg70 EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*.** Llanos, L., Flores, M., Briones, R., Yévenes, A., *Frey, P. A., y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, y *Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison.
- 15:45 **MODELAMIENTO POR HOMOLOGIA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Anaerobiospirillum succiniciproducens*.** Yévenes, A., González-Nilo, F. y Cardemil, E. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.
- 16:00 **PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LAS MUTANTES FLUORESCENTES F219W y F232W DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑON DE CERDO.** Asenjo, J.L., Yañez, A.J., Ludwig, H.C., Droppelmann, C.A. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- 16:15 **MECANISMO DE DESNATURACION Y RENATURACION *in vitro* DEL HETERODIMERO DE α -Y β -TUBULINA** Brunet, J., López, M., Lagos, R. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. *Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.
- 16:30 **MODELAJE MOLECULAR Y MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA DE AGMATINASA DE *ESCHERICHIA COLI*.** Salas M., Rodríguez, R., Herrera, P.*, Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción; CIGB, La Habana, Cuba.
- 16:45 **MODELAMIENTO MOLECULAR DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E.coli*.** Cabrera, R., Babul, J. y Guixé, V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

SESION DIAPOSITIVAS VII - Biología Vegetal I

Salón Real Audiencia

Presidente: L. Holuigui

Secretario: A. Orellana

- 14:30 **EVALUACION DE LA PARTICIPACION DE CK2 Y NPR1 EN LA ACTIVACION TEMPRANA DE GENES INDUCIDA POR ACIDO SALICILICO.** Hidalgo P., Salinas P., Bantignies B., Uquillas C., y Holuigue L. Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 14:45 **FOSFATASA ACIDA EXTRACELULAREN CELULAS DESPRENDIDAS DE COFIAS DE PROSOPIS CHILENSIS EN RESPUESTA A ESTRES SALINO.** Muñoz, G. E. y Rojas, C. Laboratorio de Biología Molecular en Plantas, Instituto de Biología, Universidad Católica de Valparaíso.
- 15:00 **PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA 2-Cys PEROXIRREDOXINA DE HOJAS DE COLZA (*Brassica napus*).** D'Alessio, A.C., Caporaletti, D., Duek, P.D., Rodríguez-Suarez, R.J. y Wolosiuk, R.A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas (F.C.E.N. - U.B.A.), Buenos Aires, Argentina
- 15:15 **CARACTERIZACION DE LA ENZIMA GUANILILTRANSFERASA DE RNA MENSAJERO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.** Cabrejos, M.E., Tamayo, E., y Maldonado, E. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 7, Chile.
- 15:30 **LA MACROALGA VERDE *Enteromorpha Compressa* DE SITIOS CONTAMINADOS ACUMULA METALES PESADOS Y PRESENTA CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.** Ratkevicius, N. y Moenne A. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago.
- 15:45 **EXPRESION DIFERENCIAL DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA GENICA *Asr* POR ESTRES HIDRICO Y MADURACION DEL FRUTO EN TOMATE.** Maskin, L., Carrari, F.O.; Gudesblat, G.E.; Moreno, J.E.; Frankel, N. y Iusem, N.D.. Laboratorio de Biología y Fisiología Molecular. FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- 16:00 **METABOLISMO DE GIBERELINAS EN PROTOPLASTOS DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*.** Torres, V., Urrutia, O., Burgos, A. y Rojas, M.C. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:15 **AVANCES EN LA CLONACION DEL GEN *n* RELACIONADO CON RESISTENCIA A VIRUS EN PLANTAS.** Stange, C., Arce-Johnson, P. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:30 **CARACTERIZACION DE UNA MUTANTE DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EN EL GEN QUE CODIFICA PARA EL TRANSPORTADOR DE NUCLEOTIDO AZUCAR *AtUGaIT2*.** Marchant L., Silva H. y Orellana A. Laboratorio de Fisiología y Genética Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- 16:45 **ROL DE LA SACAROSA EN EL ESTRES SALINO EN *Synechocystis* sp. PCC 6803.** Desplats, P.A. y Salerno, G.L... Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA. C.C.1348, 7600-Mar del Plata, Argentina.

SESION DIAPOSITIVAS VIII - Biología del Desarrollo e Inmunología

SALON Blanco Encalada

Presidente: E. Brandan

Secretario: M.R. Bono

- 14:30 **CARACTERIZACION INICIAL DE LA HOMEOSTASIS DE HIERRO EN CELULAS NEURO-2A (N2A).** Núñez-Millacura C. y Núñez M.T.. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.
- 14:45 **LA EXORODOPSINA COMO UN MARCADOR DE DIFERENCIACION TEMPRANO EN LA GLANDULA PINEAL DE PEZ CEBRA.** Núñez, V., y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 15:00 **ESTUDIO EPITOPICO DE HEMOCIANINA DEL MOLUSCO *Concholepas concholepas* MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES.** Oliva H., De Ioannes A. E. y Becker M. I.. Laboratorio de Inmunología. BIOSONDA S.A.
- 15:15 **PROPIEDADES FISICOQUIMICAS E INMUNOQUIMICAS DE HEMOCIANINA DEL MOLUSCO *Concholepas concholepas*.** De Ioannes P., Moltedo B, Oliva H., Pacheco R, De Ioannes A. E. y Becker M. I.. Laboratorio de Inmunología, BIOSONDA S.A.
- 15:30 **LA EXPRESION DE BIGLICAN AUMENTA EN LA REGENERACION MUSCULAR ESQUELETICA EN EL RATON.** Casar, J.C., Brandan, E. Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

- 15:45 **ANALISIS IN VIVO DEL PROMOTOR DEL GEN *FLOATING HEAD* DE PEZ CEBRA.** D'Alençon, C., Young, R. y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:00 **EL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN LA REGION PROMOTORA DEL GEN OSTEOCALCINA FACILITA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL BASAL Y AUMENTADA POR VITAMINA D.** Sierra, J.: Puchi, M.; Imschenetzky, M y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.
- 16:15 **CAMBIOS MORFOLOGICOS DE ESPERMATIDAS REDONDAS DE RATA *IN VITRO*.** Bucarev J.L., Herrera E. y Reyes J.G. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso
- 16:30 **CELULAS DENDRITICAS DE PLACAS DE PEYER INDUCEN PREFERENCIALMENTE LA INTEGRINA DE HOMING A MUCOSAS $\alpha 4\beta 7$ EN LINFOCITOS T DE RATON.** Mora J.R., Bono M.R. & Roseblatt M., Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB, Santiago, Chile.
- 16:45 **MODIFICACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE CELULAS MUSCULARES INDUCE LA EXPRESION DE MARCADORES DE LINAJE OSTEOBLASTICO.** Osses, N. y Brandan E. Unidad de Neurobiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

17:00-17:30 **CAFE**

17:30-18:30 **CONFERENCIAS**

Salón Blanco Encalada

THE XYLANASES FROM FAMILIES 10 AND 11: DIFFERENTIATION AND CHARACTERISATION.

Dr. Marc Claeysens

Preside: Jaime Eyzaguirre

Salón Independencia

PROPIEDADES DINAMICAS DEL CITOESQUELETO Y TRANSPORTE VECTORIAL DE ORGANELOS

Dr. Juan Fernández

Preside: Mario Roseblatt

18:30-20:30 **SESION DE POSTERS 1**

Biología Celular (Panel 1 al 38)

Farmacología (Panel 39 al 56)

Transducción de señales (Panel 57 al 71)

Regulación de la Expresión Génica (Panel 72 al 97)

20:30 **CENA**

MIÉRCOLES 1 NOVIEMBRE

9:00 – 11:00 **SIMPOSIOS**

Salón Independencia

APROXIMACIONES SISTEMICAS AL ESTUDIO DE LA REGULACION DE VIAS METABOLICAS

Coordinador Tito Ureta

CASCADAS DE ENZIMAS INTERCONVERTIBLES Y SU CONTRIBUCION A LA HOMEOSTASIS. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE CICLOS MÚLTIPLES. Cárdenas, M.L. BIP, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 Ch. Joseph-Aiguier, 13402, Marseille Cedex 20, France

CONTROL Y REGULACION ENZIMATICAS EN MEDIOS (SUPRA)MOLECULARMENTE ORGANIZADOS O SUPERPOBLADOS. Aon, M.A. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH/CONICET), C.C. 164, 7130-Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

APLICACION DE LA TEORIA DEL CONTROL METABOLICO AL DISEÑO DE NUEVAS ESTRATEGIAS ANTITUMORALES. Cascante, M.¹, Comín, B.¹, Boren, J.¹, Centelles, J.J.¹, Lee, W-N.², P.², and L. G. Boros² ¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Martí i Franques, 1 Barcelona 08028, Spain ²Harbor-UCLA Research and Education Institute, UCLA School of Medicine, 1124 West Carson street RB1, Torrance, CA 90502, USA

ORGANIZACION DE VIAS METABOLICAS CITOPLASMICAS EN LA CELULA INTACTA: SINTESIS DE GLICOGENO EN OOCITOS DE RANA. Preller, A. Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Salón Blanco Encalada

MECANISMOS MOLECULARES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Coordinador: Sergio Lavandero

MECANISMOS DE APOPTOSIS DEPENDIENTES DE OXIDO NITRICO. Boscá L. Instituto de Bioquímica. Centro Mixto (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

RETICULO ENDOPLASMICO: ROL DURANTE EL PROCESO DE APOPTOSIS. Bustamante, J., Bersier, G., Aron Badin R., Parodi, A., y Boveris A. Laboratorio Nacional De Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina. Subsidio IB-01, Universidad de Buenos Aires.

TRANSDUCCION DE SEÑALES EN LA INDUCCION Y PREVENCION DE LA APOPTOSIS EN EL CARDIOMIOCITO. Lavandero S., Gálvez A., Eltit JM., Ocaranza P., Morales MP., Carrasco L., Ulloa JA., Campos X., Díaz-Araya G. Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

11:00- 11:30 **CAFE**

11:30-13.00 **ENTREGA MEDALLA HERMANN NIEMEYER**

Salón Independencia

CONFERENCIA OSVALDO CORI

Salón Independencia

ESTRUCTURAS Y MECANISMOS EN LA TRANSCRIPCION DE GENES EN EUCARIONTES

Dr. Pablo Valenzuela

Preside: Pilar Carvallo

13:00- 14:30 **ALMUERZO**

14:30-17:00 **SESIONES DE DIAPOSITIVAS IX-XII**

SESION DIAPOSITIVAS IX - Biología del Desarrollo e Inmunología

Salón Independencia

Presidente: M. Rosemblatt

Secretario: R. Mayor

14:30 **ANALISIS MOLECULAR DE LA INDUCCION DE CRESTAS NEURALES EN *XENOPUS*.** Villanueva S., Ruiz P. y Mayor R. Núcleo milenio Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

14:45 **GLICOESFINGOLIPIDOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ANFIBIOS.** Aybar M.J., Mayor R., Sánchez S. S. Depto. Biología del Desarrollo, INSIBIO (CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán, Argentina. Núcleo Milenio en Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Univ. de Chile, Santiago, Chile.

15:00 **EL GEN NOT REALLY STARTED CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE MEMBRANA ESCENCIAL PARA EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN PEZ CEBRA.** Young, R.M. y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- 15:15 **CARACTERIZACION ELECTROFISIOLOGICA DE SUBTIPOS DE NEURONAS ESPINALES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Xenopus laevis*.** Olguín P., Armisen R. y Kukuljan M. Programa de Fisiología y Biofísica ICBM. Fac. Medicina. U. de Chile
- 15:30 **PATRON DE EXPRESION Y REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE SCG10 DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE *XENOPUS LAEVIS*.** Fuentes, R.A.; Armisen, R y Kukuljan M. Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.
- 15:45 **LA UNION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION *cbf/nf*-y AL PROMOTOR DEL GEN DE LA HISTONA *aH3* ES REGULADA A TRAVES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.** Medina, R., Puchi, M., Imschenetzky, M., Montecino, M. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción.
- 16:00 **LISIS DE CELULAS U937 INFECTADAS CON *S. TYPHI* POR CELULAS NK HUMANAS.** Jara, P., Carrasco, C., Navarro, P., Miranda, D., Blanco, L.P. & Puente, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile
- 16:15 **EL ALERGENO DEL LITRE INHIBE LA RESPIRACION Y MODIFICA COVALENTEMENTE PROTEINAS MITOCONDRIALES AISLADAS DESDE HIGADO DE RATA.** Pacheco, R., Kalergis A., Garbarino J., Ferreira J., De Ioannes A.E. (1) Lab. Inmunología. BIOSONDA S.A. (2) UFSM, Fac. Ciencias (3) ICBM Depto Farmacología Molecular y Clínica, Fac. Medicina, U. de Chile.
- 16:30 **ADHESION LINFOCITARIA INDUCE MHC II, ICAM-1 Y VCAM-1 EN CELULAS ENDOTELIALES HUMANAS.** Reyes, L., Rosembatt, M y Bono, MR. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB, Santiago Chile.
- 16:45 **IL-6 NO ES ESTIMULO OSTEOGENICO PARA LA CELULA PROGENITORA MESENQUIMATICA.** Erices, A. y Minguell, J.J. Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

SESION DIAPOSITIVAS X - Membranas

Salón Blanco Encalada

Presidente: M.P. Marzolo

Secretario: S. Zanlungo

- 14:30 **FOSFORILACION DE LRP Y MEGALINA: DOS RECEPTORES DE LA FAMILIA DEL RECEPTOR DE LDL.** Marzolo, M.P., Solis G., Li, Y., Van Kerkhof² y Bu G. Departamento de Biología, Fac. Ciencias, U. Chile. Dept. Cell Biology and Physiology, Washington University School of Medicine
- 14:45 **MECANISMO MOLECULAR DE PERFRINGOLYSIN O, UNA CITOLISINA DEPENDIENTE DE COLESTEROL QUE FORMA POROS EN LA MEMBRANA LIPIDICA.** Heuck A. P., Tweten R. K., and Johnson A. E. Texas A&M University, College Station, TX 77843-1114. University of Oklahoma, Oklahoma City, OK 73190.
- 15:00 **ALTERACIONES DEL TRANSPORTE HEPATOCITICO VESICULAR, EN UN MODELO DE COLESTASIA AGUDA.** Muñoz P., **Pizarro M., **Solis N., **Accatino L., *Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile; Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 15:15 **LA SOBREEXPRESION HEPATICA DE CAVEOLINA-1 EN RATONES INCREMENTA EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPATICO Y LA SECRECION BILIAR DE SALES BILIARES.** Moreno M., Molina H., Amigo L., Zanlungo S., *Rodriguez-Boulán E., Vio C., Rigotti A., Miquel JF. Depto. Gastroenterología, Facultad de Medicina, Depto. Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Univ. Católica de Chile, Santiago-Chile; *Margaret M. Dyson Vision Research Institute, Cornell University Medical College, NY 10021, USA.
- 15:30 **EXPRESION Y REGULACION DEL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B TIPO I (SR-BI) EN EL EPITELIO DE LA VESICULA BILIAR.** Miquel JF. Moreno M, Molina H., Amigo L, Wistuba I, Acton S, Rigotti A. Deptos. de Gastroenterología y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, P. Univ. Católica de Chile; Cardiovascular Biology, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA.
- 15:45 **METABOLISMO HEPATICO DE COLESTEROL Y ACIDOS BILIARES EN RATONES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B, TIPO I (SR-BI).** Mardones P. Quiñones V, Amigo L, Miquel JF, Trigatti B, Krieger M, Rigotti A. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile y Biology Department, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA.
- 16:00 **DISMINUCION DE LA SECRECION DE COLESTEROL BILIAR Y DEL DESARROLLO DE CALCULOS VESICULARES EN RATONES DEFICIENTES EN APOLIPOPROTEINA E ALIMENTADOS CON DIETAS ENRIQUECIDAS EN COLESTEROL.** Amigo L. Quiñones V, Mardones P, Zanlungo S, Miquel JF, Nervi F, Rigotti A. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

- 16:15 **ASOCIACION FISICA Y FUNCIONAL ENTRE GLICOSILTRANSFERASAS DE GLICOLIPIDOS EN EL COMPLEJO DE GOLGI.** Giraudó, C. G.; Daniotti, J. L. y Maccioni, H. J. F.. CIQUIBIC (UNC-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 16:30 **SOBREEXPRESION DE RAB11 EN CELULAS K 562 ALTERA LA LIBERACION DE EXOSOMAS.** Savina, A., Vidal, B. y Colombo, M.I. IHEM-CONICET, Fac. Ciencias Médicas, U. N. Cuyo, Mendoza, Argentina, y Univ. Montpellier, Francia.
- 16:45 **LOCALIZACION INTRACELULAR Y ESTUDIO FUNCIONAL DE LA GTP-PROTEINA RAB24.** Munafó, D., Goud, B. y Colombo, M.I. IHEM-CONICET. Fac. Ciencias Médicas-UNCuyo-Mendoza-Argentina y Instituto Curie, Paris, Francia.

SESION DIAPOSITIVAS XI - Biología Molecular

Salón Tatoo

Presidente: M. Imschenetzky

Secretario: P. Bull

- 14:30 **CARACTERIZACION DEL RETROTRANSPONSON LTR *TLC1.1* DE *Lycopersicon chilense*.** Ruiz-Lara, S.; Tapia, G.; Yañez, M.; Verdugo, I.; González, E. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. (Patrocinado: Dr. Enrique González). (Financiamiento Fondecyt 1980387 y Programa de Investigación en Biotecnología Vegetal DIAT- UTAL) (INCORPORACION)
- 15:00 **REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DE *Ceriporiopsis subvermispura* INVOLUCRADOS EN LIGNINOLISIS.** Polanco, R., Avila, M., Lobos, S. y Vicuña, R.. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 15:15 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS HOMOCARIOTICAS DEL BASIDIOMICETE LIGNINOLITICO *Ceriporiopsis subvermispura*** Tello M., Cullen D., Vicuña R., Lobos S.. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Forest Products Laboratory, Madison Wisconsin. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- 15:30 **EL GEN DE ENDOXILANASA A DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIA Y ANALISIS TRANSCRIPCIONAL.** Bull, P., Schachter, K., Chávez, R., Almarza, C., Peirano, A. y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:45 **CLONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE NEUROFISINA Y COPEPTIDO ASOCIADOS A LOS PRECURSORES DE ISOTOCINA-VASOTOCINA DEL TELEOSTEO *Cyprinus carpio*.** Flores, C., Muñoz, D. y Figueroa, J. E. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- 16:00 **α L-ARABINOFURANOSIDASA DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIACION Y CARACTERIZACION DEL GEN.** Carvallo, M., De Ioannes, P., Peirano, A., Schachter, K., Bull, P., y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 16:15 **BIOGENESIS DEL COMPLEJO II DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN *ARABIDOPSIS*.** Figueroa, P., León, G., Elorza, A. y Jordana, X. Departamento Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:30 **PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL PRODUCTO DEL GEN W DEL BACTERIOFAGO I.** Murialdo, H. Fundación Ciencia para la Vida. Santiago- Chile.
- 16:45 **REGULACION POR FOSFORILACION DE LA UNION DEL RECEPTOR DE 1 α ,25-DIHIIDROXIVITAMINA D3 AL PROMOTOR DEL GEN DE OSTEOCALCINA DE RATA.** Paredes, R., Gutiérrez, J., Imschenetzky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

SESION DIAPOSITIVAS XII - Microbiología II

Salón Real Audicencia

Presidente: R. Lagos

Secretario: B. González

- 16:15 **ASOCIACION FISICA Y FUNCIONAL ENTRE GLICOSILTRANSFERASAS DE GLICOLIPIDOS EN EL COMPLEJO DE GOLGI.** Giraudó, C. G.; Daniotti, J. L. y Maccioni, H. J. F.. CIQUIBIC (UNC-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 16:30 **SOBREEXPRESION DE RAB11 EN CELULAS K 562 ALTERA LA LIBERACION DE EXOSOMAS.** Savina, A., Vidal, M. y Colombo, M.I. IHEM-CONICET, Fac. Ciencias Médicas, U. N. Cuyo, Mendoza, Argentina, y Univ. Montpellier, Francia.
- 16:45 **LOCALIZACION INTRACELULAR Y ESTUDIO FUNCIONAL DE LA GTP-PROTEINA RAB24.** Munafó, D., Goud, B. y Colombo, M.I. IHEM-CONICET. Fac. Ciencias Médicas-UNCuyo-Mendoza-Argentina y Instituto Curie, Paris, Francia.

SESION DIAPOSITIVAS XI - Biología Molecular

Salón Tatoo

Presidente: M. Imschenetzky

Secretario: P. Bull

- 14:30 **CARACTERIZACION DEL RETROTRANSPONSON LTR *TLC1.1* DE *Lycopersicon chilense*.** Ruiz-Lara, S.; Tapia, G.; Yañez, M.; Verdugo, I.; González, E. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. (Patrocinado: Dr. Enrique González). (Financiamiento Fondecyt 1980387 y Programa de Investigación en Biotecnología Vegetal DIAT- UTAL) (INCORPORACION)
- 15:00 **REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DE *Ceriporiopsis subvermispura* INVOLUCRADOS EN LIGNINOLISIS.** Polanco, R., Avila, M., Lobos, S. y Vicuña, R.. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 15:15 **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS HOMOCARIOTICAS DEL BASIDIOMICETE LIGNINOLITICO *Ceriporiopsis subvermispura*** Tello M., Cullen D., Vicuña R., Lobos S.. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Forest Products Laboratory, Madison Wisconsin. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- 15:30 **EL GEN DE ENDOXILANASA A DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIA Y ANALISIS TRANSCRIPCIONAL.** Bull, P., Schachter, K., Chávez, R., Almarza, C., Peirano, A. y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:45 **CLONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE NEUROFISINA Y COPEPTIDO ASOCIADOS A LOS PRECURSORES DE ISOTOCINA-VASOTOCINA DEL TELEOSTEO *Cyprinus carpio*.** Flores, C., Muñoz, D. y Figueroa, J. E. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- 16:00 **α L-ARABINOFURANOSIDASA DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIACION Y CARACTERIZACION DEL GEN.** Carvallo, M., De Ioannes, P., Peirano, A., Schachter, K., Bull, P., y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 16:15 **BIOGENESIS DEL COMPLEJO II DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN *ARABIDOPSIS*.** Figueroa, P., León, G., Elorza, A. y Jordana, X. Departamento Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:30 **PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL PRODUCTO DEL GEN W DEL BACTERIOFAGO I.** Murialdo, H. Fundación Ciencia para la Vida. Santiago- Chile.
- 16:45 **REGULACION POR FOSFORILACION DE LA UNION DEL RECEPTOR DE 1 α ,25-DIHIIDROXIVITAMINA D3 AL PROMOTOR DEL GEN DE OSTEOCALCINA DE RATA.** Paredes, R., Gutiérrez, J., Imschenetzky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

SESION DIAPOSITIVAS XII - Microbiología II

Salón Real Audicencia

Presidente: R. Lagos

Secretario: B. González

- 14:30 **CAPACIDADES DEGRADATIVAS DE *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134 Y JMP222 QUE CONTIENEN GENES *TFD* QUE PERMITEN LA DEGRADACION DE CLOROCATECOLES Y GENES *XYL*, QUE CODIFICAN PARA TOLUATO 1,2-DIOXIGENASA.** Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., *Pieper, D.H., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE. * Div. of Microbiol. Natl. Res. Centre for Biotechnology. GBF. GERMANY.
- 14:45 **GENES PARA LA DEGRADACION DE 2,4,6-TRICLOROFENOL EN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134.** Matus, V., Sánchez, M.A., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE.
- 15:00 **EFFECTO DEL REORDENAMIENTO DE GENES *TFD* EN EL CATABOLISMO DE CLOROAROMATICOS EN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134.** Clément, P., Manzano, M., Trefault, N. de la Iglesia, R., *Pieper, D., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE. * Div. of Microbiol. Natl. Res. Centre for Biotechnology. GBF. GERMANY.
- 15:15 **EFFECTO DE LA DOSIS GENICA DE LAS ENZIMAS DE LA VIA DEGRADATIVA DE CLOROCATECOLES EN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134.** Pérez-Pantoja, D., Saavedra, M., Ledger, Th. & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE.
- 15:30 **ORGANIZACION Y EXPRESION TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES NECESARIOS PARA LA PRODUCCION DE MICROCINA E492 ACTIVA.** Corsini, G.* y Lagos, R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 15:45 **ESTUDIO GENETICO MOLECULAR DEL GEN DE FITOENO DESHIDROGENASA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*.** León, R.; Barahona, S.; Sepúlveda, D.; Quatrini, R.; Alcaíno, J.; Martínez, C. y Cifuentes, V. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:00 **EFFECTO DE LA DEHIDROLEUCODINA SOBRE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* EN CULTIVO.** Jimenez Ortíz V., Sosa, M.A., Giordano O., Galindo, M., Galanti N. IHEM, UNCuyo; ICBM- Facultad de Medicina, U. de Chile; Cat. Qca. Orgánica, UNSL.
- 16:15 **ASPECTOS CELULARES DE LA DIFERENCIACION POST-LARVAL DE *Mesocestoides corti*.** Espinoza, I.; Ferrer, S.; Galindo, M. y Galanti, N.. Lab. de Biología Molecular, Prog. de Biología Celular y Molecular, I.C.B.M., Facultad de Medicina, Universidad. de Chile.
- 16:30 **ROL DE LA SACAROSA SINTASA EN CIANOBACTERIAS.** Curatti, L., Flores, E. y Salerno, G.L.- Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600 - Mar del Plata - Argentina; IBVyF-CSIC-Sevilla-España
- 16:45 **AISLAMIENTO DE MUTANTES EN EL GEN *tonB* QUE COMPLEMENTAN MUTACIONES EN EL GEN DE INMUNIDAD A MICROCINA E492.** Baeza, M., Monasterio O. y Lagos R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

17:00-17:30 CAFE

17:30-18:30 CONFERENCIAS

Salón Blanco Encalada

RECONOCIMIENTO DE CONFORMEROS MAL PLEGADOS POR UNA GLUCOSILTRANSFERASA

Dr. A.J. Parodi,

Preside: Jorge Babul

Salón Independencia

NEURODEGENERACION EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Dr. Nibaldo Inestrosa

Preside: Ariel Orellana

18:30-20:30 SESION DE POSTERS 2

Macromoléculas (Panel 98 al 123)

Lípidos (Panel 124 al 151)

Biotechnología (Panel 152 al 182)

20:30 CENA

JUEVES 2 NOVIEMBRE9:00 – 11:00 **SIMPOSIOS**

Salón Independencia

BIOMEDICINA

Coordinadora: Pilar Carvallo

HIPERALDOSTERONISMO PRIMARIO EN HIPERTENSOS ESENCIALES: CARACTERIZACION CLINICO-MOLECULAR. Fardella C., Mosso L., Montero J. Departamento de Endocrinología y Medicina Interna. Facultad de Medicina. P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile

EL DEFICIT CONGENITO DE ORNITINA TRANS CARBAMILASA (OTC): MUTACIONES CLINICAS Y CONSECUENCIAS FUNCIONALES SOBRE EL ENZIMA. Climent C., García-Pérez M. A. y Rubio V. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC).

✓ **TRANSPORTADORES ABC EN EL DOMINIO CANALICULAR DEL HEPATOCITO: PAPEL FUNCIONAL Y PATOLOGICO EN ENFERMEDADES HEPATOBILIARES.** Chianale J., Vollrath V., Wielandt AM.. Dpto Gastroenterología, Universidad Católica de Chile.

✓ **TRANSFERENCIA DE GENES TERAPEUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.** Rabinovich G., Laboratorio de Immunogenética. Hospital de Clínicas. Fac. Medicina. UBA. Buenos Aires.

Salón Blanco Encalada

NUEVOS MECANISMOS DE LA EXPRESION DE GENES EN BACTERIAS

Coordinadores: Bernardo González y Diego de Mendoza

COMPLEX REGULATORY PATHWAYS IN THE CONTROL OF BACTERIAL CELL DIVISION. Ferrero L., De la Fuente A, Palacios P., Alvarez J, and Vicente, M. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain

ANALISIS DE LOS DETERMINANTES GENETICOS NECESARIOS PARA LA PRODUCCION DE MICROCINA E492 ACTIVA. Lagos, R., Corsini, G.*, Baeza, M*., Castillo, J.A†., Hetz, C., Strahsburger, E., y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

PERCEPCION Y TRANSDUCCION DE SEÑALES TERMICAS EN *BACILLUS SUBTILIS*. De Mendoza, D. y Aguilar, P. IBR-CONICET y Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, 2000-Rosario, Argentina

REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DEL CATABOLISMO DE CLOROAROMATICOS EN *RALSTONIA EUTROPHA* POR NUMERO DE COPIA, OPERONES REDUNDANTES Y REORDENAMIENTO DE GENES. González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE.

11:00- 11:30 **CAFE**11:30-13:00 **CONFERENCIA LUIS IZQUIERDO**

Salón Independencia

FUNCIONES NO FECUNDANTES DEL COITO**Croxatto H B**

Preside: Mario Roseblatt

13:00- 14:30 **ALMUERZO**14:30-17:00 **ENTREGA PREMIOS A LAS MEJORES TESIS "FUNDACION PARA BIOLOGIA CELULAR"**

Salón Independencia

Preside: Federico Leighton

CONFERENCIA

A FAMILY OF YEAST TRANSCRIPTION FACTORS BELONGING TO THE BZIP PROTEINS, YAPS, REGULATES THE STRESS RESPONSE IN THE BUDDING YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Claudina Rodrigues-Pousada

Preside: Juan C. Slebe

17:00-17:30 CAFE

17:30-18:30 CONFERENCIAS

Salón Independencia

PATOLOGIA MOLECULAR DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS: TRANSPORTADORES HETEROMERICOS Y AMINOACIDURIAS.

Dr. M. Palacín

Preside: Joan J. Guinovart.

Salón Blanco Encalada

HISTORIA NATURAL DE LA ENZIMA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA, PROTOTIPO DE UNA GRAN FAMILIA DE FLAVOPROTEÍNAS TRANSFERASAS DE ELECTRONES.

Dr. N. Carrillo

Preside: Ricardo Boland

18:30-20:30 SESION DE POSTERS 3

Plantas (Panel 183 al 240)

Fisiología Microbiana (Panel 241 al 275)

20:30 CENA

VIERNES 3 NOVIEMBRE

9:00 - 11:00 SIMPOSIOS

Salón Blanco Encalada

BIOLOGIA DEL DESARROLLO

Coordinadores: Miguel Allende y Pablo Wappner

GENERACION DE INFORMACION POSICIONAL EN *DROSOPHILA*. Modolell J., Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C. y U.A.M., 28049 Madrid, España.

CARACTERIZACION DE LA VIA DE SEÑALIZACION DE HIPOXIA. UTILIZACION DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO EXPERIMENTAL. Wappner P., Bocca S.N., Centanin L., Llanos S. L., Muzzopappa M. y Russo D. M., Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Patricias Argentinas 435 (1405), Buenos Aires, Argentina.

THE ALZHEIMER-RELATED GENE PRESENILIN-1 FACILITATES SONIC HEDGEHOG SIGNALING IN *XENOPUS* PRIMARY NEUROGENESIS. Carrasco A. E. Laboratorio de Embriología Molecular, Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 3° piso, 1121, Buenos Aires, Argentina.

DESARROLLO DE LA GLANDULA PINEAL EN PEZ CEBRA. Allende M. L., Young R., d'Alençon C., Nuñez V., Sarrazin A. y Vidal J., Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago, Chile.

Salón Independencia

BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS

Coordinadores: Hugo Peña y Lorenzo Lamattina

COORDINACION DE LA EXPRESION GENICA ENTRE MITOCONDRIA Y NUCLEO EN PLANTAS. Zabaleta, E., IIB.INTECH (CONICET/UNSAM), cc 164, 7130, Chascomús, Argentina.

EFFECTOS CITOPROTECTORES DEL OXIDO NITRICO EN PLANTAS Lamattina, L. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata. CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina.

MODIFICACION DE LA CONCENTRACION ENDOGENA DE ACIDO JASMONICO EN PLANTAS TRANSGENICAS. Peña-Cortés, H., Ramírez I., Sánchez C. y Cárdenas L.. Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVE DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE. Pagés, M. Institut de Biologia Molecular de Barcelona CSIC Jordi Girona 18, 08034 BARCELONA SPAIN

11:00- 11:30 **CAFE**11:30-13:00 **CONFERENCIA ALBERTO SOLS**

Salón Independencia

DE LELOIR A SOLS, O DE LA GLUCOGENO SINTASA A LA GLUCOQUINASA Y VICEVERSA.

Dr. Joan J. Guinovart.

Preside: Ricardo Wolosiuk

13:00- 14:30 **ALMUERZO**14:30-17:00 **SESIONES DE DIAPOSITIVAS XIII-XIV****SESION DIAPOSITIVAS XIII - Biomedicina**

Salón Independencia

Presidente: P. Carvallo

Secretario: J.L. Fiedler

14:30 **ESTUDIO CLINICO-GENETICO MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUISTICA EN LA V REGION, CHILE.** Molina, G.; González, F. Cave, R; Deglin, M; Millinarski, A., Carvallo P.. Laboratorio de Biología y Genética Molecular, Laboratorio de Inmunología, Departamento de Pediatría, Universidad de Valparaíso; Laboratorio de Genética Molecular Humana, Pontificia Universidad Católica de Chile.

14:45 **ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO, EN PACIENTES CON INSENSIBILIDAD PARCIAL A LA HORMONA.** Sjöberg, M., ¹Espinosa, C., ¹Dagnino, A., ²Salazar, T., ²Cassorla, F., ²Meriq, V., ¹Carvallo, P. ¹Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, ²IDIMI, Universidad de Chile, Santiago.

15:00 **RELACION ENTRE NGF Y SU RECEPTOR DE BAJA AFINIDAD (p75NGFR) CON LA GENERACION DE QUISTES.** Avalos, A.M., Lara HE, Fiedler, JL. Laboratorio de Neurobioquímica. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Chile.

15:15 **ACTIVIDAD METALOPROTEINASICA ANORMAL EN PACIENTES CON PARAPARESIA ESPASTICA.** Vásquez, E., Collados L, Kettlun AM, García L, Salgado S, Cartier L, Valenzuela MA. Depto Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Univ. Chile; Depto Ciencias Neurológicas, Fac. Medicina. Univ. Chile.

15:30 **ALELOTIPIFICACION A TRAVES DE TODO EL GENOMA EN CANCER DE LA VESICULA BILIAR (CVB).** Wistuba I., Tang M, Maitra A, Alvarez H, Troncoso P, Pimentel F, Gazdar A. Deptos. de A. Patológica y Cirugía, Facultad de Medicina, P. Univ. Católica de Chile; Hamon Center, UT-Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. (FONDECYT 1990489).

15:45 **PROBABLE MECANISMO CONDUCTENTE A LA OBLITERACION DEL ACUEDUCTO CEREBRAL EN EL RATON MUTANTE *hyh* QUE DESARROLLA HIDROCEFALIA CONGENITA.** Wagner, C., Rodríguez, EM., Rodríguez, S. M Instituto de Histología y Patología. UACH.

- 16:00 CAMBIOS GENETICOS TEMPRANOS EN PIEL HUMANA NORMAL CON EXPOSICION SOLAR.** Brown, N., Carvalho, C., Graumann, R., González, S., Molgó, M., Alvarez, M. y Ziegler, A. Programa de Cáncer, P. Universidad Católica de Chile
- 16:15 CELULAS PRODUCTORAS DE MMPs EN GLANDULAS LABIALES DE PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN Y SU ACCION PROTEOLITICA SOBRE MOLECULAS DE MEC.** Pérez, P.; Alliende, C.; Goicovich, E.; Aguilera, S.; Leyton, C. y González, MJ. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile, Clínica INDISA.
- 16:30 DESORGANIZACION DE LA LAMINA BASAL DE ACINOS Y DUCTOS DE GLANDULAS LABIALES DE PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN.** Molina, C.; Aguilera, S.; Fernández J.; Olea N. Alliende, C.; Leyton, C.; Pinto, R. y González, MJ. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Universidad de Chile y Clínica INDISA.
- 16:45 DESTINACION ANORMAL DE PROTEINAS DE MEMBRANA PEROXISOMAL EN CELULAS HUMANAS MUTANTES EN LA BIOGENESIS PEROXISOMAL.** Toro, A., Araya, C., Perez, C. Venegas, A., Koenig, C. y Santos, M. J., Departamento de Biología Celular y Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

SESION DIAPOSITIVAS XIV - Expresión Génica y Transducción de Señales

Salón Real Audiencia

Presidente: M. Amarai

Secretario: S. Lavandero

- 14:30 CaMK Y MAPK PARTICIPAN EN LA EXPRESION DE PROTEINAS SINAPTICAS.** Mendoza I., García C.J., Awad Y., García-Olivares J., Tonk E. y Cárdenas A.M. Laboratorio de Farmacología, Escuela de Medicina y Centro de Neurociencia de Valparaíso, Universidad de Valparaíso, Chile.
- 14:45 ACTIVACION DE ERK-2 Y FAK EN CARDIOMIOCITOS SOMETIDOS A ESTIRAMIENTO MECANICO O TRATADOS CON AGONISTAS HIPERTROFICOS.** Meléndez I., Campos X, Gálvez A, Lavandero S. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.
- 15:00 ANALISIS MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESION GENICA DIFERENCIAL EN EXPLANTES DE RETINA FETAL HUMANA CULTIVADOS CON DHA.** Martínez, J.I., Uauy R, Rojas C.V. INTA, Universidad de Chile.
- 15:15 DIFERENCIACION DE LA LINEA NEURAL B12 MEDIADA POR ACTIVADORES DE PPAR GAMMA; SINERGISMO CON ACIDO RETINOICO.** Roth A., Leisewitz A. Inestrosa N.C. y Bronfman M. Unidad de Bioquímica Celular y Genética, Fac. de Cs.Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 15:30 AUMENTO DE LA COMUNICACION INTERCELULAR MEDIADO POR ACIDO RETINOICO SE CORRELACIONA CON CAMBIOS EN PROLIFERACION Y APOPTOSIS EN CELULAS MCF-7.** Sáez, C.G., Montoya, M.I. y Alvarez, M. G. Programa de Cáncer. P. Universidad Católica de Chile.
- 15:45 CARACTERIZACION DE LA QUINASA RELACIONADA A LA CDC2P, CRK3, EN TRYPANOSOMA CRUZI.** Santori MI., Laría S, Gomez EB, Muñoz MJ y Téllez Iñón MT. INGEBI – CONICET y FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina.
- 16:00 ROL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-KINASA (PI3-K) EN LA RESPUESTA ANTIAPOTOTICA DEL IGF-1 EN EL CARDIOMIOCITO.** Eltit JM., Morales MP, Lavandero S. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 16:15 FasL EN UTERO DE RATON INDUCE APOPTOSIS DE LINFOCITOS T ACTIVADOS.** Varela-Nallar, L., Figueroa, C., Gonzalez P., Cárdenas, H., Imarai, M. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.
- 16:30 EFECTOS DE LA ADMINISTRACION AGUDA Y REPETIDA DE ANFETAMIINA SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DEL RECEPTOR OPIOIDE delta EN CEREBROS DE RATA.** Magendzo, K y Bustos, G. Lab. de Farmacología-Bioquímica, Facultad de Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Gysling, K).
- 16:45 ANALISIS MOLECULAR DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN UN CULTIVO DE NEURONAS RCSN INCUBADAS CON SALSOLINOL. POSIBLES IMPLICANCIAS EN LA ETIOPATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.** Dagnino-Subiabre, A., Martínez, P., Paris, I., Caviedes R., Caviedes P., Segura-Aguilar J. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Programa de Morfología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

SESION DIAPOSITIVAS XV - Biología Celular

Salón Blanco

Presidente: J. Martínez

Secretario: J. Concha

- 14:30 **HISTONA H1 ES UN LIGANDO ENDOGENO DE PROTEOGLICANES DE HEPARANSULFATO EN LA MATRIZ EXTRACELULAR QUE INDUCE LA PROLIFERACION DE CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS.** Henríquez JP., Fuentealba L y Brandan E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (INCORPORACION)
- 15:00 **RAB22a ALTERA LA MORFOLOGIA Y FUNCION DE LA VIA ENDOCITICA.** Mesa, R. Salomón, C. Roggero, M. Mayorga, L. IHEM, Fac. Cs. Médicas, U. N. Cuyo - CONICET, CC56, 5500 Mendoza.
- 15:15 **LOCALIZACION DE COXIELLA BURNETII EN COMPARTIMIENTOS INTRACELULARES MARCADOS CON PROTEINAS RAB7.** Berón, W., Rabinovitch, M y Colombo, M.I.. Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, y Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brasil.
- 15:30 **CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DE ACIDO ASCORBICO EN NEURONAS CORTICALES EMBRIONARIAS.** Castro, M. A. y Nualart F. Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.
- 15:45 **SINAPTOTAGMINA VI PARTICIPA EN LA REACCION ACROSOMAL.** Michaut M. De Blas G, Tomes C, Yunes R, Mayorga L. Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Fac. Cs. Médicas. Univ. Nac. de Cuyo.
- 16:00 **HFE REGULA NEGATIVAMENTE EL TRANSPORTE APICAL DE HIERRO EN CELULAS EPITELIALES CACO-2.** Arredondo, M., Mura, C., Muñoz, P. y Núñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.
- 16:15 **EXPRESION DE RECEPTORES PARA GM-CSF, IL-3 E IL-5 EN CELULAS GERMINALES.** Werner, E., Brito, M., Zambrano, A., Espinoza, M., Pérez, M., Rauch, M.C. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- 16:30 **INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ATPasa DE MIOSINA II POR FOSFORILACION CON EMAP2 KINASA.** López, L.A. IHEM, UNCuyo cc 56 5500 Mendoza. Argentina.
- 16:45 **LA PLACA DEL SUELO IN VITRO SECRETA COMPUESTOS SIMILARES O IDENTICOS A LAS GLICOPROTEINAS CONSTITUTIVAS DE LA FIBRA DE REISSNER.** Guñazu M.E., Richter H., Rodriguez E.M. Instituto de Histología y Patología. UACH.

SESION DIAPOSITIVAS XVI - Bioquímica/Fisiología-

Salón Tatoo

Presidente: V. Fernández

Secretario: J. Ferreira

- 14:30 **ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS EN PLASMA Y ERITROCITOS DE LACTANTES DESNUTRIDOS ALIMENTADOS CON LECHE MATERNA O FORMULAS.** Marín M.C., Rey G.E., Rodrigo M.A., Alaniz M.J.T. de. INIBIOLP (Fac. Cs Médicas-UNLP), Hospital de Niños de La Plata.
- 14:45 **EFFECTO DEL HIERRO IN VITRO SOBRE LA GENERACION DE OXIDO NITRICO HEPATICO EN RATAS EUTIROIDEAS E HIPERTIROIDEAS.** Cornejo, P., Tapia, G., Videla, L. A., Fernández, V. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- 15:00 **METABOLISMO HEPATICO DE COLESTEROL EN RATONES DEFICIENTES EN LA PROTEINA NPC-1** Mendoza, H., Amigo, L., Rigotti, A., Nervi, F., Zanlungo, S. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- 15:15 **LA SOBREEXPRESION DE "STEROL CARRIER PROTEIN-2" EN EL HIGADO MEDIANTE ADENOVIRUS MODIFICA EL METABOLISMO DE LOS ACIDOS GRASOS.** Zanlungo, S., Amigo, L., Mendoza, H., Miquel, JF, Rigotti, A., Nervi, F. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- 15:30 **IMPORTANCIA DE LA ADRENAL SOBRE LA REGULACION DE 11 β -HIDROXIESTEROIDE DEHIDROGENASA 2 (HSD2) RENAL EN DIFERENTES TIPOS DE ESTRES AGUDO.** Zallocchi, M., Igarreta, P., Calvo, J.C., Lantos, C.P. y Damasco, M.C. Programa de Regulación Hormonal y Metabólica. CONICET. UBA.

- 15:45 INHIBICION DE LA RESPIRACION POR ESTERES DEL ACIDO 2,6-DIHIIDROXI-4-CARBOXIFENOXIACETICO (DIHICARFACET) Y SU PAPEL EN LA RESTAURACION DE LA SENSIBILIDAD A DROGAS EN EL CARCINOMA MULTIRRESISTENTE TA3-MTX-R.** Ferreira, J., Griñó, B., Gajardo, P., Pavani, M., Guerrero, A., Repetto, Y., *Cordano, G., *Rivera, E., *Muñoz, S. y *Medina, J. Prog. de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina y *Depto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 16:00 LA DESPOLIMERIZACION MICROTUBULAR Y EL CALCIO CITOSOLICO MODIFICAN LA CAPTACION DE PALMITATO Y LA BIOSINTESIS DE PALMITOLEATO EN CELULAS HEP-G2, A TRAVES DE DIFERENTES MECANISMOS.** Marra, C.A. y Alaniz, M.J.T. INIBIOLP (Inst. Investig. Bioquímicas de La Plata). Cat. Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas. Univ. Nac. de La Plata. 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina.
- 16:15 LA SEÑAL DEL CALCIO REGULA LA CAPTACION Y METABOLISMO DE PALMITATO EN CELULAS HEP-G2.** Marra, C.A. y Alaniz, M.J. T. INIBIOLP (Inst. Investig. Bioquímicas de La Plata). Cat. de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas. Univ. Nac. de la Plata, 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina.
- 16:30 IMPORTANCIA DE LAS PROPIEDADES REGULADORAS DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA EN LA GLICOLISIS Y GLUCONEOGENESIS.** Ortega, E., Guixé, V. y Cascante, M. (Facultat de Química, Universitat de Barcelona; Facultad de Ciencias, Universidad de Chile; Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay).
- 16:45 UNA ESTRATEGIA GENERAL PARA EL DISEÑO Y POSTERIOR ANALISIS DE GRANDES CAMBIOS METABOLICOS.** Acherenza, L. Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

17:00-17:30 CAFE

17:30-18:30 CONFERENCIAS

Salón Independencia

LA INTERACCION DE *SALMONELLA* CON SU CELULA HUESPED.

Dr. Jorge E. Galán.

Preside: Luis Ielpi

Salón Blanco Encalada

CONFERENCIA EMBO

Dr. Claude Keding

Presidente: José Luis Bocco

18:30-20:30 SESION DE POSTERS 4

Metabolismo Microbiano (Panel 276 al 309)

Virus (Panel 310 al 331)

Protozoología (Panel 332 al 355)

Enzimología (Panel 356 al 374)

20:30 CENA

Conferencias

Conferencia Inaugural

MOLECULAR ANALYSIS OF THE EVOLUTION OF EMBRYONIC PATTERN FORMATION. Nipam H. Patel

University of Chicago, Dept of Organismal Biology and Anatomy, Howard Hughes Medical Institute. MC 1028, N-101

Identification of genes that play major roles in setting up the body plan in several model systems, combined with the subsequent discovery that many of these genes are well conserved even between different phyla, has led to a renaissance in the investigation of the links between evolution and development. By investigating the roles of homeotic, gap, pair-rule, and segment polarity genes in a number of different arthropods, we can come to some hypotheses about how the genetic pathways controlling animal body patterning have evolved. I will focus on our recent analysis of the homeodomain containing genes of the Pax3,7 family and the zinc-finger containing hunchback protein. These studies suggest that certain aspects of segmentation and axis formation seen in *Drosophila* are ancestral for all insects, but other aspects of *Drosophila* segmentation represent derived mechanisms used by probably only the most phylogenetically advanced insects.

Conferencia PABMB

ENERGY INTERCONVERSION BY THE SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} -ATPase: ATP HYDROLYSIS, Ca^{2+} TRANSPORT, ATP SYNTHESIS AND HEAT PRODUCTION. Leopoldo de Meis, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, RJ 21941-590, Brazil

The sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle retains a membrane bound Ca^{2+} -ATPase which is able to interconvert different forms of energy. A part of the chemical energy released during ATP hydrolysis is converted into heat and in the bibliography it is assumed that the amount of heat produced during the hydrolysis of an ATP molecule is always the same, as if the energy released during ATP cleavage were divided in two non-interchangeable parts: one would be converted into heat, and the other used for Ca^{2+} transport. Data obtained in our laboratory during the past three years indicate that the amount of heat released during the hydrolysis of ATP may vary between 7 and 32 Kcal/mol depending on whether or not a transmembrane Ca^{2+} gradient is formed across the sarcoplasmic reticulum membrane. Drugs such as heparin and dimethyl sulfoxide are able to modify the fraction of the chemical energy released during ATP hydrolysis which is used for Ca^{2+} transport and the fraction which is dissipated in the surrounding medium as heat.

THE XYLANASES FROM FAMILIES 10 AND 11: DIFFERENTIATION AND CHARACTERISATION. Marc Claeysens University of Ghent, Belgium

Using newly synthesised chromogenic and fluorogenic substrates and ligands, the specificities of several xylanases from families 10 and 11 have been compared.

Structure/function relationships within each family could clearly be established. Family 10 xylanases exhibit structural particularities which account for their relaxed substrate specificity at the several subsites. In these enzymes, glutamine, tyrosine and/or tryptophane residues are involved in the active site build-up. The inability of alkyl xyloside derived epoxides to inactivate is attributed to sterical factors and specific binding modes of these ligands (P. Ntarima, W. Nerinckx, K. Klarskov, B. Devreese, M. K. Bhat, J. Van Beeumen, and M. Claeysens, *Biochem. J.* **347**, 2000, 865-873). On the other hand, catalytic versatility exists in terms of transfer activities observed with alcohols. Thus, alcoholysis catalysed by family 10 enzymes allows successful preparation of alkyl glycosides.

In counterpart, the specificity of family 11 enzymes is far more strict since only $\beta(1-4)$ xylopyranosyl linkages are recognised. (R,S)-Epoxy alkyl glycosides derived from D-xylose and xylo-oligosaccharides are successfully used for affinity labeling, proving the identity of resp. a glutamic acid as general acid catalyst and another carboxylic residue as nucleophilic agent. This confirms crystallographic data published earlier (R. Havukainen, A. Törrönen, T. Laitinen and J. Rouvinen, *Biochemistry* **35**, 1996, 9617-9624). Incidentally, the stereospecificity (R or S) observed does not correspond with this predicted in a recent theoretical study (T. Laitinen, J. Rouvinen and M. Peräkylä, *Protein Eng.* **13**, 2000, 247-252). Enzymes from both families (*Cryptococcus adeliae*, family 10 and *Thermomyces lanuginosus*, family 11) were used in the structural analysis of a seaweed xylan. As a result, the regular repartition of $\beta(1-4)$ against $\beta(1-3)$ linkages in a ratio 7/1 could be envisaged. The family 10 xylanase yields a mixed linkage type xylotriose as main reaction product upon complete enzymatic catalysed hydrolysis, whereas the presence of a mixed linkage type xylotetraose in the case of the family 11 xylanase points to a more restricted degradation mode. Detailed structural evidences were obtained for several oligosaccharides, using both physico-chemical (NMR, MS) methods and enzymatic analysis, exploiting the alcoholysis reactions catalysed by family 10 enzymes.

PROPIEDADES DINAMICAS DEL CITOESQUELETO Y TRANSPORTE VECTORIAL DE ORGANELOS Juan Fernández, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

El citoesqueleto es un componente ubicuo y multifuncional de la célula eucariótica involucrado en procesos como el movimiento y cambio de forma celular - la síntesis, anclaje y secreción de proteínas - el transporte y anclaje de transcriptos - el movimiento de organelos - la división celular - la adquisición de polaridad celular, etc. Para estudiar la manera como el citoesqueleto participa en estos procesos se han utilizado diferentes modelos celulares. Por ejemplo, la célula nerviosa y pigmentaria para el transporte citoplasmático a distancia, las levaduras y células epiteliales para el desarrollo de polaridad, los fibroblastos y las amebas para el movimiento celular, los huevos de invertebrados para la división celular. En esta ocasión deseo mostrarles que el cigoto de la sanguijuela representa un modelo muy adecuado para estudiar como la célula puede generar compartimientos o dominios citoplasmáticos mediante sucesivos episodios de reorganización del citoesqueleto acompañados de la redistribución del citoplasma. Así, antes que se inicien las divisiones de clivaje el cigoto forma 3 voluminosos dominios de citoplasma rico en organelos a lo largo del eje animal-vegetal: los teloplasmas en los polos y el plasma perinuclear en el centro. Los teloplasmas, que además contienen determinantes morfogénicos, son ordenadamente transferidos a 5 pares de células troncales, o teloblastos, que utilizan los teloplasmas en la formación de las células blásticas que dan origen a los linajes ecto y mesodérmicos del embrión. El plasma perinuclear incluye el/los centrosomas, ensambla el huso de clivaje y se subdivide al final de cada división celular. Probablemente almacena los factores que regulan el ciclo celular. El citoesqueleto del cigoto comprende un componente interno y otro externo. El interno o endoplásmico constituye un monasterio formado de microtúbulos nucleados por el centrosoma aportado por el espermatozoide. Estos microtúbulos transportan los organelos en dirección centrífuga o centrípeto, acumulándolos en el centro o periferia del cigoto. El citoesqueleto externo o ectoplásmico consiste de focos discretos de ensamblaje/desensamblaje de microtúbulos y microfilamentos que constituyen citásteres. Durante la primera interfase los citásteres cargados de organelos se mueven a través de la superficie celular convergiendo o divergiendo uno de los otros, para finalmente coalescer en anillos y meridianos que se mueven hacia cada uno de los polos. Este proceso, que es detenido o alterado por drogas citostáticas, análogos del ATP y taxol, probablemente depende de la actividad de la dineína citoplasmática y proteína quinasas. A medida que se acumulan organelos en los polos del cigoto el citoesqueleto que los acompaña se despolimeriza y sus componentes se suman al inventario de tubulina y actina monoméricas. Este orquestado proceso de segregación ovoplásmica se puede realizar gracias al ensamblaje de un armazón transitorio de microtúbulos, microfilamentos y organelos, similar al de un huso mitótico, que avanzaría bipolarmente desde el ecuador del cigoto por deslizamiento de sus componentes fibrilares asociados con motores moleculares (Financiado por Fondecyt, proyecto 1991006).

CONFERENCIA OSVALDO CORI

ESTRUCTURAS Y MECANISMOS EN LA TRANSCRIPCION DE GENES EN EUKARIONTES. (Structures and mechanisms in eukaryotic gene transcription). Valenzuela, P., Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio MIFAB. Avenida Marathon 1943, Santiago.

La transcripción específica de genes en eucariontes es un fascinante proceso en el cual intervienen una multitud de complejos multiproteicos. El rol central lo juega la RNA polimerasa II (Pol II), compuesta de 12 subunidades (RPB1 a RPB12) cuya estructura ha sido dilucidada a una resolución de 3°A. Para que esta enzima sea capaz de reconocer promotores en forma específica debe asociarse a una serie de Factores Generales de Transcripción (GTFs) cuyas estructuras y funcionalidades están siendo dilucidadas. El complejo formado entre la Pol II y los GTFs no responde a regulación. Para esto se requiere la participación de otros mediadores, tales como el SRB/Mediador, el complejo SRB/CDK y otros, que existen como complejos multiproteicos que pueden compartir subunidades y tener funcionalidades que se sobrepone.

En esta presentación se discutirán estudios estructurales, bioquímicos y genéticos a través de los cuales se está dilucidando como esta exquisita ensalada de mas de medio centenar de proteínas interactúa con gran especificidad haciendo posible el control transcripcional de la expresión génica.

RECONOCIMIENTO DE CONFORMEROS MAL PLEGADOS POR UNA GLUCOSILTRANSFERASA (Glucosyltransferase recognition of misfolded conformers). Parodi, A. J. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad de San Martín

Monoglucosylated, protein linked oligosaccharides may be formed in the ER by two alternative pathways, either by glucosidase I and II-mediated partial deglycosylation of the oligosaccharide transferred to nascent polypeptide chains (Glc₃Man₉GlcNAc₂) or by reglucosylation of glucose-free glycans (Man₇₋₉GlcNAc₂) mediated by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase (GT). This is a key element of the quality control of glycoprotein folding in the ER mediated by the interaction of monoglucosylated glycans and ER-resident lectins (calnexin and calreticulin) as this enzyme only glucosylates high mannose-type oligosaccharides linked to incompletely folded protein moieties. In order to characterize structures recognized by GT in misfolded conformers we synthesized neoglycoproteins by chemical coupling Man₉GlcNAc₂ to full length or truncated staphylococcal nucleases. It was found that conformers structurally not substantially differing from native neoglycoproteins were good GT substrates. To check if GT also required at least partially structured conformers as substrates *in vivo*, we obtained double *Schizosaccharomyces pombe* mutants that transferred Man₉GlcNAc₂ in protein glycosylation and lacked glucosidase II. Induction of protein misfolding in the ER by the addition of dithiothreitol to live cells did not result in a generalized increase in glycoprotein glucosylation. In addition, *in vivo* GT-mediated glucosylation of cruzipain, a lysosomal proteinase of the parasite *Trypanosoma cruzi* occurred when all or nearly all of the 6-7 disulfide bridges had already been formed. It is suggested that *in vivo* GT glucosylates glycoproteins not at their initial but at their last folding stages.

Supported by WHO, HHMI, NIH and ANPCYT

NEURODEGENERACION EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (Neurodegenerative processes in Alzheimer's disease) Inestrosa N.C. Centro para Regulación Celular y Patología, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología relacionada - pero no dependiente- de la edad, y hoy representa la causa más común de demencia en la población del adulto mayor. Al respecto, dos hipótesis pretenden explicar el nacimiento y desarrollo de la patología: (a) la *hipótesis de la cascada del amiloide*, que da cuenta de la producción, agregación, deposición extracelular y toxicidad del péptido β -amiloide (A β); y (b) la *hipótesis de la degeneración del citoesqueleto*, que da cuenta a su vez, de la agregación y deposición intracelular de ovillos neurofibrilares (ONFs) de la proteína tau. En este contexto, data generada en nuestro laboratorio indica que el proceso de muerte neuronal -dependiente de las propiedades neurotóxicas de complejos de péptido A β (A β -acetilcolinesterasa)- es modulado por la actividad de componentes clásicos de la vía de transducción de señales *Wnt* (ej. activación de la enzima glicógeno sintasa quinasa-3 β y desestabilización citosólica de la proteína β -catenina, entre otros). Desde una perspectiva farmacológica, nuestros resultados pretenden explicar la aparición de marcadores tempranos de la EA (i.e. formación de depósitos de β -amiloide y ONFs), y sugieren la posibilidad de intervenir el proceso neurodegenerativo mediante el uso de inhibidores/activadores específicos de la vía de señales de *Wnt* (ej. sales de litio). Financiado por Cátedra Presidencial en Ciencias y FONDAP-Biomedicina° N° 13980001.

Conferencia Luis Izquierdo

FUNCIONES NO FECUNDANTES DEL COITO. (Functions of mating other than providing the fertilizing sperm) Croxatto H B

En los mamíferos el coito fértil tiene un tremendo y duradero impacto sobre la fisiología de la hembra, que se resume en el embarazo, la lactancia y la crianza. Este impacto depende de que el coito provea exitosamente espermatozoides fecundantes, y universalmente esta es su función mas obvia. En algunas especies que no ovulan espontáneamente, el coito gatilla el estímulo ovulatorio y también en algunas desencadena el estímulo luteotrófico esencial para el comienzo de la gestación. El coito tiene a lo menos tres componentes biológicamente significativos: el mecánico que provee el estímulo sensorial, el líquido del semen que provee un gran repertorio de mensajeros químicos y las células espermáticas. Pocos estudios han enfocado cada uno de estos tres componentes como un estímulo fisiológico que actúa sobre tracto genital de la hembra modificando su funcionamiento pero se está acumulando información que indica que tal es el caso. El estímulo sensorial provoca reflejos neuroendocrinos que no parecen relacionados con la estimulación de la ovulación o del cuerpo luteo. En numerosas especies en las cuales la inseminación es intrauterina, componentes solubles del semen como TGF- β o renina actúan sobre el epitelio uterino provocando respuestas genómicas y no genómicas de estas células. Al tracto genital de la hembra ingresan en cada eyaculación alrededor de 100 millones de espermatozoides y no mas de una docena cumple la función de fecundar. El aparentemente excesivo número de espermatozoides no fecundantes no lo sería tal si cumplieran alguna otra función. Algunos datos indican que los espermatozoides no fecundantes contribuyen a optimizar el proceso reproductivo pero el mecanismo es incierto. En nuestro laboratorio hemos descubierto que el coito cambia en pocas horas la respuesta del oviducto de la rata al estradiol. No solo lo hace menos sensible sino que además cambia su mecanismo de acción de uno predominantemente no genómico a uno predominantemente genómico. En el biocosmos todo parece posible incluso aquello que nuestra imaginación demora siglos en concebir.

Financiamiento de RF98024#98 y Cátedra Presidencial H Croxatto.

A FAMILY OF YEAST TRANSCRIPTION FACTORS BELONGING TO THE bZIP PROTEINS, YAPS, REGULATES THE STRESS RESPONSE IN THE BUDDING YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Rodríguez-Pousada, Claudina , ITQB, Laboratory of Genomics and Stress, Ap. 127, 2781-901 Oeiras , Portugal

Eukaryotic cells sense and respond to sudden changes in their environment , e.g. elevation of the physiological temperature and a variety of chemical agents, by rapidly inducing the synthesis of stress proteins (SPs); concomitantly the expression of the majority of the genes is lowered or even shut-off under stress. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, HSF is constitutively bound to the HS-gene promoters and seems not to be needed for the induction of tolerance against severe stress being required for growth during moderate stress. HSF-independent heat stress control elements were also identified in the promoter regions of a DNA damage - responsive (DDR2) gene and in several other genes. They possess, besides the HSE in their promoters, Stress Response Elements (STRE - AGGG or CCCT) or variants of these modules. The transcription factors, Msn2 and Msn4 specifically bind the STREs and are also required in concert with Hog1 to control gene expression under osmotic stress but also by heat-shock and nutrient starvation. We have described regulatory transcription factors belonging to the bZip gene family, formed by eight members which all bind the DNA consensus sequence T(T/C)AGT(A/C)A. Yap1 transcriptional activity is stimulated by hydrogen peroxide and other oxidative agents whereas Yap2 is activated by aminotriazol and cadmium. Although the function of Yap1 starts to be understood the function of the remaining Yaps is still unclear although the majority of them are presumed to regulate genes involved in pleiotropic drug resistance. Data recently obtained will be presented and discussed.

PATOLOGIA MOLECULAR DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS: TRANSPORTADORES HETEROMERICOS Y AMINOACIDURIAS. Manuel Palacín. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Biología. Avda. Diagonal 645. Barcelona 08028

La cistinuria es un desorden recesivo común (1/7.000 en población occidental) de la reabsorción renal de cistina y aminoácidos básicos que causa nefrolitiasis de cistina. Garrod describió en 1908 la cistinuria entre los cuatro primeros "inborn errors" reconocidos. La lisinuria con intolerancia a proteínas (LPI) es también una aminoaciduria recesiva, debida al defecto en el transporte de aminoácidos básicos en el dominio basolateral de las células epiteliales del túbulo renal y del intestino delgado. A diferencia de la cistinuria, LPI es una enfermedad poco común (~200 enfermos conocidos en todo el mundo). Los pacientes con LPI sufren alteraciones multisistémicas: malnutrición proteica e hiperamonemia con aversión a la ingesta de proteínas, y en algunos casos osteoporosis, respuesta inflamatoria y proteinosis pulmonar.

En 1992, nosotros y otros laboratorios clonamos el gen denominado rBAT y demostramos que su gen homólogo 4F2hc (cadena pesada del antígeno de superficie 4F2; también llamado CD98) también induce transporte de aminoácidos en oocitos (intercambiadores y+L y L). La expresión de rBAT en oocitos de *Xenopus* resulta en la inducción del transporte de aminoácidos bo,+ . La actividad de rBAT y su localización en el dominio apical de las células epiteliales del túbulo proximal y del intestino delgado hicieron de rBAT (*SLC3A1*) un gen candidato de cistinuria. El análisis mutacional de *SLC3A1* reveló la existencia de mutaciones específicas de cistinuria (más de 40 mutaciones descritas).

En la cistinuria se distinguen al menos dos fenotipos: Tipo I y Tipo no-I. En el Tipo I los heterocigotos son silentes (sin hiperexcreción de cistina y aminoácidos básicos en orina). Por el contrario en los de Tipo no-I, estos niveles son superiores al rango de normalidad. Estudios de ligamiento genético con marcadores situados en el locus *SLC3A1* (2p16.3-21) y de análisis mutacional demostraron que la cistinuria de Tipo I pero no la de Tipo no-I era debida a mutaciones en *SLC3A1*. Así mismo se demostró que el gen de la cistinuria de Tipo no-I localiza en el cromosoma 19.

Las proteínas rBAT y 4F2hc (cadenas pesadas de transportadores heteroméricos de aminoácidos; HSHAT) se unen por puentes disulfuro a otras proteínas de menor tamaño (movilidad electroforética de ~40 kDa) (cadenas ligeras; LSHAT) para dar lugar a los transportadores de aminoácidos. Desde 1998, se han identificado varios miembros de la familia LSHAT: LAT-1, LAT-2, y+LAT-1, y+LAT-2, xCT y bo,+AT. La especificidad de sustrato en estos transportadores depende de la correspondiente LSHAT: i) 4F2hc se asocia con LAT-1 y LAT-2 (sistema L), con y+LAT-1 y y+LAT-2 (sistema y+L) y con xCT (sistema xc-). ii) rBAT se asocia con bo,+AT (cromosoma 19) (sistema bo,+).

El análisis mutacional de *SLC7A7* reveló que es el gen causante de LPI. Conocemos ~20 mutaciones en *SLC7A7* causantes de LPI. Todas las mutaciones estudiadas muestran pérdida de función. El análisis mutacional del gen *SLC7A9* ha revelado 36 mutaciones, mayoritariamente asociadas a la cistinuria de Tipo no I. Cinco de estas mutaciones han sido estudiadas funcionalmente mostrando pérdida de función de transporte. Es interesante señalar que existe correlación entre la actividad de transporte residual y los niveles de cistina y aminoácidos básicos en los heterocigotos de estas mutaciones.

HISTORIA NATURAL DE LA ENZIMA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA, PROTOTIPO DE UNA GRAN FAMILIA DE FLAVOPROTEINAS TRANSFERASAS DE ELECTRONES. N. Carrillo*, A. K. Arakaki, J. F. Palatnik, A. R. Krapp, E. M. Valle y E. A. Ceccarelli, IBR, Universidad de Rosario, Argentina.

La ferredoxina-NADP reductasa (FNR) es una enzima que utiliza FAD, y que se encuentra ampliamente distribuida en cloroplastos, mitocondrias y bacterias. FNR es un monómero hidrofílico formado por dos dominios de 150 residuos cada uno: el N-terminal que une FAD y el C-terminal que une NADP. Este doble dominio constituye el prototipo estructural de una vasta familia de transferasas de electrones que operan siguiendo procesos mecanísticos semejantes, y que representan una antigua y universal solución evolutiva al problema de transducir eficientemente electrones entre transportadores mono- y bieletrónicos obligatorios. Dos cuestiones de interés general en la biología de FNR han sido abordadas en este trabajo. Por razones mecanísticas, no había sido posible obtener estructuras del complejo de estas proteínas con su sustrato NADP(H), lo que impidió durante décadas formular modelos para el proceso catalítico en este gran grupo de electrón transferasas. Como interés aplicado, FNR presenta cualidades muy atractivas como detoxificador de una cantidad de compuestos aromáticos, incluyendo nitroderivados explosivos, y funciona como protector general contra el estrés oxidativo y por xenobióticos. Se describen estudios sobre la biología de esta enzima, incluyendo a) biogénesis y transporte celular en plantas, b) aumento de la eficiencia catalítica con NADP(H), c) resolución de complejos funcionales enzima-NADP(H) a nivel atómico, d) mecanismo de transferencia electrónica para esta familia de flavoenzimas, e) cambios de especificidad de sustrato de NADP(H) a NAD(H), f) rol antioxidante en bacterias y plantas transgénicas.

Conferencia Alberto Sols

DE LOIRO A SOLS, O DE LA GLUCOGENO SINTASA A LA GLUCOQUINASA Y VICEVERSA. Joan J. Guinovart. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona. España

El hígado juega un papel fundamental en el control de la homeostasis de la glucosa, acumulándola en forma de glucógeno en el estado post-prandial. El primer paso en el metabolismo de la glucosa en el hígado es su fosforilación por la Glucoquinasa (GK), descubierta por Sols. Esta enzima está sometida a inhibición por la Proteína reguladora de la glucoquinasa (GKRP). La glucogeno sintasa (GS), descubierta por Leloir, cataliza la reacción clave en la síntesis del polisacárido. La actividad de la GS está altamente regulada por fosforilación en múltiples centros. Sólo las formas desfosforiladas son activas "in vivo". A fin de estudiar el mecanismo mediante el cual la glucosa estimula la síntesis de glucógeno hepático hemos utilizado adenovirus recombinantes para sobreexpresar las proteínas de interés. En hepatocitos en cultivo, la sobreexpresión de la GK, pero no de la Hexoquinasa I, estimula la síntesis de glucógeno. Por el contrario, el aumento en los niveles de la GKRP tiene un efecto negativo. La sobreexpresión de la GS también causa un incremento en la acumulación del polisacárido. La sobreexpresión conjunta GS+GK produce un efecto aditivo. En hepatocitos de rata diabética en los que la síntesis de glucógeno está muy disminuida, la restauración de la actividad GK es suficiente para normalizar este proceso. En células de hepatoma FTO-2B que carecen de GK, la glucosa es incapaz de inducir la síntesis de glucógeno, aunque se sobreexprese la GS. Sin embargo, la introducción de GK permite que se sintetice glucógeno. Podemos concluir que la glucosa sólo activa a la GS en presencia de GK y que la producción de glucógeno hepático a partir de glucosa está sometida a un sistema de control compartido en el cual, el controlador, la GS, es a su vez controlado por la GK. Este control se ejerce de forma indirecta a través de la glucosa-6-fosfato, la cual promueve la desfosforilación, y por ello, la activación de la GS.

LA INTERACCION DE *SALMONELLA* CON SU CELULA

HUESPED. Jorge E. Galán. Section of Microbial Pathogenesis, Boyer Center for Molecular Medicine, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06536, U. S. A.

La interacción de *Salmonella* con su célula huésped puede considerarse una verdadero "diálogo bioquímico". Esta interacción conduce en *Salmonella* a la activación de un sistema de secreción de tipo III cuya función determina la secreción y translocación de moléculas efectoras bacterianas en la célula hospedadora. Estas moléculas efectoras causan en el interior de la célula una reorganización dramática del citoesqueleto de actina que se manifiesta en micropinocitosis y la formación de protusiones de la membrana que conducen a la internalización de la bacteria. Estas modificaciones requieren la participación de CDC42 y Rac, proteínas que se unen a GTP y a través de moléculas efectoras, determinan la reorganización del citoesqueleto de actina. Una de las moléculas efectoras translocadas por *Salmonella*, SopE, actúa como un factor de intercambio ("exchange factor") que activa las GTPasas CDC42 y Rac. Entre los efectores de *Salmonella* además se encuentran una fosfatasa de inositol fosfato (SopB) y una proteína que se une a actina (SipA). SopB determina la activación de un sistema de transducción de señales que provoca respuestas celulares dependientes de CDC42. SipA modula la entrada de bacterias mediante la restricción espacial de los cambios del citoesqueleto de actina como resultado de la infección por *Salmonella*. El mecanismo de acción de SipA se basa en su capacidad para disminuir la "concentración crítica" de actina, estabilizar los filamentos de actina y estimular la actividad de Fimbrin, otra proteína que influye la estructura de los filamentos de actina. Así, la función estabilizadora de SipA determina que las protusiones de la membrana sean más rígidas y que se proyecten más hacia el exterior, todo lo cual conduce en definitiva a la facilitación de la entrada bacteriana en la célula. Las respuestas celulares provocadas por *Salmonella* son de duración limitada ya que poco después de la infección la morfología celular recobra la normalidad. Esta rápida recuperación requiere la participación de SptP, otro efector translocado por el sistema de secreción de tipo III de *Salmonella*. SptP, por medio de su acción activadora de la función GTPasa (GAP) de CDC42 y Rac consigue la terminación de las respuestas celulares iniciadas por la propia *Salmonella*. De esta manera, *S. typhimurium* es capaz de modular el citoesqueleto de actina a través de una activación e inactivación alternada de CDC42 y Rac influenciando diferentes estados en la formación de protusiones de membrana. La manera en que *Salmonella* interactúa con su célula huésped constituye un extraordinario ejemplo de como la evolución conjunta facilita la modulación de las funciones celulares por parte del patógeno para alcanzar una interacción balanceada.

Conferencia EMBO

THE PRODUCT OF THE ADENOVIRUS GENE IX: A MULTIFUNCTIONAL PROTEIN. Kedinger C., Rosa-Calatrava M., Grave L.*, Puvion-Dutilleul L.F**, Cotten M.*** and Chatton B. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, Strasbourg, France. * Transgene S. A., Strasbourg, France. ** Laboratoire Organisation Fonctionnelle du Noyau, Villejuif, France. *** Institute of Molecular Pathology, Vienna, Austria.

We have investigated the functional properties of the product of the adenovirus (Ad) gene IX. This gene, which is expressed at intermediate times post-infection, encodes a small polypeptide (pIX, 140 residues) that has previously been shown to participate to the assembly of the viral capsid.

We demonstrate that pIX, in addition to its structural contribution, exhibits transcriptional properties. In transfection experiments expression of pIX stimulates about 10 fold the activity of several viral and cellular TATA-containing (but not TATA-less) promoters. Our results strongly suggest that pIX participates to the initiation of the Ad transcription program.

Furthermore, we show that pIX takes actively part in the viral-induced reorganisation of late-infected cell nuclei: through self-assembly, the protein induces the formation of specific nuclear structures which appear as spherical globules by immunofluorescence staining and as clear amorphous inclusions (c.i.) by electron microscopy. The potential involvement of these structures in infected-cell survival will be discussed.

By extensive mutagenesis, we delineated the functional domains involved in each of the pIX properties: residues 22 to 26 of the highly conserved N-terminal domain are crucial for capsid incorporation of the protein; the C-terminal leucine-repeat is responsible for pIX interactions with itself and possibly other proteins, a property essential for transcriptional activity and formation of the c.i. structures.

It clearly appears that pIX is a multifunctional polypeptide, involved in viral capsid stability, transcriptional activation and cell viability. Together, our results indicate that pIX expression may have important practical implications that should clearly be taken into consideration while constructing adenovirus-based expression vectors designed for gene therapy approaches.

Symposios

ESTRUCTURA Y FUNCION DE PROTEINAS

Coordinadores:

Mirta Biscoglio y Miguel Angel de la Rosa

CYTOCHROME c_6 AND PLASTOCYANIN: HOW TWO STRUCTURES SO MUCH DIFFERENT CAN PLAY THE SAME PHYSIOLOGICAL ROLE. M.A. De la Rosa, M. Hervás, J.A. Navarro, A. Díaz-Quintana, B. De la Cerda, F.P. Molina-Heredia, A. Balme and S. Murdoch. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y CSIC, Américo Vespucio s/n, 41092-Sevilla, Spain

Plastocyanin (Pc), a small single copper protein, and cytochrome c_6 (Cyt), a monoheme protein, function as alternative mobile electron carriers between the two membrane complexes cytochromes b_6f and photosystem I (PSI). The two proteins are now well characterized, both at the structural and functional levels. In Pc, which was first investigated, two active sites were identified: site 1 (or the so-called north hydrophobic pole), located in a flat region around the copper ligand His87, and site 2 (or the so-called east face), which includes charged residues surrounding the solvent exposed Tyr83. Site 2 is responsible for the electrostatic interactions with cytochrome f and PSI, whereas site 1 is involved in electron transfer itself. We have recently reported that Cyt possesses two areas equivalent to those of Pc: site 1, that is a hydrophobic region at the edge of the heme pocket providing the contact surface for electron transfer, and site 2, that is a charged patch driving the electrostatic movement towards its two membrane partners. In this lecture, special attention will be paid to the evolutionary aspects. The proposal will be made that Cyt was first "discovered" by Nature, when Fe was much more abundant than Cu because of the reducing properties of the primitive atmosphere, and further replaced by Pc, when Cu became available as long as photosynthesis started to yield molecular oxygen at high concentration.

RECEPTOR NICOTINICO A ACETILCOLINA. CONTRIBUCION AL DELINEAMIENTO DE SITIOS DE UNION DE LIGANDOS (Nicotinic acetylcholine receptor. A contribution towards delineating ligand binding sites). Biscoglio, M.J. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

El receptor nicotínico a acetilcolina es el prototipo de la superfamilia de canales iónicos gatillados por ligandos. La dificultad en obtener una estructura 3-D con alta resolución condujo al uso de distintas aproximaciones experimentales tendientes a analizar la relación entre su estructura y su función. Nuestro laboratorio encaró el estudio de sitios de unión de ligandos, particularmente el de α -Bungarotoxina (α -BgTx) - parcialmente superpuesto con el del ligando natural - con especial énfasis en la investigación del rol que los residuos de histidina juegan tanto en la unión de la toxina como en el flujo iónico. Se utilizaron sistemas con grado decreciente de complejidad: 1) el receptor inserto en membranas nativas; 2) el receptor purificado e incorporado a liposomas; 3) cultivos de células BC3H1 (patch-clamp); 4) subunidades aisladas; 5) fragmentos proteolíticos de la subunidad α ; 6) péptidos sintetizados según la secuencia de los receptores de *Torpedo californica* y *Homo sapiens*.

El conjunto de los resultados permite afirmar la participación de residuos de histidina tanto en el sitio de unión de α -BgTx como en la traslocación de cationes. Los primeros serían miembros de una familia de histidinas de baja reactividad mientras que los segundos pertenecerían a la familia más reactiva.

LA SUBUNIDAD BETA DEL CANAL DE K^+ ACTIVADO POR Ca^{2+} COMO RECEPTOR DE ESTROGENOS. (The β subunit of the Ca^{2+} -activated K^+ channel as an estrogen receptor). Latorre, Ramón. Centro de Estudios Científicos, Avenida Arturo Prat 514, Valdivia Chile.

Los canales de calcio y los de potasio activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) son los encargados de gobernar la actividad eléctrica de los músculos lisos vasculares. El canal K_{Ca} está formado por dos subunidades: la subunidad α que da origen al sistema de conducción de iones potasio y subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 4$) que modulan su actividad. Las subunidades β se expresan de manera diferencial en diferentes tejidos. La subunidad $\beta 1$ del canal K_{Ca} está formada por una proteína que contiene dos segmentos transmembranales unidos por un lazo externo compuesto de 116 aminoácidos. Nuestro grupo encontró que la subunidad $\beta 1$ pero no la $\beta 2$ de los canales K_{Ca} es un requerimiento absoluto para la activación del canal por 17β -estradiol. Este hallazgo sugiere que el mecanismo molecular no genómico involucrado en la modulación de los canales K_{Ca} por 17β -estradiol involucra la participación de un sitio de unión localizado en la subunidad β que modula la actividad de los canales K_{Ca} . A través de mutaciones puntuales y modelado molecular hemos concluido que el sitio que une estrógenos forma parte del lazo externo de la subunidad β .

Financiado por proyectos FNI 1000890, Cátedra Presidencial y Human Frontier in Science Program

CHARACTERIZATION OF PROTEIN STRUCTURE USING ELECTRO-PHORETIC MICROPREPARATIVE TECHNIQUES AND MASS SPECTROMETRY. Ulf Hellman, Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-751 24 Uppsala, Sweden.

The genomic era is soon coming to an end, *i. e.* the complete genomic structure from several species, among them that of man, is fully characterized. The research community need not any more spend tedious work on determining protein primary structures via cDNA cloning or Edman degradation. However, a huge quantity of work remains in studying posttranslational modifications, structure function relationships etc. Luckily, recently developed high sensitivity techniques allow proteins to be studied with respect to identity, structure and function.

The two most important tools are electrophoretic separation, especially two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Applying efficient prefractionation of a crude sample *i. e.* a total cell extract, one can expect to obtain homogeneous protein spots after a 2D-run, and occasionally after SDS-PAGE. Proteins are then proteolytically digested *in situ* and after MALDI-TOF-MS analysis of the unseparated digest, their identity determined by comparing the resulting peptide mass fingerprint with that from a sequence database. Further structure information, such as direct sequencing and analysis of modifications (phosphorylation, sulphatation, carbohydrates etc.) are generated by analysing individual peptides by ESI-MS.

This talk will touch upon several aspects of the above.

DAÑO OXIDATIVO: EXPRESION GENICA Y ANTIOXIDANTES

Coordinadores:

Federico Leighton y José Viña

EFFECTO DE LAS DIETAS VEGETARIANA, MEDITERRANEA, OCCIDENTAL, Y DEL CONSUMO MODERADO DE VINO, SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO AL ADN (Effect of diets, vegetarian, mediterranean, occidental, and moderate wine consumption, on oxidative DNA damage) Leighton F., Foncea R., Espinoza M., Strobel P., Pérez D.D., Castillo O., Rozowski J. Lab.Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile fleight@genes.bio.puc.cl

La dieta provee antioxidantes y nutrientes que *per se* favorecen el daño oxidativo. El predominio relativo de factores prooxidantes se denomina estrés oxidativo. Esta condición se caracteriza por aumento de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno y por aumento de productos o cambios bioquímicos propios de la oxidación. Se ha observado cambios en proteínas (carbonilos, nitración de tirosina, metionina sulfoxido); cambios en lípidos (dienos conjugados, lipoperoxidos, TBARS, hidroxinonenal y similares); cambios en carbohidratos (productos de glicación avanzada); y cambios en ADN (daño oxidativo de bases, como la generación de 8-oxo-2'-deoxiguanosina (oxo8dG)). En esta comunicación se revisan nuestras mediciones de oxo8dG en leucocitos de vegetarianos y controles omnívoros y en voluntarios que recibieron dieta mediterránea, dieta occidental (40% de calorías de grasas, rica en grasas poliinsaturadas o en grasas monoinsaturadas) y suplementación con vino blanco, vino tinto, o frutas y verduras. Los niveles de oxo8dG fluctuaron entre 4 y 18 x 10⁵ guaninas. Los resultados muestran que la dieta grasa es prooxidante, que el vino blanco protege levemente, y que frutas, verduras y vino tinto protegen marcadamente del daño oxidativo al ADN. (Financiado por PUC-PBMEC1997-2000)

DAÑO OXIDATIVO AL ADN: OCURRENCIA IN VIVO Y PROTECCION POR ANTIOXIDANTES (Oxidative damage to DNA: in vivo occurrence and protection by antioxidants). Fraga, C. G., Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Los organismos aeróbicos están expuestos a múltiples carcinógenos, tanto de origen exógeno como endógeno. Entre estos últimos, especies derivadas del metabolismo del oxígeno (ERO), reaccionan in vivo con el ADN, generando un estado estacionario de ADN modificado. Estos cambios en el ADN, son un importante contribuyente al riesgo de cáncer. El daño oxidativo sobre el ADN (nuclear y mitocondrial), puede ser causa de cambios estructurales, origen de mutaciones, alteraciones en los pasos de transducción de señales, y/o en la regulación de genes. Una de las bases modificadas del ADN más representativa del daño por ERO, es la 8-oxo-2'-deoxiguanosina (oxo8dG). La concentración en el estado estacionario de oxo8dG está en el orden de una bases oxidada cada 10⁵ dG en células de eucariotes. Estudios de nuestro grupo, han demostrado relaciones entre la presencia de oxo8dG, parámetros de estrés oxidativo, antioxidantes y funcionamiento celular en testículos y espermatozoides de rata. También, estudios en humanos confirmaron la existencia de un incremento de daño oxidativo al ADN que estaba modulado por la presencia de antioxidantes. A partir de los resultados obtenidos se pudo confirmar la existencia de daño oxidativo al ADN, que se modifica en función de la edad, la presencia de metales (con y sin capacidad redox) y de vitaminas y polifenoles de origen vegetal. Trabajo financiado con subsidios de UBA (TB30) y CONICET (PIP 0738/98).

DAÑOS EN EL ADN Y FOTSENSIBILIZACION. (DNA damage: some aspects of the photosensitization). Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M. H. G. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil. Fax: ++ 55 11 8155579. E-mail: pdmascio@iq.usp.br. Financial supports: FAPESP, CNPq and PRONEX

The effects of solar radiation on cellular DNA may be rationalized in terms of direct excitation process and indirect photooxidation reactions. The bulk of the damage within cellular DNA resulting from the photoexcitation of endogenous photosensitizers (porphyrins, flavins, etc...) have not been yet characterized. A photosensitizer reacts usually in a triplet state according to two main processes including type I (electron transfer or hydrogen abstraction involving DNA) and Type II (energy transfer with oxygen) mechanisms.

(O₂⁻, Sen⁺, ...) **Type I** $\leftarrow \text{Sen} + h\nu \Rightarrow \text{Type II}$ (O₂, ¹Δ_g)
The type I mechanism is almost specific of guanine which exhibits the lowest ionization potential among DNA components. Singlet oxygen (O₂, ¹Δ_g), generated in the type II mechanism reacts exclusively with guanine, giving rise to of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as the main oxidation product in native DNA. The availability of a water soluble naphthalene endoperoxide acting as a chemical source of [¹⁸O] isotopically labeled singlet oxygen (¹⁸[¹O₂]) is of particular interest to study reactions of the latter reactive oxygen species in biological media. Extensively conjugated biomolecules such as carotenoids act largely on physical quenching of O₂ (¹Δ_g) and much lesser extent on chemical reaction. Insights in the mechanisms of DNA damage were gained from the measurement of targeted lesions using accurate and highly sensitive assays including HPLC with either electrochemical or tandem mass spectrometry detection.

DAÑO OXIDATIVO AL DNA MITOCONDRIAL EN EL ENVEJECIMIENTO Y LA APOPTOSIS. IMPORTANCIA PARA EXPLICAR LA DIFERENTE LONGEVIDAD ENTRE MACHOS Y HEMBRAS. (Mitochondrial DNA damage in aging and apoptosis). J Viña, FV Pallardó, J Sastre. Dpto. Fisiología, Universidad de Valencia, España.

Las mitocondrias están implicadas en el envejecimiento. Los niveles de 8 hidroxí-2'-deoxiguanosina (oxodG) se incrementan en el DNA mitocondrial (mtDNA) en el envejecimiento normal. Existe una relación directa entre la oxidación de la glutatión y el daño oxidativo al mtDNA y una relación inversa entre el daño oxidativo al mtDNA asociado con el envejecimiento y la coordinación motora de ratones viejos.

El estrés oxidativo también ocurre en la apoptosis. Observamos que el envejecimiento y la apoptosis tienen mecanismos en común. El mtDNA se oxida en la apoptosis tanto en los fibroblastos como en la glándula mamaria de la rata lactante. Al igual que en el envejecimiento, en la apoptosis existe una relación entre la oxidación de la glutatión y el daño oxidativo al mtDNA.

La importancia de la producción de radicales libres en el envejecimiento tiene consecuencias prácticas de gran interés. Por ejemplo, permite explicar la diferente longevidad entre machos y hembras. En todos los casos, la hembra produce aproximadamente la mitad de los peróxidos que produce el macho. Las diferencias entre machos y hembras desaparecen con la ovariectomía y reaparecen con el tratamiento con estrógenos.

APROXIMACIONES SISTEMICAS AL ESTUDIO DE LA REGULACION DE VIAS METABOLICAS

Coordinador Tito Ureta

CASCADAS DE ENZIMAS INTERCONVERTIBLES Y SU CONTRIBUCION A LA HOMEOSTASIS. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE CICLOS MÚLTIPLES. Cárdenas, M.L. BIP, Institut de Biologie Structurale et Microbiologie, CNRS, 31 Ch. Joseph-Aiguier, 13402, Marseille Cedex 20, France. email: cardenas@ibsm.cnrs-mrs.fr

Las cascadas de enzimas interconvertibles constituyen un elemento importante en el proceso de transducción de señales y la comprensión de su potencialidad es clave en proyectos de ingeniería metabólica. Con frecuencia existen varios ciclos y participan en la regulación de vías metabólicas y procesos celulares. En una cascada la enzima (o proteína) blanco existe en dos formas que difieren en grado de actividad y que pueden interconvertirse bajo la acción de enzimas modificadoras reguladas por efectores. Estudios nuestros y de otros grupos sugieren que este tipo de sistema permite la amplificación y la radiación de una señal y una respuesta coordinada frente a señales múltiples (especialmente si hay varios ciclos) y de alta sensibilidad. No obstante, aunque la amplificación de la señal es un concepto muy asociado a una cascada, puede "in vivo" ser menos importante de lo esperado dado que en muchos casos los componentes enzimáticos de una cascada están organizados estructuralmente. La potencialidad de responder con una gran sensibilidad a una señal convierte las cascadas en interruptores metabólicos eficaces, que permiten interrumpir o poner en ruta vías metabólicas en respuesta a pequeñas variaciones en concentración de efectores. Esta potencialidad contribuye fuertemente a la homeostasis y es especialmente importante en casos de moléculas que no solo actúan como señales sino que además son intermediarios metabólicos. Así, la sensibilidad de mecanismos de retroinhibición (Feedback) aumenta grandemente si es ejercida a través de una cascada.

CONTROL Y REGULACION ENZIMATICAS EN MEDIOS (SUPRA)MOLECULARMENTE ORGANIZADOS O SUPERPOBLADOS (Enzyme control and regulation in (supra)molecularly organized or crowded environments). Aon, M.A. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH/CONICET), C.C. 164, 7130-Chascomús, Buenos Aires, Argentina. E-mail: maaon@criba.edu.ar

Actualmente, dos son las ideas principales acerca de la organización del metabolismo a nivel intracelular. Una de ellas afirma que dicha organización se realizaría a través de la asociación entre enzimas constituyendo complejos estables o transitorios. La otra sostiene que el soporte organizativo estaría dado por las proteínas del citoesqueleto y su estado polimérico. Si bien estas dos visiones de la organización y funcionalidad del metabolismo celular no son mutuamente excluyentes, mantienen diferencias entre sí. Hemos observado que el incremento de flujos metabólicos citoesqueleto-dependiente es afectado por varios factores relevantes a nivel de la fisiología celular: (i) la concentración y tipo de proteína del citoesqueleto; (ii) de su estado polimérico; y (iii) la presencia de proteínas asociadas. Por otro lado, el superpoblamiento molecular muestra, potencialmente, la capacidad de inducir comportamiento ultrasensible a nivel enzimático, condiciones en las cuales las enzimas pueden funcionar proporcionando efectos umbrales. El acoplamiento de la dinámica del citoesqueleto de tubulina a la vía glicolítica y las ramificaciones hacia la vía de las pentosas, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la fermentación etanólica, permite visualizar, por primera vez, efectos de modulación global del flujo glicolítico por el grado de polimerización de la tubulina. Los resultados presentados muestran que la reorganización del citoesqueleto puede ejercer efectos globales sobre la bioquímica celular.

APLICACION DE LA TEORIA DEL CONTROL METABOLICO AL DISEÑO DE NUEVAS ESTRATEGIAS ANTITUMORALES. (Application of metabolic control analysis to design of new antitumoural strategies). Cascante, M.¹, Comín, B.¹, Boren, J.¹, Centelles, J.J.¹, Lee, W.-N. P.², and Laszlo G. Boros². ¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Martí i Franques, 1 Barcelona 08028, Spain. ²Harbor-UCLA Research and Education Institute, UCLA School of Medicine, 1124 West Carson street RB1, Torrance, CA 90502, USA

Las células tumorales presentan un metabolismo alterado respecto a las normales, que destaca por una activa síntesis de ácidos nucleicos. Por ello, la quimioterapia se enfoca a la inhibición de la síntesis de las bases púricas y pirimidínicas. Sin embargo, no se considera la inhibición de la síntesis de la ribosa-5-fosfato. Esta molécula se obtiene a través de la vía de las pentosas-fosfato. La Teoría del Control Metabólico identifica la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) y la transcetolasa (TK) como los enzimas clave de esta vía. Es previsible que los inhibidores específicos de estas enzimas diana (tales como la deshidroepiandrosterona, para G6PDH y la oxitiamina, para TK) puedan disminuir la síntesis de ácidos nucleicos y la proliferación celular en células tumorales. En este estudio observamos una inhibición del 80% en células de tumor ascítico de Ehrlich inyectadas en ratones (*in vivo*); y un 60% en células pancreáticas MiaPaCa2 (*in vitro*), cuando se administraron conjuntamente los dos inhibidores. Por el contrario, una suplementación excesiva con tiamina (el cofactor de la transcetolasa) activa dicha enzima y puede actuar como un promotor tumoral en pacientes con cáncer, interfiriendo con la quimioterapia.

ORGANIZACION DE VIAS METABOLICAS CITOPLASMICAS EN LA CELULA INTACTA: SINTESIS DE GLICOGENO EN OOCITOS DE RANA (Organization of cytoplasmic metabolic pathways in the intact cell: glycogen biosynthesis in frog oocytes). Preller, A. Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Email: apreller@abello.dic.uchile.cl

El modelo tradicional de metabolismo intermediario supone redes de reacciones que ocurren en el citoplasma por difusión y colisión azarosa entre enzimas y sus sustratos. Paulatinamente se ha reemplazado por una nueva visión que concibe un citoplasma finamente estructurado en el cual las vías metabólicas, consideradas clásicamente solubles, estarían organizadas en sitios celulares discretos. La mayoría de la información proviene sin embargo de experimentos *in vitro*. Hemos abordado el estudio *in vivo* de la organización y regulación de la biosíntesis de glicógeno en oocitos de anfibio, un excelente sistema experimental para este tipo de enfoque. En oocitos no perturbados, el glicógeno se localiza de preferencia en la región del córtex y en la zona perinuclear. Experimentos de síntesis *de novo* por microinyección de glucosa tritiada muestran gránulos de glicógeno en la periferia del núcleo y en el citoplasma, pero no en la zona cortical. Dependiendo de la concentración intracelular de glucosa disponible, la incorporación de ésta en glicógeno ocurre tanto por la vía directa como por la indirecta. Existen al menos dos conjuntos discretos e inmisicibles de glucosa-6-P, uno destinado a la vía directa y otro que sólo está disponible para la ruta indirecta. En oocitos preincubados con citochalasina B, la síntesis del polisacárido disminuye significativamente. Los resultados sugieren que la biosíntesis de glicógeno ocurre en sitios celulares discretos, que no necesariamente coinciden con los de depósito, implica fenómenos de microcompartimentación de intermediarios y requiere además la integridad de los filamentos de actina. Fondecyt, proyecto 1970283

MECANISMOS MOLECULARES DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Coordinador Sergio Lavandero

MECANISMOS DE APOPTOSIS DEPENDIENTES DE OXIDO NITRICO Lisardo Bosca. Instituto de Bioquímica. Centro Mixto (CSIC-UCM). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

Los mecanismos que regulan la homeostasis tisular mantienen un equilibrio preciso entre las tasas de división celular y la retirada de células por apoptosis, especialmente en el organismo adulto. Es más, la falta de una adecuada eliminación del excedente de células permite la acumulación de errores genéticos que acaban favoreciendo la instalación de procesos cancerosos. Los efectos anti-apoptóticos de los prostanooides en la etiología del cáncer colorectal, así como la sobreexpresión de Bcl-2 en células B en varios tipos de leucemia linfática constituyen dos buenos ejemplos de esta situación. Una parte importante de esta acción se lleva a cabo mediante la eliminación de las células inflamatorias que han participado en la defensa del huésped frente a diversos tipos de patógenos o de células alteradas (p. ej. células tumorales). Entre estas últimas, los macrófagos participan activamente liberando moléculas reactivas de oxígeno y de nitrógeno que inducen apoptosis en una gran variedad de tipos celulares.

El tratamiento de macrófagos con altas concentraciones de generadores de óxido nítrico (NO) provoca apoptosis. Esta apoptosis está acompañada de un rápido y persistente incremento del potencial de membrana mitocondrial, un potencial que generalmente disminuye en las células que sufren apoptosis a través de mediadores liberados por la mitocondria. En macrófagos tratados con NO, la liberación del citocromo C de la mitocondria al citosol precede al aumento del potencial mitocondrial, existiendo cambios en las proteínas, probablemente a través de la formación de residuos de nitrotirosina. La relevancia fisiopatológica de estos procesos será analizada en detalle.

RETICULO ENDOPLASMICO: ROL DURANTE EL PROCESO DE APOPTOSIS. (Endoplasmic reticulum is involved during rat thymocyte induced apoptosis). Bustamante, J., Bersier, G., Aron Badin R., Parodi, A., y Boveris A. Laboratorio Nacional De Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina. Subsidio IB-01, Universidad de Buenos Aires.

El proceso de apoptosis es un mecanismo esencial durante el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis celular. Alteraciones en el programa de muerte contribuyen a la aparición de enfermedades. Diferentes señales inducen una respuesta al estrés por parte del retículo endoplásmico, incluyendo, vaciamiento del contenido de calcio y/o acumulación de proteínas mal plegadas. Los resultados muestran que sistemas enzimáticos en esta organela presentan alteraciones durante la apoptosis, inducida por methyl-prednisolone, etoposide y taspigargina. Observamos, producción de NO por el retículo endoplásmico, identificándose el tipo de NOS involucrada. Mediciones de la actividad de la glucosil transferasa, enzima involucrada en el control de calidad del plegamiento de glicoproteínas, mostraron un claro aumento en presencia de taspigargina, no hubo variación en células tratadas con etoposide y metilprednisolona. La actividad de la citocromo P450 reductasa, perteneciente al sistema microsomal de transporte de electrones, mostró una inhibición durante la apoptosis inducida por los tres agentes utilizados. Los cambios anteriores mostraron una estrecha relación con la actividad de distintos componentes de la cascada proteolítica: (caspasas: 3, 6 y 8), así como con los niveles de lipoperoxidación intracelular. Concluimos que el retículo endoplásmico no es pasivo frente al proceso de apoptosis. Se discutirán los resultados y sus implicaciones.

TRANSDUCCION DE SEÑALES EN LA INDUCCION Y PREVENCIÓN DE LA APOPTOSIS EN EL CARDIOMIOCITO. (Signaling pathways during the induction and prevention of cardiomyocyte apoptosis). Lavandero S. Gálvez A, Eltit JM, Ocaranza P, Morales MP, Carrasco L, Ulloa JA, Campos X, Díaz-Araya G. Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El cardiomiocito es una célula terminalmente diferenciada que deja de proliferar casi inmediatamente después del nacimiento pero que ha retenido la capacidad de experimentar apoptosis en respuesta tanto a estímulos físicos como químicos. Se ha detectado un proceso apoptótico exacerbado en los cardiomiocitos durante el desarrollo de varias patologías cardíacas tales como el infarto al miocardio y la insuficiencia cardíaca. Por ello existe gran interés en precisar los mecanismos moleculares por los cuales se inicia, ejecuta o previene la apoptosis de las células cardíacas debido a que las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Diversos laboratorios, incluido el nuestro, han estado investigando *in vivo* e *in vitro*, los mecanismos moleculares por los cuales se activa o previene la apoptosis. Hemos demostrado que el estrés osmótico, presente en cuadros isquémicos severos, activa una potente y rápida respuesta apoptótica en el cardiomiocito en comparación a otros estímulos. Esta respuesta no requiere de la participación de p53 a diferencia de la apoptosis inducida por angiotensina II. La activación o coactivación de diversas proteínas kinasas activadas por estrés (JNK y p38-MAPK) parece ser un evento central en la transducción de la apoptosis en el cardiomiocito. La respuesta apoptótica del cardiomiocito, antagónica a la respuesta compensatoria de hipertrofia, es atenuada por el factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-1), un péptido producido localmente en el corazón. La unión del IGF-1 a su receptor para IGF-1 activa múltiples vías transduccionales, entre las que se cuentan las proteínas activadas extracelularmente (ERK-MAPKs), JAKs/STATs, proteínas kinasas C (PKC), fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y proteína kinasa B (PKB). A través de inhibidores químicos selectivos y genes dominantes negativos hemos establecido que las proteínas kinasas ERK, PI3K y PKB son importantes vías transduccionales por las cuales el IGF-1 atenúa la apoptosis en el cardiomiocito. Estos hallazgos y sus proyecciones se discutirán en esta presentación.

FONDECYT 1980908

BIOMEDICINA

Coordinadores:

Pilar Carvallo y Vicente Rubio

HIPERALDOSTERONISMO PRIMARIO EN HIPERTENSOS ESENCIALES: CARACTERIZACION CLINICO-MOLECULAR (Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: Clinical and molecular characterization). Fardella C, Mosso L, Montero J. Departamento de Endocrinología y Medicina Interna. Facultad de medicina. P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile

El hiperaldosteronismo primario (HAP) puede inducir la aparición de hipertensión arterial a través de un aumento de la reabsorción de sodio y agua a nivel renal. Una forma heredada de HAP es el remediable por glucocorticoides (GRA) que se genera por el crossing over desigual entre los genes CYP11B1 (encargado de la síntesis de cortisol) y CYP11B2 (encargado de la síntesis de aldosterona) resultando un gen quimérico el cual tiene actividad aldosterona sintetasa pero es regulado por ACTH. El objetivo de este estudio fue evaluar la prevalencia del HAP y de GRA en 305 hipertensos esenciales y 205 controles normotensos. En todos los pacientes se midió aldosterona plasmática (AP) actividad de renina plasmática (ARP) y la relación AP/ARP. El diagnóstico de HAP se realizó en presencia de AP elevada (>16 ng/dl), supresión de ARP (<0.5 ng/ml/hr) y una relación AP/ARP elevada (>50). Se diagnosticó un HAP probable cuando la relación AP/ARP fue >25 pero los otros criterios no estuvieron presentes. Un test de fludrocortisona fue realizado para confirmar el diagnóstico. GRA fue diferenciado de otras formas de HAP por: el test de supresión de aldosterona con dexametasona, la elevación del 18-hidroxycortisol plasmático y por la detección del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2. Se detectó un HAP en 29/305 (9.5%) hipertensos esenciales estudiados, de los cuales 16 fueron inicialmente diagnosticados como HAP probable y confirmados por el test de fludrocortisona. El test de supresión con dexametasona fue positivo para GRA en 10/29 pacientes y los niveles de 18-hidroxycortisol fueron elevados en 2/29 pacientes. La presencia del gen quimérico CYP11B1/CYP11B2 fue demostrada en 2/29 HAP que correspondía a los sujetos con 18-hidroxycortisol elevado. En normotensos detectamos un HAP en 3/205 sujetos (1.46%) y uno de ellos tenía un GRA. En resumen, nosotros encontramos una alta frecuencia de HAP en hipertensos catalogados como esenciales. Una alta proporción de ellos suprimía con dexametasona, pero solo unos pocos tenían un gen quimérico o niveles elevados de 18-hidroxycortisol. (Fondecyt 198999)

TRANSPORTADORES ABC EN EL DOMINIO CANALICULAR DEL HEPATOCITO: PAPEL FUNCIONAL Y PATOLOGICO EN ENFERMEDADES HEPATOBILIARES. (ABC transporters in the canalicular domain of hepatocytes. Functional and pathological role in hepatobiliary diseases) J. Chianale, V. Vollrath, AM. Wielandt. Dpto Gastroenterología, Universidad Católica de Chile.

El descubrimiento de proteínas de la familia de transportadores ABC en el dominio canalicular del hepatocito ha permitido conocer mejor las bases biológicas del transporte de endo y xenobióticos y las bases moleculares de diversas enfermedades hepatobiliares. El gen MDR3 codifica a la P-gp, la que participa en la secreción de fosfolípidos desde el hepatocito a la bilis. Mutaciones de este gen son responsables de la Colestasia Intrahepática Familiar Progresiva Tipo I, caracterizada por la ausencia de la secreción de fosfolípidos biliares y una colangitis crónica. La bomba exportadora de ácidos biliares (BSEP) es responsable de la secreción de ácidos biliares a la bilis. Mutaciones de este gen dan origen a la Colestasia Intrahepática Familiar Progresiva Tipo II. El gen cMOAT codifica a una proteína que participa en el transporte activo de aniones orgánicos conjugados con glutatión (GSH). En humanos, mutaciones del gen cMOAT dan origen a una proteína no funcional responsable del Síndrome de Dubin-Johnson, que se caracteriza por la incapacidad de excretar aniones orgánicos a la bilis y a un aumento sostenido en el plasma de bilirrubina, uno de los sustratos endógenos de cMOAT. Estos genes son modulados en su expresión en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Recientemente hemos demostrado en ratones, que el gen cMOAT es modulado en su expresión a nivel transcripcional en el hepatocito en respuesta a la administración de diversos xenobióticos. Estos agentes inducen además transcripcionalmente el gen que codifica a la enzima limitante de la síntesis de GSH (GCS-HS). En estos modelos, el aumento de la expresión de cMOAT se asocia a un incremento en la excreción biliar de GSH, sugiriendo que cMOAT es uno de los transportadores activos de GSH. Nuestras observaciones sugieren que existe una regulación coordinada de la expresión de genes involucrados en los procesos de detoxificación celular como una respuesta adaptativa del hepatocito a la exposición de xenobióticos. (FONDECYT 1990510)

TRANSFERENCIA DE GENES TERAPEUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

Gabriel Rabinovich Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Fac. Medicina. UBA. Buenos Aires. TE: 0054-11-4508-3974. E-mail: gabyrabi@ciudad.com.ar

Durante la última década se han ensayado diversos protocolos de terapia génica para el tratamiento de desórdenes autoinmunes, tales como la artritis reumatoidea (AR). Las principales estrategias de terapia génica en AR tienen como objetivo: a) inhibir la activación de células sinoviales, b) suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, c) inhibir factores de transcripción involucrados en el proceso inflamatorio, d) inhibir la osteoclastogénesis e) bloquear la actividad de metaloproteinasas, f) desviar la respuesta autoinmune hacia un patrón Th 2, g) inhibir señales de traducción intracelular en sinoviocitos activados y h) inducir apoptosis de sinoviocitos o células T infiltrantes. Utilizando una estrategia de terapia génica recientemente demostramos, que galectina-1 (Gal-1), una proteína que une azúcares β -galactósidos, es capaz de suprimir la patología inflamatoria, en un modelo experimental de AR a través de la inducción de apoptosis de células T activadas. Esta proteína logró suprimir las manifestaciones histopatológicas e inmunológicas de la enfermedad. Se demostró que Gal-1 modula la susceptibilidad a la apoptosis de linfocitos T activados y timocitos inmaduros a través de su interacción con el receptor CD45RO. Observamos además que Gal-1 en concentraciones fisiológicas es capaz de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la adhesión de células T a la matriz extracelular. En un intento de extrapolar estos resultados a la AR humana pudimos observar finalmente una disminución marcada de los niveles de Gal-1 en sinovia de pacientes con artritis reumatoidea juvenil. El descubrimiento de nuevos mecanismos inmunopatogénicos permitirán diseñar nuevas estrategias para la transferencia de genes con fines terapéuticos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes

EL DEFICIT CONGENITO DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC): MUTACIONES CLINICAS Y CONSECUENCIAS FUNCIONALES SOBRE EL ENZIMA.

Consuelo Climent, Miguel A. García-Pérez y Vicente Rubio. Instituto de Biomedicina de Valencia (CSIC). C/ Jaime Roig 11. Valencia-46010. España.

Se analizará el patrón de mutaciones encontradas en el gen de la OTC en los pacientes con déficit de OTC analizados por el laboratorio (49, la mayoría de los pacientes españoles y algunos extranjeros) desde la perspectiva del diagnóstico y de las manifestaciones clínicas y bioquímicas en el paciente, y se buscará el establecimiento de correlaciones de estructura-función usando como guías: a) la estructura tridimensional del enzima humano; b) los estudios de internalización mitocondrial y maduración de algunas formas mutantes; y c) los estudios "in vitro" de formas mutantes del enzima expresadas en un huésped bacteriano. Las mutaciones encontradas incluyen una delección de todo el gen, dos delecciones de una sola base que producen terminación prematura, y mutaciones puntuales que incluyen cuatro errores de "splicing", tres mutaciones sin sentido que producen parada prematura, una sustitución del codón normal de terminación por un triptófano, con elongación de la cadena, y 21 cambios de aminoácido entre los que se incluye la pérdida de la metionina en posición 1. Los resultados demuestran a) la sensibilidad diagnóstica del estudio mutacional; b) la gran variabilidad y escasa redundancia de las mutaciones encontradas; c) la frecuencia elevada de mutaciones "de novo", particularmente en mujeres; d) la baja frecuencia de delecciones o de mutaciones fuera de las regiones codificantes o puntos de "splicing"; e) la particular visibilidad mutacional de las regiones centrales de la estructura primaria de la proteína y la existencia de regiones "mudas"; y f) la elevada frecuencia de mutaciones que afectan a la estabilidad del enzima más que a sus propiedades catalíticas y que resultan en pérdida de la proteína enzimática. (Proyecto PM97-0134-C02-01, Dirección General de Enseñanza Superior, Investigación y Desarrollo)

NUEVOS MECANISMOS DE LA EXPRESION DE GENES EN BACTERIAS

Coordinadores: Bernardo González y Diego de Mendoza

COMPLEX REGULATORY PATHWAYS IN THE CONTROL OF BACTERIAL CELL DIVISION. Lara Ferrero, Alicia de la Fuente, Pilar Palacios, Javier Alvarez, and Miguel Vicente. Centro Nacional de Biotecnología. CSIC Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain

The transcriptional organisation of the *Escherichia coli* *dcw* cluster (16 genes involved in cell division and cell wall peptidoglycan biosynthesis) is complex: there are no transcriptional terminators and there is an abundance of promoters that can drive transcription of the downstream genes. For *ftsZ* in particular there are at least seven promoters within the coding region of the genes located immediately upstream (*ddlB*, *ftsQ* and *ftsA*). These promoters contribute only 33% of the total *ftsZ* transcription. The remaining 66% transcription is due to upstream transcripts that enter into the *ftsZ* gene, and not to the activation of the promoters proximal to *ftsZ* by upstream signals acting in *cis*.

Several genes have been identified (by inactivating insertions) that modify the activity of a reporter gene located inside *ftsZ* at the end of the cluster. The effect of overexpression of *bolA*, a morphogene involved in stress regulation has been analysed using genomic arrays. The results identify genes whose expression is modified by the higher levels of BolA. Comparison of both results indicates that some genes appear in the two subsets.

ANALISIS DE LOS DETERMINANTES GENETICOS NECESARIOS PARA LA PRODUCCION DE MICROCINA E492 ACTIVA. (Analysis of the genetic determinants necessary for the production of active microcin E492). Lagos, R., Corsini, G.*, Baeza, M*, Castillo, J.A†, Hetz, C., Strahsburger, E., y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

La microcina E492 es una bacteriocina formadora de poros, que es producida y excretada por *Klebsiella pneumoniae* RYC492, y se expresa en forma activa sólo en fase exponencial de crecimiento. Mediante clonamiento, secuenciación y experimentos de mutagénesis por transposición se estudió la organización y funcionalidad de los determinantes genéticos implicados en la producción de microcina activa, estableciéndose la participación de cuatro genes en la maduración de la microcina. Mutaciones en dos de estos genes resultan en la producción de abundante microcina inactiva, que no ha perdido la capacidad de formar canales iónicos en bicapas lipídicas, y presentan actividad bactericida sobre esferoplastos, lo cual sugiere fuertemente que estas mutaciones afectan el reconocimiento del receptor de la célula sensible, o el proceso de translocación. El análisis de los niveles de expresión de mRNA del gen estructural de la microcina de cultivos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento reveló que no son significativamente diferentes, indicando que posiblemente la expresión de microcina activa depende de la presencia de genes de maduración. Se analizaron los patrones de transcripción en distintas fases de crecimiento de los genes implicados en la maduración de microcina, encontrándose una disminución en la expresión de dos de ellos en fase estacionaria. Esta observación concuerda con la pérdida de producción de microcina activa en fase estacionaria.

FONDECYT 1991017 * Becario CONICYT;† Becario DAAD

PERCEPCION Y TRANSDUCCION DE SEÑALES TERMICAS EN *BACILLUS SUBTILIS*. (Perception and transduction of thermal signals in *Bacillus subtilis*) de Mendoza, D. y Aguilar, P. IBR-CONICET y Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, 2000-Rosario, Argentina

Un mecanismo universalmente conservado de adaptación en bacterias y en la mayoría de los organismos poiquilotérmicos es el ajuste de la composición de los lípidos de membrana a bajas temperaturas de crecimiento. Células de *Bacillus* responden a una disminución en la temperatura ambiente desaturando los fosfolípidos de membrana por la enzima $\Delta 5$ -desaturasa. Nuestro grupo ha aislado el gen *des* que codifica para la $\Delta 5$ -desaturasa de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen *des* está controlada por la temperatura de crecimiento. A temperaturas de 37°C, este gen se encuentra inactivo, pero al disminuir la temperatura de crecimiento a 20°C se induce transitoriamente la transcripción del mismo. Mediante el uso de fusiones transcripcionales del promotor del gen *des* al gen *lacZ* de *E. coli* se pudo demostrar que un operón compuesto por dos genes que fueron denominados *desK* y *desR*, son esenciales para la inducción del gen *des*. El operón *desKR* codifica proteínas homólogas a un sistema de transducción de señales de dos componentes. Se presentan experimentos que indican que DesR, actúa directamente sobre la región promotora del gen *des*. Se presentan evidencias que permiten la formulación de un modelo adonde la proteína DesK poseería actividades antagonicas de kinasa y fosfatasa que activarían o desactivarían a DesR a bajas o a altas temperaturas de crecimiento respectivamente. Asimismo los ácidos grasos insaturados sintetizados a bajas temperaturas actuarían como reguladores negativos de la activación transitoria del gen *des* a esa temperatura. Por lo tanto el sistema DesK-DesR actuaría como un termosensor controlando la expresión génica dependiente de temperatura en *B. subtilis*.

REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DEL CATABOLISMO DE CLOROAROMATICOS EN *RALSTONIA EUTROPHA* POR NUMERO DE COPIA, OPERONES REDUNDANTES Y REORDENAMIENTO DE GENES (Regulation of the expression of chloroaromatic catabolism genes in *R. eutropha* by copy number, redundant operons, and gene rearrangement). González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE.

R. eutropha JMP134 (pJP4) es una bacteria capaz de adaptarse a crecer en diversos contaminantes cloroaromáticos, como el 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) y el 3-clorobenzoato (3-CB). Los genes catabólicos claves (genes *tfd*) están localizados en el pJP4, un plasmidio degradativo de 88 kb. La organización de estos genes es poco común. El pJP4 posee dos módulos génicos no idénticos, que codifican para la degradación de clorocatecoles, intermediarios catabólicos claves. Cada uno de estos módulos es autosuficiente para permitir el crecimiento en 3-CB cuando están presentes en número alto de copia; se complementan entre sí en la configuración natural del pJP4, pero son insuficientes para degradar 3-CB (aunque continúan permitiendo el crecimiento en 2,4-D) cuando están integrados en el cromosoma. Un reordenamiento que produce una duplicación de los genes *tfd* aumenta notablemente la capacidad para degradar 3-CB, pero provoca la pérdida de la capacidad para crecer en 2,4-D. Estos dos módulos son regulados por un único activador transcripcional (TfdR), dada la similitud entre las secuencias de control y la respuesta a inductores. Estos resultados junto a los provenientes de otros laboratorios en el mundo, sugieren que la gran adaptabilidad catabólica de esta bacteria radica, en parte importante, en poseer genes redundantes, localizados en un elemento móvil, y con posibilidades de modificar su número de copia. Financiado por FONDECYT 8990004 y una colaboración entre CONICYT y el BMB F/FZK, Karlsruhe, Alemania.

BIOLOGIA DEL DESARROLLO

Coordinadores:

Miguel Allende y Pablo Wappner

GENERACION DE INFORMACION POSICIONAL EN *DROSOPHILA*. Juan Modolell. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, C.S.I.C. y U.A.M., 28049 Madrid, España.

Un problema relevante en Biología del Desarrollo es la generación de la información posicional necesaria para crear patrones morfológicos. Como sistema modelo, utilizamos los discos imaginales de ala de *D. melanogaster*, los epitelios precursores de la mayor parte del tórax y de las alas de este insecto. En ellos estudiamos la especificación de la posición de órganos sensoriales que se generan en posiciones fijas. Inicialmente, los discos imaginales se subdividen en grandes territorios (compartimentos) definidos por bordes de restricción de linajes celulares. Estos bordes son centros organizadores que permiten la morfogénesis en todo el disco mediante moléculas señalizadoras que actúan a distancia (por ejemplo Decapentapegic y Wingless, los homólogos de BMP-4 y Wnt de vertebrados). De alguna manera, esta señalización se traduce en distribuciones heterogéneas de factores de transcripción (activadores y represores). Estos factores se encuentran en territorios mas pequeños que los compartimentos, territorios que tienen distintas formas y que se superponen parcialmente. En su conjunto, estos factores crean un prepatrón combinatorial, cuya complejidad y refinamiento crecen al ir creciendo el disco imaginal. Genes diana se activan mediante combinaciones específicas de genes de prepatrón en territorios todavía mas pequeños y mejor definidos. Así, de forma gradual se crea la información posicional del disco. Ilustraré estos procesos con ejemplos como son la definición de los territorios de expresión de los genes del complejo *iroquois* en la presuntiva vena L3 del ala y de los genes proneurales *achaete* y *scute* en el grupo proneural dorsocentral del notum.

CARACTERIZACION DE LA VIA DE SEÑALIZACION DE HIPOXIA. UTILIZACION DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO EXPERIMENTAL. Wappner, P., Bocca S.N., Centanin, L., Lavista Llanos S., Muzzopappa M. y Russo D.M. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar. Patricias Argentinas 435 (1405), Buenos Aires, Argentina.

El sistema vascular de los vertebrados es altamente plástico. La cantidad y distribución de capilares sanguíneos que irrigan un determinado tejido se modifican en respuesta a las concentraciones locales de oxígeno. La angiogénesis -formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes- depende fundamentalmente de un factor de crecimiento llamado VEGF (por Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF se secreta en tejidos sujetos a hipoxia y promueve la invasión del tejido por parte de los nuevos capilares. La irrigación adicional del tejido por parte de los nuevos capilares tiende a compensar la oxigenación deficiente. La transcripción de VEGF está controlada por un factor de transcripción de la familia bHLH-PAS (basic Helix Loop Helix - PAS) llamado HIF-1 (por Hypoxia Inducible Factor-1). Se sabe que la abundancia de HIF-1 en la célula se controla a nivel de estabilidad de la proteína: En normoxia HIF-1 tiene una vida media corta (cerca de 5 min.) y en condiciones de hipoxia la proteína se estabiliza, aumentando su vida media a aproximadamente 60 minutos. Muy poco se sabe sobre los mecanismos por los cuales el oxígeno es sentido en el entorno celular y sobre la cascada que transduce la señal hipóxica que culmina con la estabilización de HIF-1.

Nuestro grupo aborda este problema mediante una estrategia genética, para lo cual utilizamos como modelo experimental a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. El sistema vascular de la mosca es abierto y no cumple funciones de oxigenación de los tejidos. La provisión de oxígeno depende directamente del sistema respiratorio. El sistema respiratorio de los insectos consiste en una trama de túbulos altamente ramificados, llamados tráqueas, que conducen el aire desde exterior hasta cada célula individual del organismo. Al igual que el sistema vascular de los vertebrados, las tráqueas tienen la capacidad de proliferar en respuesta a hipoxia y compensar así la falta de oxigenación en los tejidos.

Hemos generado varias líneas de moscas transgénicas que llevan *reporters* transcripcionales que se inducen en respuesta a hipoxia. Estos *reporters* fueron contruidos en base a secuencias regulatorias de genes de mamíferos inducibles por hipoxia y expresan β -galactosidasa o la Proteína Verde Fluorescente (GFP) a lo largo de todo el ciclo de vida de *Drosophila*. Nuestros resultados implican que la maquinaria de respuesta a hipoxia se encuentra conservada entre insectos y mamíferos. Mediante estas líneas se pudo caracterizar por primera vez la respuesta transcripcional a hipoxia en un organismo entero. Se determinaron los rangos de concentración de oxígeno en los que hay inducción y se estudió la cinética de la respuesta. Actualmente, mediante la utilización de mutantes, estamos intentando determinar la identidad del homólogo de HIF-1 de *Drosophila* e individualizar elementos que controlan la estabilización o activación de este factor de transcripción. Si el paradigma de conservación evolutiva se mantuviera, estos nuevos elementos se corresponderán con genes homólogos que controlan la angiogénesis en los vertebrados.

THE ALZHEIMER-RELATED GENE PRESENILIN-1 FACILITATES SONIC HEDGEHOG SIGNALING IN XENOPUS PRIMARY NEUROGENESIS. Carrasco A. E.. Author for correspondence (e-mail: rqcarras@mail.retina.ar) Laboratorio de Embriología Molecular, Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 3° piso, 1121, Buenos Aires, Argentina.

To understand what steps of the genetic cascades that control neuronal differentiation are under the influence of presenilins, we overexpressed presenilin-1 (Ps1) in frog embryos and analyzed the expression patterns of genes known to be involved in primary neurogenesis. We provide evidences that Ps1 can reduce the number of N-tubulin⁺ primary neurons by modulating the balance of two prepattern genes, Gli3 and Zic2. Hence, Gli3 expression was down-regulated and Zic2 domains were expanded, according to their roles in activating and repressing neurogenesis, respectively. We had previously shown that sonic hedgehog (*X-shh*) overexpression also disfavored primary neuron formation, producing similar changes in the expression of prepattern genes, and increasing the number of cells, suggesting a proliferative role for shh signaling on neural progenitors (Franco et al., 1999). Now we find, notoriously, that Ps1 increases the amounts of *X-shh* transcripts within the domains of shh signaling, together with an expansion of the floor plate. We studied whether the inhibition of primary neuronal fate could be the result of altering proliferation or programmed cell death. Here we confirm that *X-shh* induces a widespread activation of proliferation, which is accompanied by an increase of programmed cell death with a similar distribution. Ps1 overexpression also promoted cell proliferation and apoptosis, but these effects were restricted around the dorsal midline of the embryo, within the normal range of shh signaling. Taken together, these observations constitute the first evidences that Ps1 might be modulating primary neuron formation, proliferation and programmed cell death, through the enhancement of shh signaling.

DESARROLLO DE LA GLANDULA PINEAL EN PEZ CEBRA. (Development of the Pineal Organ in Zebrafish). Allende, M. L., Rodrigo Young, Claudia d'Alençon, Viviana Nuñez, Andrés Sarrazin y Juan Vidal. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Casilla 653, Santiago, Chile.

La glándula pineal en los peces teleosteos es un órgano fotosensible directo y, al igual que en los demás vertebrados, está involucrado en la síntesis circadiana de la hormona melatonina. En el embrión de pez cebra, la pineal esta formada por dos tipos celulares: las neuronas de proyección y los fotorreceptores. Ambos tipos celulares son similares a células que se encuentran en la retina. Las células de la pineal comienzan a diferenciarse en el techo del diencéfalo a las 48 horas post fertilización, muchas horas antes que aparezcan las primeras células diferenciadas en la retina. Nuestro grupo desea entender los mecanismos por los cuales ocurre la especificación de las células de la pineal, aislando los genes involucrados en este proceso. Por una parte estamos efectuando estudios funcionales con genes que regulan diferenciación celular en retina, para comprobar si tienen una función similar en pineal. Por otro lado, hemos aislado regiones promotoras de genes expresados en pineal para aislar moléculas reguladoras de la transcripción específicas a éste órgano. Por último, se estudian diversos mutantes de pez cebra que presentan defectos en el desarrollo de fotorreceptores o del órgano pineal. Financiado por FONDECYT (1000879), Iniciativa Científica Milenio (P99-137-F) y la Fundación Andes.

BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS

Coordinadores:

Hugo Peña y Lorenzo Lamattina

COORDINACION DE LA EXPRESION GENICA ENTRE MITOCONDRIA Y NUCLEO EN PLANTAS. (Coordination of the gene expression between Nucleus and Mitochondria in Plants), Zabaleta, E., IIB.INTECH (CONICET/UNSAM), cc 164, 7130, Chascomús, Argentina. e-mail: zabaleta@intech.gov.ar

La existencia de sistemas genéticos físicamente separados en una célula requiere de mecanismos regulatorios para coordinar la expresión génica en respuesta a cambios en el desarrollo o estímulos ambientales. De manera general, estos cambios involucran una variación en el número de mitocondrias por célula. Esto implica necesariamente una respuesta a nivel nuclear para ajustar la expresión de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. En plantas, una multiplicación del número y actividad de las mitocondrias ocurre durante la esporogénesis, en anteras. Si bien se ha demostrado que varios genes nucleares de proteínas mitocondriales son inducidos específicamente en anteras y granos de polen, el mecanismo por el cual esto ocurre y la señal a la que responden son poco conocidos. Estudiando varios promotores de genes nucleares del complejo I mitocondrial (nCI), hemos localizado una región de 100 bp esencial y suficiente para la expresión de estos genes en anteras y granos de polen. Por experimentos de simple híbrido hemos identificado dos diferentes factores de transcripción: PAF 1 (Pollen Anther Factor 1) y ARR2 (Arabidopsis Response Regulator 2), así como otras proteínas que interactúan con ellos (AHP2, ETR1, PAF 2, 3 y 4). Estos últimos difieren de PAF 1 en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal por lo que suponemos no representan factores de transcripción. Interesantemente, PAF 2 y 3 poseen elementos en el N-terminal, que por análisis informáticos, serían dirigidas a las membranas mitocondriales. Por elementos presentes en estas proteínas sugerimos que PAF 2 y 3 podrían representar sensores redox. Así, ambos factores podrían integrar diferentes señales para modular la expresión de genes nucleares.

EFFECTOS CITOPROTECTORES DEL OXIDO NITRICO EN PLANTAS (Cytoprotective Effects of Nitric Oxide in Plants). Lamattina, L. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata. CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. E-mail: lolama@mdp.edu.ar.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre formado endógenamente en diversos sistemas biológicos. En animales, el NO está involucrado en procesos tan diferentes como neurotransmisión, vasodilatación y respuesta inmunológica. En plantas, donde las funciones fisiológicas del NO están muy poco documentadas, se lo ha visto implicado en: 1) transducción de señales, 2) regulación de procesos de adaptación a situaciones de estrés, bióticos y abióticos y 3) metabolismo de la clorofila y respuestas que son dependientes de la luz. En nuestro laboratorio hemos estudiado la capacidad antioxidante del NO frente a situaciones generadoras de estrés oxidativo. Los cloroplastos, en presencia de herbicidas metilviológenos (diquat o paraquat) y luz, generan un poder oxidativo por la reducción continua del O₂ a superóxido. Aplicaciones exógenas de NO sobre hojas de papa tratadas con diquat lograron disminuir la peroxidación de lípidos, la pérdida de clorofila, RNA y proteína y el escape de iones al espacio extracelular. El efecto protector del NO también se observó en el mantenimiento de los niveles de la subunidad mayor de la rubisco (LSU) y la proteína D1 del fotosistema II. Por otro lado, el tratamiento con NO logró revertir el incremento en la velocidad de transporte fotosintético de electrones generado por diquat.

Financ. por ANPCyT, Conicet, UNMDP, F. Antorchas, Unesco.

MODIFICACION DE LA CONCENTRACION ENDOGENA DE ACIDO JASMONICO EN PLANTAS TRANSGENICAS.

(Modification of endogenous jasmonic acid levels in transgenic plants) Peña-Cortés, H. Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

Acido jasmónico (AJ) y su metil ester (MeAJ), también denominados jasmonatos, son componentes esenciales de las vías de transducción de señales responsables de la regulación de la expresión génica asociada a la respuesta a condiciones de estrés y responsables de la activación del sistema de defensa vegetal. Estos jasmonatos son sustancias tipo ciclopentanonas encontradas normalmente en plantas y formadas a partir de ácidos grasos. Los jasmonatos también juegan papeles cruciales en el crecimiento y desarrollo vegetal. Utilizando mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar jasmonatos se ha logrado demostrar que estas sustancias son necesarias y suficientes para proteger las plantas contra el ataque de insectos. Recientemente, también se demostró que la aplicación de jasmonatos a plantas de tomates es suficiente para aumentar al doble la resistencia de estas plantas al ataque de insectos. Los jasmonatos pueden ser rápidamente transportados en plantas en fase líquida o vapor y de esta forma causar ciertas respuestas en la planta reguladas específicamente a través de la expresión de genes determinados. Este cambio en la expresión génica puede ser inducida mediante la aplicación exógena de concentraciones micromolares de AJ o MeAJ lo que permite la activación del sistema de defensa vegetal, permitiéndole presentar un estado activo para enfrentar de mejor forma las condiciones adversas. Numerosas evidencias demuestran la aplicación exógena de jasmonatos (en forma de spray, gas o asperjado) sobre ciertos cultivos otorga a la planta una mayor resistencia o tolerancia a ciertos patógenos. Por ejemplo, la aplicación de jasmonatos incrementa el grado de resistencia al hongo patógeno *Phytophthora infestans* o al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* en plantas de papa o tomate respectivamente, o inhibe el crecimiento de otros hongos fitopatógenos como *Botrytis* y *Penicillium* en diferentes tipos de berries. La aplicación de estas sustancias no sólo protege al fruto de este hongo, sino que mejora su aroma, no afecta la consistencia y prolonga su "shelf life" en al menos 15 días. La aplicación de jasmonatos a cítricos como pomelo protegen al fruto de la descomposición por infección con *Penicillium digitatum*.

Nuestro laboratorio está interesado en determinar la participación real *in vivo* del contenido de AJ intracelular en el metabolismo vegetal y su papel en las respuestas del vegetal a condiciones de estrés, ataque de insectos y patógenos. Para ello, se ha generado una estrategia para modificar los contenidos de AJ en plantas transgénicas de papa, tabaco y tomate basada en la manipulación de la expresión génica de gen codificador para aleno oxidasa (AOS), mediante ARN-antisentido y sobre-expresión génica. La presentación discutirá los resultados obtenidos en este trabajo. Financiado por Proyecto FONDECYT 1970121; 1000221

"BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVE DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE". Pagés, M. Institut de Biologia Molecular de Barcelona CSIC Jordi Girona 18, 08034 BARCELONA SPAIN

The phytohormone abscisic acid (ABA) plays an important role in many physiological processes in plants. ABA is crucial for the response to environmental stresses such as desiccation, salt and cold. Recently, important advances have been made in understanding the pathways that induce ABA and how the ABA signal is transduced into physiological responses. ABA induces transcription of many genes and dissection of ABA responsive promoters has given new insight into the integration of ABA into stress response and seed development. Many ABA inducible genes encode proteins that are believed to protect the plant against the effects of dehydration. Therefore, efforts have also turned toward understanding functions of proteins that are induced during desiccation. However, it is unlikely that one gene product will be sufficient to produce more than a marginal increase in stress tolerance. Therefore, several genes will have to be expressed in a transgenic plant to achieve biotechnologically useful effects. In this context, high expression of several genes involved in stress tolerance can be achieved by making transgenic plants with a single regulatory gene such as a transcription factor of the ABA signal pathway. We have cloned and characterized several maize regulatory factors, which in turn regulate the expression of downstream genes involved in the stress response. Their possible role in transgenic plants better adapted to adverse environmental conditions and the functional characterization of these factors will be presented

Comunicaciones orales

I - MICROBIOLOGIA I

1-1 EXPRESION DE GENES DE *HELICOBACTER PYLORI* EN *ESCHERICHIA. COLI* Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM* PARA EVALUAR SU USO COMO ANTIGENOS EN UNA VACUNA ORAL VIVA. (Expression of *Helicobacter pylori* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* for evaluation as oral live vaccine). Gaiardo, J., Martínez, P., Palacios, J.L. & Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La utilización de cepas atenuadas de *Salmonella* para el desarrollo de vacunas orales vivas está siendo estudiada profusamente. Nosotros proponemos evaluar el posible uso de los genes *babA* y *hpaA* (adhesinas) y *hspB* (proteína de shock térmico) de *H. pylori* como candidatos para la inducción de los correspondientes antígenos al incorporarlos en una cepa atenuada de *Salmonella typhimurium*. Posteriormente, los antígenos serán evaluados en ratón como modelo. Para esto se propone el uso del promotor *nirB* (nitrato reductasa de *E. coli*) en las construcciones a evaluar, inducible en anaerobiosis y por nitrato y comparar los niveles de expresión con un sistema inducible por incremento de temperatura. Los genes se amplificaron por PCR y se ligaron al vector pET21a y el promotor *nirB* se introdujo en reemplazo del promotor T7 del vector. Además, se reemplazó el gen *bla* (Amp^R) por *asd* (aspártico-semialdehído deshidrogenasa).

Las construcciones se incorporaron en las cepas *E. coli* χ 6212*asd*-y *Salmonella typhimurium* χ 4550*asd*-y se evaluaron los niveles de expresión por Western blot en anaerobiosis y aerobiosis, encontrándose mayor nivel de expresión con el sistema inducible por calor.

Financiado por FONDECYT N° 1000730.

I - 2 CARACTERIZACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. typhi* Ty2 INDUCIDAS EN ANAEROBIOSIS Y SU RELACION CON EL PROCESO DE INVASION A CELULAS EPITELIALES HUMANAS in vitro. (Characterization of anaerobically induced outer membrane proteins of *S. typhi* Ty2 and their relation with the epithelial cell invasion process). Bucarev, S. y Mora, G., Laboratorio de Microbiología, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

S. typhi es una enterobacteria Gram negativa, reconocida como agente etiológico de la fiebre tifoidea en humanos. Una de las condiciones principales que encuentra este patógeno dentro de su hospedero es la baja disponibilidad de oxígeno. Se ha demostrado que esta condición ambiental potencia la capacidad invasiva de *S. typhi*, sin embargo, aún no se han identificado los genes responsables de ello. Se propone que las proteínas de la superficie de la bacteria cumplirían un rol fundamental en la patogenicidad, ya que son ellas las que establecen un contacto directo con las células del hospedero. Por ello, en el presente trabajo se analizaron las proteínas de la membrana externa de *S. typhi* mayormente inducidas en anaerobiosis. Dos de estas proteínas fueron purificadas mediante electroforesis en geles de poliácridamida uni y bidimensionales y secuenciadas mediante degradación de Edman. La secuencia N-terminal de dichas proteínas las identificó como las porinas de alta especificidad de sustrato Tsx y LamB. Para evaluar el rol de estas proteínas en la capacidad de invadir y proliferar de *S. typhi* en células epiteliales en cultivo, los genes *tsx* y *lamB* fueron mutagenizados en forma dirigida, utilizando el vector suicida pGP704. Mediante el ensayo de sensibilidad a gentamicina se evaluó la capacidad de las mutantes obtenidas para invadir y/o proliferar en células epiteliales humanas.

Financiado por los proyectos FONDECYT 1960255 y 1990153.

1-3 SECRECION DE PROTEINAS HIBRIDAS A TRAVES DEL SISTEMA SECRETOR DE PROTEINAS TIPO I DE *Erwinia chrysanthemi*. (Secretion of hybrid proteins by the *Erwinia chrysanthemi* type I protein secretion system). Palacios, J., Martínez, P., Uribe, F., Socías, T., García V. & Venegas, A. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Erwinia chrysanthemi utiliza el sistema de secreción de proteínas tipo I para exportar proteasas. Estas presentan una señal secretora al extremo carboxilo-terminal. Con el fin de explorar la factibilidad de secretar proteínas híbridas al medio externo en *Escherichia coli*, el sistema transportador de *E. chrysanthemi* se expresó en *Escherichia coli*, y se evaluó mediante Western blot, la secreción de híbridos portando un fragmento del carboxilo terminal de la proteasa B de *E. chrysanthemi*. El extremo carboxilo terminal contiene seis repeticiones ricas en glicinas, seguido por dos secuencias aminoacídicas DFLV y DIIV. Se ensayaron híbridos, con una señal de secreción de 93 residuos conteniendo un motivo rico en glicinas y los elementos DFLV y DIIV, y con una señal de 181 residuos conteniendo todas las secuencias antes descritas. Sólo la señal de 181 residuos fue eficiente en promover la secreción de los híbridos, demostrando que los motivos ricos en glicinas son necesarios. Sin embargo, la secreción de los híbridos está impedida cuando éstos presentan la capacidad de formar puentes disulfuros. Así, la incapacidad de secreción se explica por la formación de cuerpos de inclusión de híbridos que contienen S-S, lo que limita su acceso al sistema secretor.

Financiado por proyecto FONDECYT N° 1971010 y FDI # AT-1.

I - 4 METALOTIONEINAS EN EL TRYPANOSOMA CRUZI (Metallothioneins in *Trypanosoma cruzi*). Mava, J.D.; Rodríguez, A.; Repetto, Y. y Morello, A. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Trypanosoma cruzi es el parásito causante de la enfermedad de Chagas. La quimioterapia de la enfermedad utiliza el nifurtimox y el benznidazol, drogas que actúan mediante la formación de radicales libres y agentes electrofílicos.

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas de bajo peso molecular y alto contenido de residuos de cisteínas y actúan uniendo metales e inactivando radicales libres y agentes electrofílicos. La cuantificación de las MTs se determinó en las cepas Tulahuén, LQ y MF y en los clones Brener y Dm28c, utilizando la técnica del cadmio radioactivo. La mayor concentración de MTs se encontró en la fase exponencial del crecimiento del T. cruzi y varió de 7.23 a 18.03 pMol/mg proteína dependiendo de la cepa. En la cepa MF, el contenido de MT es dos a tres veces mayor en las formas amastigotas y tripomastigotas, que en la forma epimastigota.

En parásitos tratados con nifurtimox o benznidazol, las MTs medidas por el método del cadmio o reveladas en geles de poliácridamida con dibromobimano bajaron notablemente indicando unión covalente de metabolitos reducidos de las drogas con los grupos tioles de las MTs. La purificación en columnas de Sephadex reveló dos isoformas de MT. Los resultados obtenidos indican un posible rol de las MTs en los procesos de detoxificación de drogas del parásito.

Financiado en parte por DID Universidad de Chile y SIDA/SAREC.

I - 5 LA TRIPTOFANIL-tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* TIENE UN SEGMENTO INTERNO PRESCINDIBLE PARA SU FUNCION. (Tryptophanyl-tRNA Synthetase from *A. ferrooxidans* has an internal segment dispensable for its function). **Zúñiga R.**, Salazar, J.C. y Orellana O. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina Universidad de Chile.

Las aminoacil-tRNA sintetetas son las enzimas que aminoacilan los tRNA con el aminoácido específico. Esta reacción es crucial para mantener la fidelidad de la expresión génica. En nuestro laboratorio, hemos clonado y expresado en *Escherichia coli* el gen de la triptofanil-tRNA sintetasa (*trpS*) de *A. ferrooxidans*. Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, hemos determinado que la enzima obtenida es activa. Utilizando métodos computacionales hemos detectado que esta enzima posee un segmento de 65 aminoácidos, localizado entre los aminoácidos 216-281, que no está presente en otras TrpRS. Se construyó un modelo computacional de la estructura tridimensional de la TrpRS de *A. ferrooxidans*, basado en la estructura cristalina de la TrpRS de *Bacillus stearothermophilus*. De la predicción postulamos que el segmento adicional de la TrpRS, constituye un dominio que no participa en la aminoacilación del tRNA.

Para probar esta hipótesis hemos eliminado, por mutagénesis del gen *trpS* de *A. ferrooxidans*, la región que codifica los aminoácidos 216 al 281. El gen mutado se clonó y expresó en *E. coli* y se estudió la funcionalidad del producto proteico mediante ensayos de actividad *in vivo* e *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que la enzima mutada es funcional. Se discutirán posibles alternativas para el origen y la función del segmento adicional de la enzima. Financiado por Fondecyt y Universidad de Chile

I - 6 ANALISIS GENOMICO Y FUNCIONAL DE LA FORMACION DE GLUTAMINIL Y ASPARRAGINIL-tRNA EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (Genomic and functional analysis of the formation of glutaminyl and asparaginyl-tRNA in *A. ferrooxidans*). **Orellana, O.**, Salazar, J.C. y Zúñiga, R. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

En los organismos vivos, la formación de glutaminil y asparaginil-tRNA se realiza por una vía directa, con la participación de las correspondientes aminoacil-tRNA sintetetas, o indirecta, en la que participan dos enzimas: una aminoacil-tRNA sintetasa (que aminoacila los tRNA con glutámico o aspártico) y una amidotransferasa dependiente de tRNA (AdT), que transforma los aminoácidos en las amidas correspondientes (glutamina o asparagina). En este trabajo se estudió, mediante análisis genómico y funcional, la formación de glutaminil y asparaginil-tRNA en *A. ferrooxidans*.

Mediante análisis de la secuencia parcial del genoma de *A. ferrooxidans* se detectó la presencia en un operón, de los genes que codifican las tres subunidades de la AdT. Se amplificaron los genes por PCR, se clonaron y se expresaron en *E. coli*. Se detectó la actividad de AdT en extractos de *E. coli* y de *A. ferrooxidans*. Con el objeto de identificar la función biológica de la vía indirecta en *A. ferrooxidans*, se analizó la presencia de glutamil, glutaminil, aspartil y asparaginil-tRNA sintetetas (GluRS, GlnRS, AspRS, AsnRS) en extractos celulares. No se detectó GlnRS ni AsnRS, sin embargo se detectaron GluRS y AspRS.

Los resultados obtenidos sugieren que la función de la vía indirecta en *A. ferrooxidans* es la formación de glutaminil y asparaginil-tRNA para la biosíntesis de proteínas.

Financiado por Fondecyt y Universidad de Chile.

I - 7 LA EXPRESION DEL OPERON *fabHIF* DE *BACILLUS SUBTILIS* ESTA RELACIONADA CON EL NIVEL INTRACELULAR DE MALONIL-CoA. (Expression of the *fabHIF* operon of *Bacillus subtilis* is related to the intracellular level of malonyl-CoA). **Schujman, G.E.** y de Mendoza D. Area Microbiología, IBR-CONICET, Fac. Cs. Biotécnicas y Farmacéuticas, UNR. e-mail: schujman@infovia.com.ar

La enzima FabF es una 3-oxoacil-ACP-sintetasa y cataliza la primera reacción en el proceso cíclico de elongación de ácidos grasos: la condensación de un grupo acilo unido a la proteína transportadora de acilos (ACP) con malonil-ACP. La regulación de la síntesis de ácidos grasos ha sido muy poco estudiada en bacterias Gram positivas por lo que se decidió analizar la transcripción y expresión del gen *fabF* de *Bacillus subtilis*. Para esto, se construyeron fusiones transcripcionales entre la región corriente arriba del operón *fabHIF* y el gen *lacZ*; se insertaron ectópicamente en el cromosoma de la cepa JH642 de *Bacillus subtilis* (silvestre) y en distintas mutantes isogénicas de la misma. La transcripción del operón se analizó midiendo actividad β -galactosidasa a muestras de cultivos de las distintas cepas. Los niveles de la proteína FabF se estimaron mediante técnicas de inmunodetección con anticuerpos específicos contra dicha proteína.

Condiciones que aumentan el contenido intracelular de malonil-CoA como el agregado de cerulenina (inhibidor específico de FabF), disminución de los contenidos de *fabF* mediante una mutante condicional, e inhibición de la síntesis de fosfolípidos utilizando cepas *gpsA*, causaron un aumento de hasta siete veces en la transcripción del operón. El uso de una mutante condicional en el gen *accB*, que limita los niveles intracelulares de malonil-CoA disminuyó la transcripción del operón y revirtió el efecto estimulante de la cerulenina. Este mecanismo de regulación de la síntesis de lípidos por malonil-CoA es diferente al comportamiento observado en otros sistemas estudiados.

I - 8 TOXICIDAD DIFERENCIAL DE METABOLITOS DE POLICLOROBIFENILOS PARA LA BACTERIA *E. coli*. (Differential toxicity of polychlorobiphenyl metabolites for *E. coli* bacteria). **Herrera, C.**, González, M. y Seeger, M. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile. E-mail: cherrerm@alumnos.utfsm.cl ; mseeger@qui.utfsm.cl

La toxicidad de diversos contaminantes ambientales explica en parte su ineficiente biodegradación. Los policlorobifenilos (PCBs), compuestos tóxicos para diversos mamíferos, son recalcitrantes a la biodegradación. En este estudio se analizó la toxicidad de diversos metabolitos de PCBs generados *in vivo* por las enzimas de la vía superior de bifenilo codificada en el locus *bph* de la bacteria aerobia *Burkholderia* sp. LB400. Para ello se utilizaron cepas recombinantes de *E. coli* que expresan diferentes subconjuntos de genes *bph* de la cepa LB400, generando a partir de PCBs los metabolitos dihidroxibifenilos, ácidos 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoicos y clorobenzoatos (Seeger *et al.* 1997. Marine Chemistry 58: 327). Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio mínimo con glucosa hasta fase exponencial. Después de inducir la expresión de las enzimas catabólicas, las bacterias se incubaron con un determinado clorobifenilo por hasta 24 horas. Para analizar la viabilidad bacteriana a diferentes tiempos se determinaron las unidades formadoras de colonias. Adicionalmente, las bacterias se observaron por microscopía electrónica de transmisión. De los metabolitos analizados los dihidroxibifenilos son los compuestos más tóxicos para *E. coli*, afectando dramáticamente su viabilidad. Por microscopía electrónica se observó una gran disminución de la cantidad de bacterias intactas y algunas vesiculaciones, producto de la lisis celular. Los clorobenzoatos fueron los metabolitos menos tóxicos para las bacterias. Se deberá abordar el problema que representa la toxicidad de estos metabolitos para establecer procesos eficientes de biorremediación de PCBs.

Financiamiento: DGIP 991322 (UTFSM) y Fondecyt 1990808.

II - BIOQUIMICA Y ESTRUCTURA DE PROTEINAS

II - 1 PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y CINETICAS DE FORMAS RECOMBINANTES DE ARGINASA DE HIGADO HUMANO (Structural and kinetic properties of recombinant forms of human liver arginase). López, V., Fuentes, M., Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Por las ventajas inherentes a las especies recombinantes, varios investigadores las han empleado para definir las propiedades enzimáticas de la arginasa (EC 3.5.3.1). Se supone, tácitamente, que son esencialmente equivalentes a especies nativas, a pesar de que algunas de las preparaciones descritas difieren en su interacción con el activador Mn^{2+} . Consideramos, por ello, necesario comparar especies nativas y recombinantes, para validar el uso de estas últimas como modelo de la arginasa humana. En este trabajo se describen formas nativas y recombinantes, con y sin polihistidinas agregadas (His_6 -arg), que muestran los mismos valores de K_m y K_i , la misma sensibilidad a modificadores químicos, y cuyos niveles de actividad presentan la misma dependencia con la concentración y temperatura de incubación con Mn^{2+} . Se describe, además, una menor estabilidad estructural de His_6 -arg, detectada al renaturar especies previamente tratadas con clorhidrato de guanidina (GdnHCl). Las concentraciones máximas de GdnHCl permitidas para la recuperación total de actividad fueron 1.8-2 M para especies nativas y recombinantes silvestres, y ≤ 0.6 -0.8 M para His_6 -arg. La menor estabilidad estructural de His_6 -arg concuerda con su rápida inactivación, aún en ausencia de GdnHCl. Los resultados obtenidos, correlacionados con cambios en la fluorescencia de triptofanos, muestran las ventajas de emplear especies de arginasa recombinante sin el agregado de polihistidinas.

FONDECYT 1000164

II - 2 MUTAGENESIS EN EL SITIO DEL METAL LIBRE DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *A. succiniciproducens* (Mutagenesis in the free-metal site of *A. succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Jabalquinto, A. M., ¹Cabezas, M., ²Laivenieks, M., ²Zeikus, J. G. y ¹Cardemil, E. ¹Departamento de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y ²Michigan State University.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica cataliza la descarboxilación y fosforilación de oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} para dar fosfoenolpiruvato, ADP y CO_2 . Estudios de difracción de rayos X en la enzima de *E. coli* han indicado que el Mn^{2+} se coordina, en el sitio del metal libre, al fosfato γ del ATP, a dos moléculas de agua y a las cadenas laterales de residuos de aspártico, histidina y lisina. En este trabajo hemos preparado las enzimas mutantes Asp263Asn, Asp263Glu, His225Gln e His225Glu, todas estas proteínas fueron purificadas a homogeneidad y sus espectros de dicroísmo circular fueron idénticos a los de la enzima nativa. Se determinaron los parámetros cinéticos para la reacción principal, en sentido de carboxilación, y para las dos actividades secundarias, encontrándose disminuciones notables en la V_{max} de la reacción principal y de la actividad descarboxilante de oxaloacetato, por otra parte la actividad tipo piruvato quinasa fue afectada en menor grado. La enzima mutante His225Gln presentó un aumento significativo para las K_m de Mn^{2+} y del fosfoenolpiruvato, lo cual sugiere una interacción entre el fosfato del fosfoenolpiruvato y el Mn^{2+} .

Financiado por DICYT-USACH 9941JL y FONDECYT 1000756

II - 3 CARACTERIZACION PARCIAL DEL RECEPTOR PARA PEROXIDASA DE LA MUCOSA INTESTINAL DEL PEZ *Cyprinus carpio*. (Partial characterization of peroxidase receptor from the intestinal mucosa of the fish *Cyprinus carpio*). Santander, C., Concha, M.I., Villanueva, J. y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Peroxidasa (HRP) se ha utilizado ampliamente como proteína trazadora en distintos modelos experimentales, para estudiar mecanismos de endocitosis. En el intestino del pez *Cyprinus carpio*, HRP es endocitada y luego por transcitosis alcanza la membrana basolateral donde es liberada en forma intacta. Estos antecedentes sugieren la participación de receptores en la internalización de HRP. Con el propósito de identificar y caracterizar parcialmente estos receptores hemos desarrollado un ensayo de "ligand blotting". En diferentes preparaciones de membranas de ribete en cepillo (BBM) hemos detectado la unión de HRP en forma específica a una sola banda de proteína con un peso molecular estimado en geles Tris-Tricina de 15 kDa. Adicionalmente, se demostró que el receptor corresponde a una proteína periférica de membrana. Ensayos iniciales de secuenciación de la proteína demostraron que el residuo amino terminal se encontraba bloqueado por lo que se realizó digestión triptica *in situ* de la banda de proteína para generar péptidos. Los péptidos secuenciados que en conjunto representan el 25% de la secuencia total presentaron sobre un 90 % de identidad de residuos con una proteína intestinal del mismo tamaño del pez ciprinido *Danio rerio*. Esta pertenece a la familia de proteínas que unen ácidos grasos (FABP).

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1980993

II - 4 TERMODINAMICA Y CINETICA DE LA RENATURACION *in vitro* DE α - Y β -TUBULINA RECOMBINANTE. Thermodynamics and kinetics of the *in vitro* renaturation of recombinant α - and β -tubulin. López, M., ^{*}Brunet, J., Lagos, R. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ^{*}Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

Muchos intentos han sido infructuosos para lograr el correcto plegamiento del heterodímero de tubulina *in vitro*. En un sistema de lisado de reticulocitos de conejo se ha conseguido replegar la tubulina y se ha determinado que participan la chaperona cpn-1 y al menos tres proteínas auxiliares. Sin embargo, el rendimiento de este sistema es tan bajo que no ha permitido hacer los estudios estructurales necesarios para conocer su mecanismo de plegamiento. Con la incorporación de bisulfito de sodio en la purificación de tubulina recombinante se obtuvo una proteína >99% pura, con alto rendimiento y estable cuando se almacenó a -20°C. Los resultados cinéticos (stopped-flow) y termodinámicos de la desnaturación y renaturación del heterodímero de α - y β -tubulina y de sus monómeros recombinantes, obtenidos mediante fluorescencia intrínseca (corrimiento del máximo, apagamiento y polarización) y dicroísmo circular (CD), muestran que la α -tubulina sería más estable que β -tubulina. La mutante, con solo el trp 21, mostró un aumento de la concentración media de hidroclorehidrato de guanidina en el proceso de renaturación. Se discute la validez de los cálculos de energía libre de estabilidad respecto del método (fluorescencia o CD) que se utilice para seguir los procesos de desnaturación y renaturación.

Financiado por proyecto FONDECYT 1981098

II - 5 INTERMEDIARIO EN LA RENATURACION DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli*. (Intermediate during the renaturation of phosphofructokinase-2 from *E. coli*). Baez, M., Rodríguez, P., Guixé, V. y Babul, J., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La Pfk-2 es una homodímero de 70 kDa que cataliza la formación de fructosa-1-6-bisP a partir de fructosa-6-P y ATP. En presencia de fructosa-6-P la enzima permanece como dímero; la unión de ATP al sitio alostérico promueve su tetramerización. Para conocer el mecanismo de renaturación de la enzima a la forma dimérica o tetramérica y detectar la presencia de intermediarios durante el proceso, se realizaron estudios cinéticos en presencia y ausencia de los ligandos, utilizando medidas de actividad enzimática, fluorescencia intrínseca y exposición de zonas hidrofóbicas.

Al renaturar la proteína desplegada en GuHCl 5 M, se observa un intermediario cuya desaparición es limitante para la adquisición de la fluorescencia intrínseca y actividad enzimática de la proteína nativa y es independiente de la presencia de los ligandos. Al renaturar partiendo de concentraciones de GuHCl en las que se observa el intermediario, la cinética de recuperación de estas propiedades es similar a la encontrada al renaturar la proteína a partir de 5M de GuHCl. Estas medidas, en conjunto con las de filtración molecular de la proteína a diferentes concentraciones de GuHCl, en presencia y en ausencia de los sustratos, sugieren que este intermediario corresponde a una especie monomérica parcialmente plegada.

(Financiado por Proyecto Fondecyt 1981091).

II - 7 EMPAQUETAMIENTO MOLECULAR DE R-FICOERITRINA DE *G. chilensis*: INTERACCIONES Y ANALISIS DE SUPERFICIES (Molecular packing of R-phycoerythrin from *G. chilensis*: interactions and surfaces analysis). Bunster, M., Contreras-Martel, C., Bruna C., y Martínez-Oyanedel, J. Lab. Biofísica Molecular, Dept. Biología Molecular. Fac. Cs. Biol. Universidad de Concepción. mbunster@udec.cl

R-ficoeritrina es una proteína que se encuentra asociada a otras ficobiliproteínas y péptidos de unión en los ficobilisomas de algas rojas principalmente. La unidad funcional corresponde a un empaquetamiento de absorción y fluorescencia y el uso de cromatografía de filtración molecular. Además se utilizó HBPLUS v3.51 para dar cuenta de las interacciones puente hidrógeno inter-subunidades y se calculó el aporte a la energía libre de desensamblaje producidos por éstos. Se calculó el área y se caracterizaron las superficies de interacción.

De acuerdo a nuestros resultados, la interacción que se produce entre las subunidades $\alpha\beta$ debería constituir un requisito para continuar con el proceso de ensamblaje, que debería ocurrir cooperativamente.

Proyecto D.I. U.de C. N° 99.031.084-01.

II - 6 MAPEO PROTEOLITICO DE LA SUBUNIDAD MENOR gpNul DE LA TERMINASA λ . (Proteolytic mapping of the smaller gpNul subunit of the λ terminase). Araya, P., Valenzuela, P., Rosemblatt, M., Murialdo, H., Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB. Avenida Marathon 1943, Santiago.

La terminasa del bacteriófago λ tiene dos subunidades; gpA de 72 KDa y gpNul de 20 KDa. Esta enzima tiene múltiples actividades; ATPásica, nucleolítica y helicasa. Su función primaria es el corte y empaquetamiento del DNA en la cápside. Aunque se conoce la estructura de algunas nucleasas y de enzimas que translocan DNA, se desconoce la de una enzima con las dos actividades.

Con el objetivo de dilucidar la relación entre las diferentes funciones y la estructura de la enzima nos hemos propuesto la identificación de dominios discretos. Al gen *Nul* se le adosó un oligonucleótido que coloca una etiqueta de histidina que permitió purificar la enzima mediante resina de afinidad. La subunidad menor se obtuvo con una pureza de alrededor de 90% lo que permitió efectuar un mapeo proteolítico. El corte de gpNul con quimotripsina generó dos proteínas principales de 15 KDa y 9 Kda mientras que la digestión con endoproteinasa Glu-C generó un fragmento mayoritario de 9 KDa. Los péptidos producidos por digestión proteásica se separaron mediante electroforesis en dos dimensiones, electrotransferidos a una membrana Immobilon-P y secuenciados. La secuencia N-terminal y el peso molecular de los péptidos permitió la determinación de su estructura primaria. En base a estos resultados se propone que gpNul está constituida por tres dominios físicos.

FONDECYT 1980209.

II - 8 APLICACION DE METODOS DE REGULARIZACION PARA LA DETERMINACION DEL ESPECTRO DE AFINIDADES EN SISTEMAS PROTEINA-LIGANDO. (Use of regularization methods in the determination of the affinity spectrum in protein-ligand systems). Adroer, J.^{a,b}; Garcés, J.L.^a; Mas, F.^a; Puy, J.^c y Cascante, M.^b. (a) Departamento de Química Física y (b) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Química, Universitat de Barcelona (UB). C/ Martí i Franquès, 1. E-08028 BARCELONA (ESPAÑA); (c) Departament de Química, E. T. S. Enginyeria Agrària, Universitat de Lleida (UdL). Av. Rovira Roure, 177. E-25198 LLEIDA (ESPAÑA).

La interpretación de las interacciones de equilibrio entre ligandos y proteínas es de un gran interés bioquímico. Aunque se han desarrollado diferentes procedimientos para caracterizar dicho enlace cuando la proteína presenta un reducido número de sitios activos, una visión general se puede realizar a través del llamado espectro de afinidades, $p(k)$, que da la proporción de sitios con una afinidad local o intrínseca entre k i $k + dk$. La porción de sitios ocupados se interpreta como una superposición ponderada de isothermas de Langmuir locales. El cálculo del espectro de afinidades a partir de la curva de complejación requiere la solución de una ecuación integral mal condicionada. Se han propuesto diferentes métodos para su solución, entre los cuales cabe destacar los métodos de regularización.

El objetivo de este trabajo es la aplicación de métodos de regularización lineal a diferentes sistemas de complejación proteína-ligando, para la obtención del espectro de afinidades asociado.

III - ESTRES OXIDATIVO

III - 1 ESTUDIO DE BIOGENESIS DE ALDR, UNA PROTEINA DE MEMBRANA PEROXISOMAL EN CELULAS CHO. (Biogenesis of ALDR, a peroxisomal membrane protein in CHO cells) Toro, A., Venegas, A. y Santos, M. J. Departamentos de Biología Celular y Molecular y Microbiología y Genética Molecular, Universidad Católica de Chile.

Los peroxisomas son organelos ubicuos relacionados particularmente con el metabolismo lipídico. Con respecto a su biogénesis, el modelo de "crecimiento y división" propuesto por Lazarow y Fujiki en 1985, establece que tanto las proteínas de matriz como de membrana peroxisomal (PMPs) serían sintetizadas en polirribosomas libres e importadas post-traduccionalmente a los peroxisomas. Sin embargo, en levaduras se ha propuesto que los peroxisomas se originarían a partir de vesículas provenientes del retículo endoplásmico (RE).

Con el fin de determinar si el RE juega un rol en la biogénesis peroxisomal en células de mamíferos, fusionamos el gen de la proteína ALDR (Adrenoleukodystrophy related protein, un transportador peroxisomal) y el de la proteína fluorescente verde (GFP), para posteriormente transfectar células CHO. Estas células fueron incubadas en presencia de Cicloheximida (CHX) para inhibir la síntesis de proteínas y Brefeldin A (BFA) para bloquear la salida de vesículas del RE. Luego, se removió CHX para permitir la expresión de la proteína fusión. Nuestros resultados sugieren que la proteína ALDR-GFP sería transportada a la membrana peroxisomal, directamente desde el citosol, independiente de la presencia de BFA. Sin embargo, la existencia de proteínas encargadas de la formación de vesículas en el RE, insensibles a BFA, no puede ser descartada.

Financiamiento FONDECYT 1980978.

III - 2 EVIDENCIAS CITOQUIMICAS Y BIOQUIMICAS DE UNA ATPASA EN LA MEMBRANA PEROXISOMAL HUMANA. (Cytochemical and biochemical evidence for a membrane ATPase in human peroxisomes) Araya, C., Skorin, C., Leighton, F., Koenig, C. y Santos, M. J. Departamento de Biología Molecular y Celular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los peroxisomas son organelos subcelulares esenciales y ubicuos involucrados en varias reacciones metabólicas, particularmente a nivel de lípidos. Sus proteínas de matriz y de membrana son sintetizadas en ribosomas libres e importadas post-traduccionalmente al organelo. En este proceso, una eventual ATPasa peroxisomal jugaría un rol importante. Con el fin de establecer las condiciones experimentales para la detección de una ATPasa peroxisomal humana, primero se realizó una caracterización citoquímica y bioquímica en peroxisomas de hígado de ratas controles y tratadas con el proliferador peroxisomal, cipofibrato. Se encontró una reacción Mg-ATPasa en peroxisomas, cuya actividad fue sensible al inhibidor N-etilmaleimida y 7-cloro-4-nitro-benzo-2-oxadiazol. Un procedimiento citoquímico fue desarrollado para detectar esta actividad encontrándola en las membranas peroxisomales. Las condiciones establecidas para detectar la ATPasa peroxisomal de rata fueron aplicadas a peroxisomas humanos aislados de hígado y fibroblastos de piel. Una actividad Mg-ATPasa similar fue revelada, citoquímica y bioquímicamente, en las membranas de peroxisomas humanos. Estos resultados, junto con evidencias anteriores, fuertemente apoyan la presencia de una ATPasa específica en las membranas peroxisomales humanas. Esta ATPasa podría jugar un rol crucial en la biogénesis peroxisomal.

Financiado por proyecto FONDECYT 1980978.

III - 3 METABOLISMO DE α -TOCOFEROL (VITAMINA E) EN RATONES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B, TIPO I (SR-BI). (Metabolism of α -tocopherol (vitamin E) in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice). Mardones P.¹, Strobel P.², Miranda S.³, Leighton F.², Krieger M.³, Quiñones V.¹, Rigotti A.¹. ¹Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina y ²Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile; ³Biology Department, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son uno de los principales transportadores plasmáticos de colesterol y α -tocopherol (o vitamina E). Evidencias recientes indican que el α -tocopherol es captado por las células mediante transporte selectivo a partir de HDL, sin requerirse endocitosis ni degradación de la partícula de HDL. Dado que el proceso de captación celular selectiva de colesterol-HDL es mediado por el receptor SR-BI, en este estudio evaluamos el rol de SR-BI en el metabolismo de α -tocopherol analizando los niveles de α -tocopherol en plasma, bilis y tejidos de ratones silvestres y ratones deficientes en SR-BI (SR-BI KO). Los ratones SR-BI KO presentaron una alteración general del metabolismo de α -tocopherol con respecto al grupo control, manifestada como: 1) aumento de los niveles plasmáticos y disminución del contenido biliar de α -tocopherol, 2) caída significativa de los niveles de α -tocopherol en cerebro, pulmón y testículos y aumento pronunciado en las glándulas adrenales. Estos resultados indican que la expresión de SR-BI es un importante factor regulador del metabolismo de α -tocopherol *in vivo* y, a la vez, definen un nuevo modelo experimental para evaluar el papel del α -tocopherol en biología y patología.

Financiamiento FONDECYT 8990006 y PUC-PBMEC 2000

III - 4 ELEVACION DE VITAMINA C PLASMATICA POR CONSUMO MODERADO DE VINO (Moderate wine consumption raises plasma vitamin C levels) Strobel P., Pérez DD, *Castillo O, *Rozowski J, *Marshall G, Leighton F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas y *Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. pstrobel@genes.bio.puc.cl

Se ha descrito reducción de vitamina E oxidada (radical tocoferilo $E^{\circ}=0.48V$) por ascorbato reducido ($E^{\circ}=0.28V$). Algunos polifenoles antioxidantes pueden también reducir tocoferilo a vitamina E y ascorbilo a ascorbato. En sistemas heterogéneos (lipo e hidrosoluble) es difícil predecir resultados. Por esto y porque el transporte de ascorbilo a células es bloqueado por flavonoides (Strobel, 1996) evaluamos si el aporte en polifenoles antioxidantes del vino induce cambios en ascorbato plasmático.

Se analizaron los cambios experimentados por voluntarios sometidos a diferentes dietas, con y sin suplementación con vino tinto (240/ml día por 4 semanas). Los niveles de ascorbato (μM) fueron: dieta mediterránea 55.9 ± 11.2 (n=21); dieta occidental 29.7 ± 8.9 (n=21); dieta occidental poliinsaturada 35.1 ± 14.1 (n=18); dieta occidental monoinsaturada 31.7 ± 9.9 (n=22); la administración de vino aumentó los niveles a 13% ($p<0.006$), 21% ($p<0.14$), 43% ($p<0.0001$), 90% ($p<0.0001$), respectivamente. Vitamina C se midió espectrofotométricamente ($FeCl_3$ -TPTZ) y por HPLC. El vino administrado no contenía vitamina C. Los resultados confirman que el vino puede aportar antioxidantes capaces de regenerar vitamina C o de reemplazarla. Y también, que podría haber inhibición por polifenoles de los transportadores facilitativos de glucosa y ascorbilo a las células. La definición del mecanismo responsable se ha abordado experimentalmente. (PUC-PBMEC-2000)

III - 5 MECANISMO PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES POLIFENOLICOS SOBRE LA ACTIVACION ENDOTELIAL (Protective mechanisms of polyphenolics antioxidants on endothelial activation). Miranda S#, Martin-Nizard F*, Furman C*, Briand O*, Duriez P*, Leighton F#. * Institut Pasteur, INSERM U325, Lille, France, #Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Prog. Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Fac. Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

La función endotelial (FE) está mayormente determinada por la actividad vaso-dilatadora del óxido nítrico (NO) y la actividad vaso-constrictora de la endotelina (ET-1) y se pierde en condiciones proaterogénicas. El consumo de vegetales y vino, fuentes de antioxidantes polifenólicos, restablece o aumenta la FE y protege de enfermedad coronaria.

Para evaluar la acción de agentes proaterogénicos se estudió el efecto de lipoproteínas nativas (LDL_n) y oxidadas (LDL_{ox}) sobre la actividad de la NO sintasa (NOS) y la secreción de ET-1 en células endoteliales en cultivo (BAEC). También, el efecto de polifenoles: quercetina (Q) y ácido eláico (AE).

La incubación con LDL_{ox} aumenta las especies reactivas del oxígeno (ROS), proceso inhibido por los antioxidantes. También aumenta la secreción de ET-1 en presencia de LDL_n (120%) y LDL_{ox} (153%). Los antioxidantes inhiben este aumento: Q 47%; AE 58.3% para LDL_n, y Q 47%; AE 56% para LDL_{ox}. La actividad de NOS disminuye en presencia de LDL_n a un 81.1±9.1% (p<0.005); la adición simultánea de Q acentúa esta disminución a un 57.5±12.3% (p<0.001).

Los resultados sugieren que la inhibición de la producción de ROS y de la secreción de ET-1 median la protección de la FE causada por polifenoles.

(Fondecyt 2990085 y PUC-PBMEC2000)

III - 6 ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS ENDOTELIALES CAUSADO POR LDL Y HDL OXIDADA. PROTECCION POR ACIDO PROTOCATEQUICO (Oxidative damage in endothelial cells by oxidized LDL and HDL. Protection by protocatechuic acid). Zambrano, C., Foncea, R. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Prog. Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas. Fac. Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: S. Miranda)

Las LDL oxidadas (LDL_{ox}) median el desarrollo de aterosclerosis. En lesiones ateroscleróticas se encuentra tanto LDL_{ox} como HDL_{ox} y se ha demostrado que el vino tinto, rico en antioxidantes polifenólicos, inhibe *in vitro* la oxidación de las LDL. En este trabajo se preparó LDL y HDL oxidadas *in vitro*, se demostró que un antioxidante polifenólico, el ácido protocatequico (APC) retarda su oxidación y se estudió la producción de estrés oxidativo por LDL_{ox} y HDL_{ox} en células endoteliales en cultivo (HUVEC). En HUVEC, LDL_{ox} y HDL_{ox} indujeron generación de especies reactivas del oxígeno (EROs), medidas con 2,7-diclorofluoresceína, y estrés oxidativo detectado por inducción en la expresión de hemoxigenasa-1 (HO-1) y por formación de residuos de nitrotirosina (NTyr).

LDL_{ox} y HDL_{ox} (50 ug/ul) aumentaron las EROs en 43% (p<0.005) y 33% (p<0.02) respectivamente, sobre el control, efecto inhibido por el APC (50 uM). Mediante RT-PCR se detectó aumento significativo del mRNA de HO-1 en presencia de las lipoproteínas oxidadas, que correlacionó temporalmente con aumento de la proteína. También hubo aumento de NTyr. La incubación simultánea con APC inhibió ambos procesos. En conclusión, LDL_{ox} y HDL_{ox} inducen estrés oxidativo en células endoteliales en un proceso sensible a antioxidantes exógenos.

(PUC-PBMEC-2000 y Fondecyt2990085)

III - 7 EL ESTRES OXIDATIVO INDUCIDO POR HIERRO REGULA LA EXPRESION DE CALRETICULINA. (Iron-induced oxidative stress up-regulates calreticulin expression). Núñez, M.T. Tapia, V., Vergara, A. y Osorio, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.

Calreticulina (CR) es una proteína que une calcio y que actúa como chaperona en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico. Mobilferrina, una forma citosólica de CR, es un transportador citoplasmático del hierro que recién entra a la célula. En este trabajo investigamos la posible asociación entre CR y la homeostasis del hierro. Células intestinales Caco-2 se cultivaron con variadas concentraciones fisiológicas de hierro. En estas células se determinó los niveles celulares de hierro así como la masa y niveles de RNA mensajero de CR. Incrementos en hierro intracelular indujeron un incremento en los transcritos y en la masa de CR. El hierro también indujo daño oxidativo determinado por la formación de aductos de proteínas y 4-hidroxinonenal. El co-cultivo de las células con hierro a concentraciones que inducen la expresión de CR y con antioxidantes abolió tanto el incremento en la masa de CR como el daño oxidativo. Postulamos que el aumento en la masa de CR inducido por hierro es parte de la respuesta fisiológica normal a estrés oxidativo, reforzando los papeles fisiológicos de CR como chaperona en el plegamiento de proteínas y como amortiguador del calcio en el retículo endoplásmico.

Financiado por proyecto FONDECYT 1970465 y por una Cátedra Presidencial en Ciencia a MTN.

III - 8 DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR HIERRO EN CELULA DE COLON CACO-2. (Iron-induced oxidative damage in colon carcinoma (Caco-2) cells). Núñez, M.T., Tapia, V., Núñez-Millacura, C., y Okada, S. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile y Okayama University Medical School.

Las células del epitelio intestinal tienen sistemas de incorporación de hierro mediante los cuales adquieren cantidades crecientes de hierro en el tiempo. Ya que el hierro intracelular es un generador de radicales libres, este estudio analizó el daño oxidativo generado por la acumulación de hierro en células Caco-2. Células cultivadas con crecientes concentraciones de hierro incrementaron en el tiempo la concentración intracelular de hierro total y de hierro reactivo, a pesar de mostrar un sistema de homeostasis celular (IRE/IRP) activo. Las concentraciones crecientes de hierro celular resultaron en daño oxidativo a proteínas y al DNA, demostrado por inmunoreactividad a anticuerpos contra 4-hidroxinonenal y 8-hidroxi-2-deoxiguanosina. El daño oxidativo mediado por hierro resultó, finalmente, en pérdida de la viabilidad celular. En resumen, la acumulación de hierro por células Caco-2 se correlacionó con daño oxidativo y pérdida de viabilidad celular. Este daño inducido por hierro puede ser relevante en el establecimiento de la cascada de eventos asociados con carcinogenesis del colon.

Financiado por proyecto P99-031 al Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología y por una Cátedra Presidencial en Ciencia a MTN.

IV - BIOLOGIA VEGETAL I

IV - 1 EXPRESION DE UN GEN *cry1Ab* DE *Bacillus thuringiensis* EN CEPAS DE *B. subtilis* Y *B. licheniformis* COLONIZANTES DEL FILOPLANO DEL TOMATE (Expression of a *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* in *B. subtilis* and *B. licheniformis* strains that colonize the phylloplane of tomato plants) **Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., González, E. y Meza-Basso, L.** Instituto Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.

La aplicación directa del *B. thuringiensis* (BT) puede controlar la polilla del tomate pero existen limitantes debido a su inestabilidad y persistencia. Para obviar este inconveniente, se transformaron, con un gen *cry1A(b)* de BT, cepas del género *Bacillus* habitantes naturales del filopiano del tomate a fin que estas bacterias recombinantes produzcan su acción insecticida *in situ*.

Se aisló un gen *cry1Ab* de una cepa nativa de BT mediante PCR, empleando partidores específicos. El gen fue clonado en pGEM5 y ligado a un vector "shuttle" pHT 315 (Lereclus *et al.*, 1989). Se transformó, mediante electroporación, una cepa control de BT acristalifera, y dos cepas colonizantes del filopiano del tomate *B. subtilis* y *B. licheniformis*, respectivamente. Los transformantes seleccionados producen cristales proteicos durante la esporulación. La proteína cristalina de c.a. 130 kDa, es reconocida por anticuerpos contra las proteínas *Cry1A* en tanto que los bioensayos con la toxina recombinante contra larvas de la polilla mostraron toxicidades equivalentes a lo conseguido con la toxina nativa.

Se concluye que es posible utilizar otros vehículos de expresión de δ -endotoxinas de BT a fin de conseguir una mayor persistencia y estabilidad del biopesticida. Financiamiento: Fondecyt 1990899.

IV - 2 MANIPULACION DE LA EXPRESION GENICA DE ALENO OXIDO SINTASA MEDIANTE ARN-ANTISENSE Y SOBRE-EXPRESION PARA MODIFICAR EL CONTENIDO DE ACIDO JASMONICO EN PLANTAS TRANSGENICAS (Manipulation of allene oxide synthase gene expression by antisense-RNA and overexpression for modulating endogenous levels of jasmonic acid in transgenic plants). **Ramírez, I., Sánchez, C., Cárdenas, L. y Peña-Cortés, H.** Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

El ácido jasmónico (AJ) y su metil ester (Me-AJ) han sido propuestos como componentes esenciales de la vía traductora de señales responsable de la regulación de la expresión de genes asociados al sistema de defensa vegetal en respuesta a diversas condiciones de estrés. AJ y Me-AJ son derivados de lípidos sintetizados a partir de ácido α -linolénico a través de una reacción de oxigenación mediada por lipoxygenasas, generando ácido 13-peroxihidrolinolénico (13-HPLA) el cual es subsecuentemente transformado por la acción de la aleno oxido sintasa (AOS) y otros pasos adicionales. AOS convierte el 13-HPLA en epoxi aleno, proporcionando así el precursor directo para la formación de AJ. La concentración endógena de AJ aumenta considerablemente en plantas que han sufrido daño mecánico o sometida a condiciones de estrés como ataque de insectos o patógenos, radiación u ozono. Esta acumulación de AJ permite la inducción específica de determinados genes que permitirán la activación del sistema de defensa vegetal.

Nuestro laboratorio está interesado en determinar la participación real *in vivo* del contenido de AJ intracelular en el metabolismo vegetal. Para ello, se ha generado una estrategia basada en la manipulación de la expresión génica de AOS para modificar los contenidos de AJ en plantas transgénicas de papa, tabaco y tomate. En este trabajo se presentarán los resultados obtenidos al modificar la expresión de AOS en plantas transgénicas de tomate mediante ARN-antisentido y sobre-expresión génica.

Financiado por proyecto: FONDECYT 1970121; 1000221

IV - 3 CARACTERIZACION DE LA EXPRESION GENICA DE ZEAXANTINA EPOXIDASA (ZE) EN PLANTAS DE TOMATE. Characterization of Zeaxanthine Epoxidase Gene Expression in Tomato Plants). **Dorta, E., Ramírez, I., Cárdenas, L. y Peña-Cortés, H.** Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal clave en la regulación de diversos procesos fisiológicos asociados al desarrollo y crecimiento de la planta así como en los mecanismos asociados al sistema de defensa vegetal frente a diversas condiciones de estrés. Los vegetales aumentan su contenido de ABA considerablemente como respuesta a condiciones adversas tales como estrés hídrico; ataque de patógenos y daño mecánico ocasionado por insectos, herbívoros y viento; estrés por salinidad, etc. Este aumento de ABA estaría implicado en la regulación de genes específicos cuyos productos podrían cumplir un rol fundamental en los mecanismos de tolerancia como una respuesta del vegetal a dichas condiciones de estrés.

La información sobre las enzimas involucradas en la biosíntesis del ABA, así como posibles genes codificadores para estas enzimas es muy limitada. Marín y colaboradores (1996) presentaron el primer reporte de un posible gen involucrado en la biosíntesis de ABA. Este gen codifica una enzima (67kDa) con actividad Zeaxantina epoxidasa (ZE), localizada en el cloroplasto, catalizando la reacción de epoxidación de zeaxantina para dar origen a anteraxantina y subsecuentemente a violaxantina. Este correspondería al primer paso de la vía biosintética propuesta y sería el paso limitante para la acumulación de ABA. Se ha sugerido un papel clave de esta enzima en la ruta biosintética del ABA y podría jugar un rol fundamental en el aumento de esta hormona por efecto de las distintas condiciones de estrés.

En la actualidad no se dispone información sobre el papel que cumpliría el producto del gen ZE en la regulación de la biosíntesis de ABA frente a diferentes condiciones de estrés o procesos involucrados en el desarrollo y crecimiento de la planta.

Para obtener una información más amplia sobre la expresión génica de ZE en vegetales, este estudio analiza la expresión del o los genes que codifican para la enzima zeaxantina epoxidasa en plantas de tomate bajo diferentes condiciones de estrés y así verificar la participación de estos genes en la vía biosintética y aumento del ABA en la mediación de tales respuestas.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1970121. Referencia Marín *et al.*, (1996) EMBO J. 15, 2331-42

IV - 4 EL PRECURSOR SDH2-RPS14 ES PROCESADO PROTEOLITICAMENTE PARA GENERAR RPS14 MITOCONDRIAL EN MAIZ. (The SDH2-RPS14 precursor is proteolytically processed to generate maize mitochondrial RPS14). Figueroa, P. y Jordana, X. Departamento Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El gen funcional de la proteína ribosomal mitocondrial S14 (*rps14*) ha sido transferido desde la mitocondria al núcleo en maíz, integrándose en un intrón del gen de la subunidad hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa (*sdh2*). Se generan dos transcritos del locus *sdh2-rps14* mediante procesamiento alternativo: un transcrito codifica para un precursor de la proteína SDH2 funcional, mientras que el segundo transcrito codifica para una proteína precursora química que contiene parte de SDH2 y RPS14 (SDH2(t)-RPS14).

En este trabajo mostramos que la misma presecuencia de destinación mitocondrial es capaz de dirigir la importación de ambos precursores en mitocondrias aisladas y es removida durante la importación. Este evento de procesamiento genera una proteína de 28 kDa del precursor SDH2, la cual corresponde a la subunidad SDH2 presente en mitocondrias de maíz. Además de procesar la presecuencia, el precursor químico sufre un procesamiento proteolítico entre SDH2(t) y RPS14. Este procesamiento genera RPS14, la cual se encuentra ensamblada en ribosomas mitocondriales, y una proteína SDH2(t) que es degradada.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el dominio SDH2(t) en el precursor químico sólo tiene el papel de proveer la función de destinación mitocondrial para RPS14.

Financiado por FONDECYT Complementario 8980005, de Doctorado 2970071, y ECOS-CONICYT C98B01.

IV - 5 IDENTIFICACION DE UNA FOSFATASA DE PROTEINAS DE LA FAMILIA PP2A EN *Solanum tuberosum* L. (Identification of a protein phosphatase 2A in *Solanum tuberosum* L). Raíces, M., Chico, J.M., Muñoz, M.J. y Téllez-Iñón, MT. INGEI-CONICET y FCEyN-UBA. Vuelta de Obligado 2490 2do (1428) Buenos Aires, Argentina.

En plantas, los procesos de desarrollo dependen de señales del medio ambiente. La fosforilación de proteínas es un mecanismo central que interviene en la regulación de numerosas rutas metabólicas, incluyendo la respuesta a estímulos externos y la expresión de genes específicos. La tuberización de la planta de papa es un complejo proceso en el cual a partir de un tallo subterráneo, el estolón, se forma un órgano de reserva, el tubérculo. Dicho proceso se dispara en respuesta a diversas señales ambientales tales como el fotoperíodo, la temperatura y la cantidad de nutrientes. Numerosos genes involucrados en el desarrollo del tubérculo son inducidos durante la tuberización. En nuestro laboratorio se caracterizó una actividad de quinasa de proteínas dependiente de calcio, CDPK, en plantas de papa. La expresión y actividad de la misma aumenta al inicio de la tuberización.

En este trabajo se observó la presencia de proteína(s) fosfatasa(s) sensibles a okadaico que defosforilan específicamente sustratos de CDPK. Al igual que la CDPK, la actividad de fosfatasa(s) aumenta en forma transitoria al inicio del proceso de formación del tubérculo.

A partir de una biblioteca de expresión de estolones se aisló el gen completo que codifica para una fosfatasa de serina y treonina de la familia de las PP2A, que se expresa diferencialmente al inicio de la tuberización. Los miembros de esta familia son sensibles al ácido okadaico, lo que sugiere una posible relación entre el gen identificado y los datos bioquímicos previos.

Subsidiado por CONICET y UBA.

IV - 6 ROL PROTECTOR DE LAS POLIAMINAS EN DISCOS DE HOJA DE GIRASOL SOMETIDOS A ESTRES POR METALES PESADOS. (Protective role of polyamines in sunflower leaf discs under heavy metal stress). Groppa, M.D.; Tomaro, M.L. and Benavides, M.P.. Cátedra de Química Biológica Vegetal, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. E-mail: mgroppa@ffyb.uba.ar.

En este trabajo se estudiaron las propiedades antioxidantes de las poliaminas en discos de hoja de girasol bajo estrés oxidativo inducido por cadmio y cobre. Dicho daño se evidenció por un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución del contenido de glutatión total y de las actividades de ascorbato peroxidasa (APOX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). La concentración de poliaminas fue afectada de diferente manera según el metal usado. La putrescina fue reducida 48% por Cd²⁺ y 61% por Cu²⁺, la espermidina disminuyó al 21% y 59% del control en los tratamientos con Cd²⁺ y Cu²⁺ respectivamente y la espermina no fue modificada. El tratamiento con agregado exógeno de poliaminas (1 mM) mostró distintos resultados según la poliamina usada y el parámetro estudiado. La espermina revirtió el efecto del Cd²⁺ y Cu²⁺ sobre la peroxidación lipídica casi a los valores controles. Sin embargo, ni la espermina, ni la espermidina pudieron revertir la disminución del glutatión y de la APOX. Además, ambas poliaminas por sí mismas disminuyeron estos parámetros. Tanto la espermina como la espermidina revirtieron completamente la actividad de GR, pero sólo la espermina revirtió la actividad de SOD reducida por cobre. Este trabajo sugiere que las poliaminas están relacionadas con la protección contra el estrés oxidativo inducido por metales.

IV - 7 NATURALEZA DE LA INSENSIBILIDAD AL ABA EN GENOTIPOS DE SORGO CON SUSCEPTIBILIDAD CONTRASTANTE AL BROTAJO PRECOSECHA. (Nature of insensitivity to ABA in sorghum genotypes with contrasting preharvest sprouting behaviour). Carrari, E.¹, Pérez-Flores, L.², Osuna-Fernández, R.^{3,4}, Enciso, S.⁴, Sánchez, R.⁴, Benesh-Arnold, R.⁴ y Iusem, N.¹. ¹FCEyN UBA Argentina, ²UAM-Iztapalapa, ³Facultad de Ciencias, UNAM, México. ⁴IFEVA UBA, Argentina.

El brotado precosecha (BPC) en sorgo está relacionado con la acción del ácido abscísico (ABA) durante el desarrollo de las semillas. Esta hormona presenta valores elevados antes de la madurez, disminuyendo posteriormente. El contenido de ABA durante la embriogénesis no difiere entre las variedades IS9530 (resistente) y RedLandB2 (susceptible al BPC). Sin embargo, los embriones de RedLand B2 pierden sensibilidad al ABA desde etapas tempranas. Para investigar la naturaleza de esta insensibilidad, se determinaron los niveles de ABA en embriones embebidos y en el medio de incubación. Paralelamente se analizaron los niveles de mRNA del gen *rab17* que se expresa durante la embriogénesis tardía en respuesta a ABA. La movilización de esta hormona durante la imbibición fue similar en ambas líneas, con una marcada salida al medio durante las dos primeras horas, sin embargo la proporción de ABA en el medio fue mayor en RedLandB2 respecto a IS9530. El gen *rab17* solo respondió a ABA en la línea IS9530, lo cual se correlaciona con la diferente respuesta germinativa entre las variedades.

*Se agradece a la Dra. M. Pagés por proporcionar la sonda utilizada en este trabajo.

IV - 8 BASES MOLECULARES DE LA TRANSFERENCIA DE LUZ EN LA R-FICOERITRINA DE *Gracilaria chilensis* (Molecular basis of light transfer in R- Phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*) Martínez-Oyanedel, J., Contreras-Martel, C., Bruna, C. y Bunster, M. Laboratorio de Biofísica Molecular, Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biológicas, Universidad de Concepción. jmartine@udec.cl

La R-ficoeritrina (R-PE), es una de las proteínas que componen el Ficobilisoma, complejo encargado de captar y transferir la luz, para la fotosíntesis, en algas. Se ha resuelto la estructura cristalina de la R-ficoeritrina de *Gracilaria chilensis* por difracción de rayos-X, a 2.2 Å de resolución, utilizando radiación sincrotrónica.

La estructura permitió localizar los cromóforos presentes: 2 ficoeritrobilinas (PEB) en la subunidad alfa y dos ficoeritrobilinas y una ficourobilina (PUB) en la subunidad beta. Los cromóforos presentan residuos Asp y Arg vecinos, que le ayudan a mantener la orientación.

Dentro de un trimero de R-PE, $\beta 50/61$ PUB están a distancias de acoplamiento con $\alpha 82$, $\beta 82$ y $\beta 158$ y podrían realizar la transferencia desde el exterior al interior de la molécula. $\beta 50/61$ PUB y $\alpha 139$ captaría la energía y $\alpha 82$ PEB podría constituir un puente que la transfiere a $\beta 82$ PEB.

Dentro del hexámero se presentan otras 3 distancias de acoplamiento menores que 30 Å, sugiriendo una posible vía de transferencia de energía entre los trimeros, en la cara interna de la molécula, donde jugaría un papel importante el péptido de unión γ .

Además de las distancias de acoplamiento de 19 a 45 Å entre los cromóforos que sugieren una vía de transferencia de energía, la estructura permite sugerir otras vías y una especialización en la función de los cromóforos.

Financiamiento Proyecto : 99.031.084-1.0 DIUC

V - EXPRESION GENICA Y TRANSDUCCION DE SEÑALES

V - 1 SINTESIS DE FOSFOINOSITIDOS EN CELULAS NIH 3T3. REGULACION POR EL GEN DE EXPRESION TEMPRANA *c-fos* (Phosphoinositide synthesis in NIH 3T3 cells. Regulation by the Immediate Early Gene *c-fos*) Renner, M.L.; Borioli, G.; Bussolino, D.; Guido, M y Caputto, B.L. CIQUIBIC (CONICET) - Depto. Qca. Biol. Fac. Cs. Químicas, UN Córdoba - mrenner@dqbfq.fcq.unc.edu.ar Financiado por FONCyT, CONICET, CONICOR, SECyT - UNC, FOMEC.

Hemos encontrado que c-Fos, además de ser factor de transcripción, regula la biosíntesis de fosfolípidos en el citoplasma. En fibroblastos quiescentes estimulados a reingresar al ciclo celular, c-Fos media dos ondas de activación de la síntesis de fosfolípidos. La primera onda es máxima a los 7.5 minutos volviendo a valores control a los 15 minutos. La segunda comienza a los 30 minutos y permanece elevada a los 120 minutos. Ambas son precedidas por ondas semejantes de expresión de *c-fos* mRNA y muestran cambios comparables en la proteína c-Fos. En la primera onda, c-Fos está asociada a membranas del retículo endoplásmico marcándose fundamentalmente los fosfoinosítidos. En la segunda onda se marcan principalmente los fosfolípidos involucrados en la génesis de membrana (PC, PA, PE). En células sin estimular, PIP_2 es el fosfoinosítido más marcado pero a medida que aumenta el tiempo de estimulación (hasta 10 minutos) la marca de PIP_2 disminuye, mientras que PIP aumenta. Esta disminución en PIP_2 probablemente refleja su utilización para generar DAG y IP_3 . No se observan estas diferencias en presencia de un oligonucleótido antisentido para c-Fos mRNA. En experimentos de marcación in vitro, c-Fos exógeno aumenta la marcación de PI y PIP, indicando un efecto directo de esta proteína sobre la biosíntesis de fosfoinosítidos.

V - 2 C-FOS SE ASOCIA AL RETICULO ENDOPLASMICO Y ACTIVA EL METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS (c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism). Gil GA., Bussolino DF, Borioli G, Diema CD, Guido ME y Caputto BL-CIQUIBIC, CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC germang@dqbfq.fcq.unc.edu.ar

La marcación con ^{32}P de fosfolípidos en cultivos de células NIH y PC12 quiescentes, estimuladas a reingresar a ciclo celular incrementa respecto a células no estimuladas. Este incremento depende de la transcripción y traducción del gen de expresión temprana *c-fos*: mostrando dos picos de estimulación, uno a los 5 minutos y otro a 60 minutos. Empleando inmunocitoquímica y western blot, c-Fos muestra un patrón de expresión que se asemeja a los fosfolípidos. Un oligonucleótido antisentido al mRNA de *c-fos* impide la activación de la síntesis de fosfolípidos mientras que la inhibición de la degradación de c-Fos por calpastatin exagera esta activación. En células NIH estimuladas en cultivo y marcadas in vitro con ^{32}P -ATP los fosfolípidos incrementan respecto a las sin estimular en forma semejante a las células NIH en cultivo y las diferencias observadas depende de proteínas asociadas a membranas. Por fraccionamiento subcelular y western blot, c-Fos co-distribuye con membranas del retículo endoplásmico mientras que en presencia de KCl IM ésta se encuentra en la fracción soluble del gradiente. c-Fos recombinante agregado a homogenatos de células NIH sin estimular, incrementa la síntesis de fosfolípidos con un máximo de activación a 300 ng de c-Fos/100 μg de proteína celular. Esta actividad regulatoria de c-Fos sobre la síntesis de fosfolípidos es citoplasmática e independiente de su actividad nuclear como factor de transcripción.

Financiado por FONCyT, CONICET, CONICOR, SECyT y CEDIQUFA

V - 3 UN NUEVO SISTEMA DE REGULACION DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ACIDO ARAQUIDONICO CONTROLADO HORMONALMENTE. (A new pathway to control intracellular levels of arachidonic acid hormonally regulated). Mele P.G., Maloberti P., Bey P., Cano F. y Podestà E.J. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, Argentina.

Estudios realizados en nuestro laboratorio caracterizaron molecularmente a una fosfoproteína (ARTIST), con actividad de acil-CoA tioesterasa, intermediaria en la liberación de ácido araquidónico (AA). Esta proteína está presente en todos los tejidos esteroidogénicos y su expresión es regulada por hormonas. ARTIST expresada en *E. coli* es capaz de liberar AA utilizando como sustrato araquidonil-CoA. Esta proteína también se encuentra en corazón y en hígado, siendo regulada por isoproterenol y ayuno respectivamente. En concordancia con estos hallazgos se ha descrito la existencia de una acil-CoA sintetasa (ACS4), específica para AA, que se expresa preferentemente en tejidos esteroidogénicos, así como en otros tejidos. Utilizando un inhibidor específico de esta enzima, triacsin C, se observó una disminución significativa dosis dependiente en los niveles de esteroides sintetizados por estimulación con ACTH en células Y1 (triacsin C 0; 0,5; 1 y 5 μ M respectivamente: 153 ± 11 , 129 ± 19 , 106 ± 6 , 109 ± 9 ng de esteroides/ml). En estos mismos tejidos se encuentra una tercera proteína, ligadora de acil-CoA, DBI (diazepam binding inhibitor) que tiene su receptor, PBR, en la mitocondria. La misma también es regulada hormonalmente. Dado que ARTIST también esta localizada en la mitocondria sugerimos que la liberación de AA en tejidos esteroidogénicos estaría regulada por la presencia de tres proteínas ACS4, DBI, y ARTIST todas ellas controladas hormonalmente.

V - 4 ACTIVACION DE LAS PROTEINAS KINASAS DEL ESTRES POR IGF-1 Y SORBITOL EN CULTIVOS DE CARDIOMIOCITOS (Stress protein kinase activation by IGF-1 and sorbitol in cultured rat cardiac myocytes). Ocaranza P., Gonzalez-Jara F., Lavandero S. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las proteínas kinasas activadas por estrés (SAPKs), JNK y p38-MAPK, son reguladas por estímulos mecánicos y químicos en el cardiomiocito. En este trabajo se investigaron los efectos del factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1) y de la hiperosmolaridad sobre las SAPKs.

Los cursos temporales de activación de JNKs y p38-MAPK se determinaron en cultivos de cardiomiocitos expuestos a sorbitol (0,3M) y/o IGF-1 (100 nM), a través de la fosforilación de sustratos específicos y de la razón SAPK fosforilada/SAPK total. Los resultados demostraron que IGF-1 y sorbitol aumentaron 1 y 19 veces la actividad de JNK a los 15 y 30 min, respectivamente. La fosforilación de las dos isoformas de JNK (46 y 54 kDa) mostró un comportamiento similar entre sí y comparable al de su actividad. IGF-1 y sorbitol estimularon en un 100% la actividad de p38-MAPK a los 5 y 15 min, respectivamente. La cinética de fosforilación de p38-MAPK fue similar al de su actividad. La estimulación de JNK dependiente de sorbitol fue potenciada por IGF-1 pero no hubo efecto sobre p38-MAPK. Se concluye que la hiperosmolaridad activa potente y preferencialmente a las JNKs y levemente a p38-MAPK e IGF-1 es un débil activador de las SAPKs en el cardiomiocito.

Fondecyt 1980908

V - 5 PARTICIPACION DE LA ALDOSA REDUCTASA EN LA ACCION ANTIAPOPTOTICA DEL IGF-I (Role of aldose reductase on IGF-I antiapoptotic action) Gálvez A., Ulloa JA, Lavandero S. Dpto Bioquímica y Biol Molecular. Fac de Cs Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

El factor de crecimiento análogo a insulina tipo 1 (IGF-I) previene la apoptosis del cardiomiocito, independiente del estímulo. Los cardiomiocitos expuestos a altas concentraciones de soluto aumentan la actividad Aldosa Reductasa (AR), sintetizando sorbitol, para equilibrar la osmolaridad intracelular y proteger las células. Se postula que los cardiomiocitos expuestos a hiperosmolaridad experimentan apoptosis y que IGF-I la previene por aumento en la expresión de AR.

Para resolver esto, se utilizaron cultivos primarios de cardiomiocitos neonatos de rata, expuestos a diferentes concentraciones de glucosa o sorbitol (25-300 mM). La apoptosis se evaluó por fragmentación del DNA y degradación de la proteína antiapoptótica Bcl X_L. La acción del IGF-I (100nM) sobre los niveles de AR se evaluó por westernblot.

Los resultados mostraron que la hiperosmolaridad indujo un aumento en la fragmentación del DNA (300%), y una disminución de 60% en los niveles de Bcl X_L (respecto al control). El IGF-I disminuyó la fragmentación del DNA y aumentó la Bcl X_L en un 50%, comparados con el máximo efecto apoptótico. Además, el IGF-I aumentó al doble la masa de la AR, comparado con el aumento máximo en la condición hiperosmótica.

Se concluye, que la hiperosmolaridad induce apoptosis en el cardiomiocito, y que el IGF-I previene la apoptosis por un aumento en los niveles de AR.

Proyecto Fondecyt 1980908

V - 6 LAS QUINASAS DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G (GRKS) 2 Y 3 SON RESPONSABLES DE LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR A HISTAMINA H2. (GRK2 and 3 are involved in H₂ receptor desensitization). Shayo, C.*, Fernández, N.[†], Lemos, B.[‡], Monczor, F., Mladovan*, A., Baldi*, A. y Davio, C. FCEyN, UBA*, IByME, CONICET*, FFyB, UBA[†].

El receptor H2 (RH2), al unirse a su agonista, activa a una proteína G, con el consecuente aumento de la actividad de la adenilato ciclasa. Al igual que otros receptores, se desensibiliza luego de una exposición sostenida al agonista. En el presente trabajo se estudió el mecanismo responsable de dicho proceso. Utilizando células COS-7 transfectadas transientemente con el RH2 estudiamos la desensibilización inducida por amthamina. El receptor se desensibilizó rápidamente con un t_{1/2} de 0.49 min. Dada la rapidez de este proceso postulamos a la fosforilación como mecanismo responsable. Inhibidores de proteína quinasa A y C no modificaron la desensibilización, mientras que el Zn²⁺ (un inhibidor de GRKs) inhibió este proceso. Experimentos de cotransfección con el RH2 y las distintas GRKs (2, 3, 5 o 6) mostraron que GRK 2 y 3 disminuyeron significativamente la respuesta a amthamina y el t_{1/2} de desensibilización. Este evento se correlacionó con un aumento en la fosforilación del receptor H2, dependiente de GRK 2 y 3, mientras que la fosforilación dependiente de PKA y PKC no participó. Los resultados sugieren que la desensibilización del RH2 en células COS-7 es mediada por GRK 2 y GRK 3.

V - 7 EXPRESION DEL GEN DE OSTEOCALCINA: INFLUENCIA DEL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL SOBRE SU REGION PROMOTORA. (Expression of osteocalcin gene: influence of the nucleosomal positioning on the promoter region). Gutiérrez, J., Imschenetzky, M., Montecino, M. Dpto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La activación transcripcional del gen de osteocalcina (OC) se acompaña de un proceso de remodelación nucleosomal en su región promotora. En este proceso pueden participar múltiples elementos, unos responsables de interacciones proteína-ADN específicas en la región promotora y otros probablemente funcionando como complejos remodeladores de cromatina. Nuestro laboratorio ha demostrado que factores de transcripción de la familia CBFa/AML/PEBP2a pueden unirse a secuencias promotoras de este gen al estar estructuradas como mononucleosomas *in vitro*, aunque sólo cuando existe un cierto grado de flexibilidad traslacional del nucleosoma. Con el objeto de definir esta flexibilidad se determinó las posiciones traslacionales que ocupa la estructuración nucleosomal en distintos segmentos del promotor de OC reconstituidos como mononucleosomas. Además se estudió la influencia que posee el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF sobre la unión del factor CBFa1/AML3 a segmentos del promotor de OC reconstituidos como mononucleosomas. Así mismo se estudió la tendencia natural que pudiera poseer este promotor de acomodar un nucleosoma entre las dos regiones de mayor relevancia para la expresión de este gen. Nuestros resultados definen la importancia que tiene el posicionamiento nucleosomal en el promotor del gen de OC como elemento regulatorio de su expresión.

FONDECYT 2990066 y 1000361

V - 8 METILACION DEL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA DE RATA COMO MECANISMO REGULADOR DE LA TRANSCRIPCION TEJIDO-ESPECIFICA. (Differential methylation of the Osteocalcin promoter as a regulatory mechanism for tissue-specific transcription) Villagra, A., Sierra, J., Imschenetzky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La metilación de ADN constituye un evento asociado a represión transcripcional. En el gen Osteocalcina (OC) de rata, hemos determinado patrones diferenciales de metilación en la región promotora al comparar líneas celulares óseas que expresan o no este gen. También hemos evaluado el patrón de metilación asociado a OC, durante la diferenciación ósea terminal en cultivos de osteoblastos primarios. Encontramos que hipometilación del promotor OC se correlaciona directamente con actividad transcripcional. Así mismo, luego de transfectar células osteoblásticas (ROS17/2.8) con constructos que incluían al promotor OC unido a un gen reportero control o metilado *in vitro* con HpaII y SssI metilasa, encontramos que la metilación producía una significativa disminución en los niveles basales de expresión y una completa inhibición del incremento inducido por vitamina D3.

Al evaluar si la metilación del promotor de OC afectaba la unión específica de factores reguladores de la transcripción, encontramos que YY1 disminuye la capacidad de unirse a su secuencia blanco metilada, en cambio el complejo del receptor para vitamina D3 y Cbfa/AML no son afectados.

Planteamos que la transcripción del gen de OC de rata es dependiente de la metilación de su región promotora y que esta modificación podría mediar la unión de factores de transcripción. FONDECYT 1000361

V-9 INHIBICION DE LA β OXIDACION PEROXISOMAL POR ACIL-CoAs DE DROGAS: ¿UN NUEVO MECANISMO DE ACTIVACION DE PPAR α POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES? (The acyl CoAs of hypolipidemics drugs inhibits the peroxisomal β oxidation: A new mechanism for the PPAR α activation in response to peroxisomal proliferators?) Gatica, A., Bronfman M. Unidad de Bioquímica Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Los proliferadores peroxisomales (PPs) son un grupo de compuestos cancerígenos no genotóxicos que en roedores inducen hipolipidemia, proliferación peroxisomal y hepatocarcinogénesis. Entre los PPs se encuentran drogas hipolipidémicas de uso clínico y contaminantes ambientales tales como pesticidas y herbicidas. Los efectos de los PPs dependen de la activación de un receptor nuclear denominado PPAR α (peroxisomal proliferator activated receptor α) el cual regula el metabolismo lipídico en el hígado y participa en los procesos de proliferación y diferenciación de distintos tipos de células. Si bien todos los PPs activan PPAR α , no todos se unen a él, lo que sugiere que activadores endógenos de PPAR α , tales como ácidos grasos o eicosanoides podrían participar también en la activación del receptor. En estudios anteriores demostramos que, *in vivo*, los PPs son rápidamente metabolizados a los derivados CoA de droga (PP-CoA) los que, si bien no activan PPAR α , podrían alterar el metabolismo lipídico, principalmente el catabolismo peroxisomal de los activadores endógenos de PPAR α .

En este estudio, analizamos el efecto de distintos PP-CoAs sobre la β -oxidación peroxisomal de ácidos grasos en peroxisomas aislados (*in vitro*) y en cultivos primarios de hepatocitos de rata (*ex vivo*), nuestros resultados indican que los PP-CoAs inhiben la β -oxidación peroxisomal *in vitro* y *ex vivo*, lo que sugiere que los PP-CoAs podrían estar implicados en la activación de PPAR α a través de la inhibición del catabolismo de activadores endógenos del receptor. Agradecimientos: Proyectos Fondecyt 2000072 (A.G.); FONDAP 13980001 y Milenio P99-007-F (M.B.)

V - 10 IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA VARIANTE DE PROCESAMIENTO DE DlgA DE Drosophila (Identification and characterization of a novel *Drosophila* DlgA splice variant). C. Mendoza y J. Sierralta (Patrocinio: Cecilia Leyton M.). Programa de Fisiología y Biofísica ICBM. Fac. Medicina. U. de Chile

La familia de proteínas MAGUKs (Membrane-Associated Guanylate Kinases) se caracteriza por la formación de complejos multiproteicos a través de dominios especializados como son los dominios PDZ, tanto en la sinapsis neuronal como en sitios de contacto célula-célula. Estos dominios mantienen la localización de canales, receptores y otras proteínas en áreas especializadas de la célula, asociando componentes de una vía de transducción en particular. Usando doble híbrido en levadura se aisló un cDNA que codifica una nueva proteína con dominios PDZ, que hemos denominado DlgB, que interactúa con INAD, proteína organizadora del complejo de fototransducción en *Drosophila*. Esta nueva proteína posee un dominio idéntico a DlgA y en su extremo N-terminal posee un dominio homólogo a la proteína sináptica de vertebrados SAP97. DlgA (y sus homólogos en humano y ratón) pertenece a la familia de proteínas MAGUK y se le ha asociado con la mantención de la estructura sináptica y en la determinación de la polaridad de células epiteliales. Para determinar la función específica de esta nueva variante se desarrolló un anticuerpo dirigido contra el dominio homólogo a SAP97 de DlgB. Mediante el uso de este anticuerpo en ensayos de Western y en inmunohistoquímica se determinó que DlgB se expresa en embriones, larvas y moscas adultas. Se presenta el patrón de expresión de DlgB y su relación con los patrones de expresión conocidos de DlgA.

(Financiado por Fundación Andes, DID y FONDECYT 1000824)

VI - ENZIMOLOGIA

VI - 1 MULTIPLICIDAD ENZIMATICA Y CARACTERIZACION DE MANGANESO PEROXIDASAS RECOMBINANTES DE *Ceriporiopsis subvermispota* y *Phanerochaete chrysosporium*. (Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases (rMnPs) from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Phanerochaete chrysosporium*). Larrondo¹*, L. F., Stewart², P., Cullen² D., Salas, L., Lobos³ S. y Vicuña¹ R. 1. Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. 2. Department of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison, EE.UU. 3. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, F.C.Q.F., U.Ch.

Los cDNAs que codifican para manganeso peroxidasa de los basidiomicetes *Ceriporiopsis subvermispota* (MnP1) y *Phanerochaete chrysosporium* (H4), fueron expresados bajo el control del promotor de α -amilasa de *Aspergillus oryzae* en *Aspergillus nidulans*. Las proteínas recombinantes (Cs-rMnP1 y rH4) alcanzaron niveles de expresión similares y sus masas moleculares, tanto antes como después de ser desglucosiladas, mostraron ser las mismas que las descritas para las MnPs caracterizadas en las cepas parentales. El análisis por isoelectrofoque (IEF) de rH4 mostró varias isoformas con pIs entre 4,83 y 4,06, una de las cuales coincide con el pI (4,6) descrito para H4 aislada desde *P. chrysosporium*. El IEF de rMnP1 resolvió cuatro isoenzimas con pIs entre 3,45 y 3,15, muy similar al patrón observado para las MnPs aisladas en cultivos en fase sólida de *C. subvermispota*. Se comparó la habilidad de ambas rMnPs para utilizar varios sustratos encontrándose que rH4 podía oxidar o-dianisidina y p-anisidina sin la participación de manganeso agregado externamente, una propiedad que no había sido reportada previamente para esta MnP de *P. chrysosporium*.

Financiado por FONDECYT 2000076 y FONDECYT 8990004 de Líneas Complementarias

* Becario de Fundación Andes.

VI - 2 FOTOENTRECruzAMIENTO DE INTEGRASA DE MOLONEY-MuLV Y SUSTRATOS CON 5-iododesoxiuridina (5-IdU). (Photocrosslinking of Moloney-MuLV Integrase and substrates with 5-Iododesoxyuridine). Pinar, M.B., Vera, J., León, O. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Durante el ciclo de vida de un retrovirus, la integrasa (IN) cataliza la integración concertada del cDNA viral en el DNA de la célula huésped. Esta reacción ocurre en dos etapas: procesamiento-3' del DNA viral y su transesterificación al DNA blanco. *In vitro*, IN también cataliza la reacción inversa, denominada desintegración. Las integrasas se componen de un dominio amino-terminal (HHCC), una región central (core catalítico) y un dominio C-terminal, cuyas funciones no han sido definidas en detalle. Para obtener información de las regiones de IN de M-MuLV que interaccionan con posiciones específicas del DNA viral o el DNA blanco, hemos realizado experimentos de fotoentrecruzamiento con sustratos que contienen 5-IdU en el extremo del DNA viral. Al irradiar los complejos IN-DNA a 312 nm, se obtienen aductos con un PM estimado que corresponde a una razón enzima-sustrato de 1:1. La digestión de estos complejos con nucleasa S1 permitió determinar que la reacción es específica para 5-IdU. Asimismo el uso de mutantes permitió determinar que el sitio de entrecruzamiento se encuentra en la región comprendida entre el dominio catalítico y C-terminal de la enzima.

Este trabajo es financiado por Proyectos FONDECYT N°s 1980982 y 2000143.

VI - 3 ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL tRNA CON LA TIROSIL-tRNA SINTETASA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (Study of the interaction between tRNA and tyrosyl-tRNA synthetase from *A. ferrooxidans*). Salazar, J.C., Lefmíl, C. Zúñiga, R. y Orellana, O. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

Las aminoacil-tRNA sintetetas catalizan la unión del aminoácido en el tRNA correspondiente, evento crucial en la síntesis de proteínas. En nuestro laboratorio se identificó el gen que codifica para la tirosil-tRNA sintetasa (TyrRZ) de *A. ferrooxidans*. Mediante análisis filogenético y estructural hemos propuesto la existencia, en bacterias, de dos familias de tirosil-tRNA sintetetas (TyrRS y TyrRZ). Estas enzimas presentan un 25% de identidad aminoacídica. Este polimorfismo en secuencia de aminoácidos puede ser una herramienta para estudiar la relación estructural-función en estas proteínas.

En este trabajo, se estudió mediante mutagénesis sitio dirigida del gen *tyrZ* y análisis funcional de las proteínas mutadas, la interacción de la TyrRZ con el tRNA. Por reemplazo de aminoácidos conservados de función conocida se demostró que TyrRS y TyrRZ son funcionalmente equivalentes. Este estudio se extendió a los aminoácidos conservados His306, Ser356 y Asp155 (en TyrRZ) cuya función era desconocida. Estudios cinéticos de la mutante His306Ala indicaron que esta enzima presenta parámetros similares a la silvestre, sin embargo la cantidad de enzima activa es un 10% del total. Estudios de interacciones entre sustratos y de estabilidad de intermediarios de la reacción sugieren que esta mutación provocaría un cambio estructural en la enzima. Mediante análisis cinético de la mutante Ser356Ala, comprobamos que este aminoácido participa en la interacción de la enzima con el tRNA. Se está estudiando la posible participación del aminoácido Asp155 en la discriminación de los tRNAs.

Financiado por Fondecyt (2990034, 1981053) y U. de Chile.

VI - 4 ESTUDIOS CINETICOS Y MARCACION POR AFINIDAD DE DOS ISOAPIRASAS. (Kinetic studies and affinity labeling of isoapirases). Espinosa V., Kettlun AM, Valenzuela MA. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La ATPdifosfohidrolasa o apirasa hidroliza nucleótidos di- y trifosforilados en presencia de Me^{2+} liberando ortofosfato. Se ha demostrado en apirases provenientes de *Solanum tuberosum* que el cociente de actividades hidrolíticas ATPásica/ADPásica depende de la variedad de papa usada como fuente de enzima.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) estudiar la especificidad de dos isoapirases homogéneas midiendo su actividad hidrolítica sobre desoxirribonucleótidos y análogos fluorescentes de ATP y ADP; b) buscar un marcador por afinidad para modificar covalentemente el sitio de unión de nucleótido. Las enzimas usadas fueron Pimpinel (cociente ATPasa/ADPasa 10) y Desirée (cociente 1).

Ambas isoapirases fueron muy inespecíficas hidrolizando dATP, dGTP, dTTP y dCTP, al igual que diversos análogos fluorescentes a los que se les determinó los parámetros cinéticos y las K_d por medio de fluorescencia intrínseca. El cociente de hidrólisis sobre los derivados trifosforilados fue siempre mayor en la enzima Pimpinel. Respecto a los posibles marcadores de afinidad se usó: azido derivados de ATP y ADP (sustratos de ambas isoapirases), pero los nitrenos formados por irradiación no fueron inactivadores. Tampoco FSBA (fluorosulfonilbenzoil adenosina), análogo descrito que inactiva a diversas apirases de origen animal, ni los análogos de piridoxal que formarían una base de Schiff, PLP-AMP y PLP-ADP en el sitio activo, inactivaron a las isoapirases. Financiado por proyecto Fondecyt 2970041

VI - 5 FUNCION DE Arg336 Y Arg70 EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*. (Role of Arg336 and Arg70 in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Llanos, L., Flores, M., Briones, R., Yévenes, A., *Frey, P. A., y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, y *Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) cataliza la reacción de descarboxilación y fosforilación de oxaloacetato en presencia de ATP y Mn^{2+} , formándose fosfoenolpiruvato, ADP y CO_2 . En el sitio activo de la PEPCK de levadura existen varios residuos conservados, entre ellos Arg70 y Arg336, que según datos cristalográficos obtenidos de la PEPCK de *Escherichia coli*, interaccionarían con los sustratos aniónicos, estabilizando sus cargas negativas. Para dilucidar la función de dichas argininas, se obtuvieron los siguientes mutantes: Arg336Lis, Arg336Gln, Arg70Lis y Arg70Gln. EL análisis cinético indicó que la Arg336 tiene un rol catalítico, donde la carga positiva de su grupo guanidinio es importante. Sin embargo, la posible función de la Arg70 no está relacionada con la carga positiva. La reacción principal catalizada por la PEPCK se puede separar en dos actividades secundarias: actividad tipo piruvato quinasa y oxaloacetato descarboxilasa. El análisis de estas reacciones indicó que las mutaciones aumentan la actividad descarboxilasa. Particularmente en la mutante Arg336Lis aparece la capacidad de catalizar el intercambio isotópico entre D_2O y piruvato.

Financiado por DICYT-USACH 029941CU y FONDECYT 1970670/1000756.

VI - 6 MODELAMIENTO POR HOMOLOGIA DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. (Homology modelling of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Yévenes, A., González-Nilo, F. y Cardemil, E. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato en presencia de ATP. Estas enzimas se encuentran agrupadas en una familia las cuales presentan secuencias altamente conservadas, lo que hace posible la construcción de un modelo por homología. Como estructura de referencia se utilizó los datos cristalográficos de la enzima de *Escherichia coli* en presencia de sustrato, piruvato (PIR) y ATP (PDB: 1AQ2). El alineamiento de secuencia presentó un 67 % de identidad y un 85 % de similitud. El modelo obtenido fue estabilizado por múltiples minimizaciones en las zonas de mayor conflicto estructural y validado por PROCHECK (Factor G=0,78). La estructura estabilizada del modelo fue modificada para obtener fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP como sustratos. Para ello los enlaces del PIR y ATP fueron reorganizados para formar PEP y ADP. Este sistema fue estabilizado usando minimización y una dinámica molecular de 100 ps a una zona restringida de 15 Å entorno al fósforo del PEP. Como producto del modelamiento se obtuvo la estructura de la PEPCK de *A. succiniciproducens* con PEP y ADP. Al comparar ambas estructuras no se observan cambios notorios en la posición de los carbonos α y puede visualizarse interacciones precisas entre estos sustratos y la proteína.

Financiado por DICYT-USACH 029941CU y FONDECYT 1000756.

VI - 7 PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LAS MUTANTES FLUORESCENTES F219W Y F232W DE LA FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑON DE CERDO. (Preparation and characterization of the fluorescence mutants of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase). Asenjo, J.L., Yañez, A.J., Ludwig, H.C., Droppelmann, C.A. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La enzima fructosa 1,6-bisfosfatasa de vertebrados es una proteína homotetramérica cuya actividad es regulada por AMP y fructosa 2,6-bisfosfato (Fru-2,6- P_2). En el tetramero nativo cada subunidad tiene contacto con otras dos subunidades a través de dos interfases; la interfase C1-C2 que contiene el sitio de unión para el sustrato y el inhibidor competitivo Fru-2,6- P_2 , y la interfase C1-C4 que contiene el sitio de unión para AMP.

Con el objeto de estudiar la interacción de la enzima con sus efectores, hemos introducido por mutagénesis sitio dirigida el residuo fluorescente triptófano en la interfase C1-C2, generando las mutantes que poseen un solo residuo triptófano F219W y F232W. Las proteínas fueron expresadas en *E. Coli* usando el vector de expresión *pET 15b* y purificadas a homogeneidad en presencia de polietilenglicol. Las mutantes exhiben valores de k_{cat} , K_m , K_i (Mg^{2+}), I_{50} (AMP) y I_{50} (Fru-2,6- P_2) similares a la enzima de tipo salvaje, sugiriendo que estas mutaciones no alteran la estructura de la enzima. La mutante F219W presenta un máximo de emisión de fluorescencia a 336nm y la mutante F232W a 352nm, lo que indica que los triptófanos se encuentran en microambientes de diferente polaridad. Cambios en la intensidad de emisión y el grado de exposición de los residuos de triptófano fueron usados para estudiar los cambios conformacionales inducidos por la unión de ligandos a la proteína.

FONDECYT 1981001 y DID-UACH 199901).

VI - 8 MECANISMO DE DESNATURACION Y RENATURACION *in vitro* DEL HETERODIMERO DE α - Y β -TUBULINA. *In vitro* mechanism of denaturation and renaturation of α - and β -tubulin heterodimer. *Brunet, J., López, M., Lagos, R. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. *Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

El mecanismo de plegamiento del heterodímero de α - y β -tubulina, de peso molecular 110.000, es desconocido. Para determinar la correlación entre la disociación del heterodímero y la pérdida de estructura inducida por hidroclorehidrato de guanidina (GdmCl) se midió su fluorescencia intrínseca estacionaria y resuelta en el tiempo al excitar a 295 nm. La polarización de fluorescencia estacionaria, en ausencia y en presencia de GdmCl 5 M fue de 0,280 y 0,140, respectivamente. La polarización dinámica analizada en base a dos rotoreos mostró que el rotor mas pequeño con un tiempo de correlación rotacional (τ_c) entre 0,12 y 0,21 ns no es afectado durante la desnaturación, a diferencia del rotor mayor que corresponde al dímero y que presenta un valor de τ_c de 46, ns, similar al que se obtiene teóricamente (45,5 ns a 20 °C) para una proteína globular de idéntico peso molecular. Al aumentar la concentración de GdmCl τ_c permanece prácticamente constante hasta 1,25 M y luego decae a valores de 26 a 22 ns compatibles con un monomero. Por sobre 2 M su valor cae a 4,4 ns típico de una proteína desnaturada. Se concluye que alrededor de una concentración de GdmCl 1 M el dímero se disocia y por sobre 2 M pierde su estructura secundaria.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1981098

VI – 9 MODELAJE MOLECULAR Y MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA DE AGMATINASA DE *ESCHERICHIA COLI* (Homology modelling and site-directed mutagenesis of *Escherichia coli* agmatinase) Salas, M*, Rodríguez, R., Herrera, P., Carvajal, N*. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción; * CIGB, La Habana, Cuba.

A la arginasa y la agmatinasa se las incluye en una misma familia, considerando las reacciones catalizadas, la estructura de sus sustratos y los residuos conservados en sus secuencias. Se ha resuelto la estructura de dos arginasas, asignándose funciones específicas a algunos residuos conservados. Al no disponer de datos cristalográficos para agmatinasa, mediante modelaje molecular obtuvimos un modelo estructural que muestra las mayores diferencias con la arginasa en un *loop* que incluye los residuos C159, Y155 y F161, y que se relaciona con una región de la arginasa involucrada en la unión del sustrato. Para analizar las bases estructurales de la especificidad de arginasa y agmatinasa, estamos estudiando esta región, y aquí describimos el reemplazo de los mencionados residuos por los correspondientes en la secuencia de la arginasa de *B. caldovelox*. Las mutantes simples C159S, Y155N y F161N, así como las mutantes dobles C159S/Y155N y C159S/F161N resultaron ser activas, mientras que la mutante triple C159S/Y155N/F161N fue totalmente inactiva. Ninguna de las especies mostró actividad con arginina. Los resultados obtenidos, incluidas las propiedades cinéticas de las mutantes, validan la importancia del mencionado *loop* para la actividad catalítica de la agmatinasa. Concluimos que la menor extensión del *loop* en la agmatinasa impediría la unión de la arginina.

FONDECYT 2990049

VI – 10 MODELAMIENTOS MOLECULARES DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* (Molecular modeling of phosphofructokinase-2 from *E. coli*). Cabrera, R., Babul, J. y Guixé, V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En *E. coli* la fosforilación de fructosa-6-P dependiente de MgATP es catalizada por dos isoenzimas que pertenecen a familias filogenéticamente distintas: Pfk-1, de estructura conocida, que pertenece a la familia PfkA y Pfk-2, de estructura aún no resuelta, que pertenece a la familia PfkB. Actualmente se dispone de tres estructuras cristalográficas de enzimas pertenecientes a la familia PfkB, las que se utilizaron para el modelamiento de Pfk-2. Pfk-2 se modeló a partir de un alineamiento que integra información estadística y estructural por el método de satisfacción de restricciones espaciales, usando el programa Modeller-5 y evaluado por análisis energético de la estructura con los programas ProsaII y Verify3D. Para obtener el modelo del complejo ternario Pfk-2/ATP/fructosa-6-P, se reemplazaron los sustratos, ribosa y ADP, en la riboquinasa (estructura templado más cercana, ~30% de similitud) por fructosa-6-P y ATP y se acomodaron en la estructura por dinámica molecular y minimización de energía. La estructura global revela un plegamiento distinto al de Pfk-1, y la presencia de aminoácidos análogos, como D117 en Pfk-1 (residuo catalítico) y D256 en Pfk-2, que cumplirían la misma función. La región de mayor confianza estadística en el alineamiento y, por lo tanto, en la estructura, corresponde al sitio de unión de ATP, el que representa un motivo de unión cuyo plegamiento es distintivo de esta familia de quinasas de azúcares. (Financiado por Proyecto Fondecyt 1981091).

VII - BIOLOGIA VEGETAL I

VII – 1 EVALUACION DE LA PARTICIPACION DE CK2 Y NPR1 EN LA ACTIVACION TEMPRANA DE GENES INDUCIDA POR ACIDO SALICILICO (Evaluation of CK2 and NPR1 participation in the early activation of genes by salicylic acid. Hidalgo P., Salinas P., Bantignies B., Uquillas C., y Holuigue L. Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

En nuestro grupo estudiamos el mecanismo por el cual el ácido salicílico (AS) y otras hormonas vegetales activan la transcripción de genes tempranos, como genes *GST* que codifican para glutatión *S*-transferasas. La expresión de estos genes está controlada por secuencias *as-1* que responden a AS y auxinas. Esta secuencia *as-1* se ha encontrado en promotores de genes *PR* (pathogenesis-related), activados tardíamente por AS y existen mutantes de una proteína (NPR1) en las que se afecta la expresión de estos genes. En este trabajo se evalúa la participación de la proteína quinasa CK2 y de la proteína NPR1 en la vía de transducción que lleva a la activación de genes tempranos por AS. La participación de una CK2 nuclear en esta vía fue evaluada en experimentos de inhibición *in vivo* de la transcripción de genes tempranos y de la unión de proteínas nucleares a *as-1*. Los resultados indican que la inhibición de CK2 provoca inhibición de estos procesos. Además, el tratamiento de plantas con AS produce un aumento de la actividad CK2 nuclear, caracterizada por el uso de sustratos e inhibidores específicos. La participación de la proteína NPR1 se evaluó utilizando plantas mutantes *npr1* de *Arabidopsis thaliana*. Al tratar estas plantas con SA y auxinas (2,4-D) se activa la transcripción del gen *gst6*, igual como ocurre en plantas silvestres. Esto indicaría que SA activa los genes *PR* por una vía distinta a la que comparte con auxinas para activar los genes *GST*. Financiado por Proyectos Fondecyt en Líneas Complementarias 8980005 y de Doctorado 2980027.

VII – 2 FOSFATASA ACIDA EXTRACELULAR EN CELULAS DESPRENDIDAS DE COFIAS DE PROSOPIS CHILENSIS EN RESPUESTA A ESTRES SALINO. (Extracellular acid phosphatase activity in detached root cap cells of *Prosopis chilensis* under saline stress). Muñoz, G. E. y Rojas, C. Laboratorio de Biología Molecular en Plantas, Instituto de Biología, Universidad Católica de Valparaíso.

La fosfatasa ácida liberada por raíces en crecimiento se ha definido como un marcador de tolerancia a condiciones de estrés. La salinidad es un factor de estrés que afecta negativamente el crecimiento de las plantas, siendo las especies del género *Prosopis* reconocidas por su adaptación a ambientes adversos. La cofia en el extremo radicular clásicamente se ha relacionado con funciones de protección. Evidencias actuales indicarían que éstas representan elementos estructurales y funcionales distintivos, aún después de haber sido desprendidas de cofias por raíces en crecimiento. En el presente estudio se utilizan plántulas de *P. chilensis* de 6 días de germinación obtenidas en cultivo hidropónico y en condiciones crecientes de salinidad. En células desprendidas de cofias se analiza la actividad enzimática de fosfatasa ácida extracelular y su localización ultraestructural mediante análisis citoquímicos. Los resultados muestran que las células desprendidas de cofias tienen actividad enzimática y que esta aumenta a medida que se incrementa la concentración de sal del medio. Experimentos control, utilizando raíces de plántulas intactas también muestran una mayor actividad en respuesta a la salinidad. La microscopía electrónica indica la existencia de fosfatasa ácida en células liberadas de cofias. Estos resultados demuestran que células desprendidas de cofias son viables y que a través de la medición de fosfatasa ácida extracelular podrían ser utilizadas como marcadores tempranos de tolerancia a la salinidad.

VII - 3 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA 2-Cys PEROXIRREDOXINA DE HOJAS DE COLZA (*Brassica napus*). (Purification and characterization of 2-Cys peroxiredoxin from rapeseed leaves). D'Alessio, A.C., Caporaletti, D., Duek, P.D., Rodriguez-Suarez, R.J. y Wolosiuk, R.A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas (F.C.E.N. - U.B.A.), Buenos Aires, Argentina. [rwolo@iib.uba.ar]

Las peroxirredoxinas constituyen una familia ubicua de peroxidasas. En las plantas superiores, la subfamilia de las 2-Cys peroxirredoxinas [2-Cys Prx] es codificada por el DNA nuclear, sintetizada en el citoplasma e incorporada a los cloroplastos luego de la escisión del péptido señal. La estructura primaria del precursor fue deducida del cDNA pero la inexistencia de una forma nativa hacía impreciso el conocimiento de la forma madura. La 2-Cys Prx de hojas de colza fue preparada con un alto grado de pureza. Como las contrapartes de tejidos no-fotosintéticos, esta proteína mostró un amplio rango de pesos moleculares en filtración por gel. Sin embargo, apareció como una única banda de 44 kDa y 22 kDa cuando los SDS-PAGE fueron realizados en ausencia y en presencia de reductores, respectivamente. La secuencia aminoácídica del extremo N-terminal fue obtenida por degradación de Edman. Estos estudios no sólo aportaron la primera preparación de una 2-Cys Prx vegetal sino también establecieron con precisión la estructura primaria de la forma madura; i.e. una proteasa escinde el péptido señal (70 aminoácidos) y libera la forma nativa (200 aminoácidos) en el estroma de los cloroplastos.

Este estudio fue subvencionado por el FONCYT.

VII - 4 CARACTERIZACION DE LA ENZIMA GUANILILTRANSFERASA DE RNA MENSAJERO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*. Cabrejos, M.E., Tamayo, E., y Maldonado, E.. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago 7, Chile. Patrocinio: Dr. Edio Maldonado M.

El mRNA mensajero (mRNA) naciente producido por la RNA polimerasa II en células eucariontes, es modificado en su extremo 5' en un evento posttranscripcional temprano. Este proceso ocurre con la contribución de diversas actividades enzimáticas. Primero, se requiere la actividad RNA 5' fosfatasa para remover el fosfato terminal del transcrito primario, generando un mRNA con un extremo 5' difosfato. En segundo lugar, participa una RNA guanililtransferasa que permite la incorporación de una molécula de guanililmonofosfato (GMP) al mRNA 5' difosfato mediante un enlace covalente. Finalmente, participa una RNA (guanina 7) metiltransferasa la cual incorpora un grupo metilo al residuo de guanosina formando un casquete (mGpppN). Esta estructura es esencial para otorgar protección al transcrito frente a la acción de nucleasas, para favorecer el proceso de excisión de intrones y empalme de exones, para facilitar la unión del mRNA al ribosoma y lograr una eficiente iniciación de la traducción. Sobre la base de los antecedentes evolutivos esta enzima está presente en eucariontes superiores como un polipéptido, el cual contiene dos dominios funcionales. El dominio amino terminal contiene la actividad mRNA trifosfatasa, mientras que el dominio carboxilo terminal ejerce la actividad mRNA guanililtransferasa.

En este trabajo describimos la primera caracterización de una enzima guanililtransferasa presente en plantas. Utilizamos la secuencia de aminoácidos de la enzima guanililtransferasa humana como sonda para identificar en la base de datos TAIR (The *Arabidopsis thaliana* Information Resource) una secuencia que potencialmente codifica para la misma enzima en *A.thaliana*. Sobre esta base diseñamos partidores específicos para amplificar el marco de lectura abierto mediante la reacción de PCR, utilizando como molde una genoteca de DNA de *A.thaliana*. Obtuvimos un fragmento de 1,9 kb que subclonamos en un vector de expresión. Realizamos la sobreexpresión de la proteína recombinante, la cual fue purificada mediante cromatografía de afinidad. Los ensayos funcionales de formación de un complejo enzima-GMP y los análisis de comparación de secuencias con la enzima humana, nos permitió concluir que el polipéptido posee actividad de guanililtransferasa.

VII - 5 LA MACROALGA VERDE *ENTEROMORPHA COMPRESSA* DE SITIOS CONTAMINADOS ACUMULA METALES PESADOS Y PRESENTA CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES. (The green macroalga *Enteromorpha compressa* from polluted sites accumulates heavy metals and shows changes of antioxidant enzyme activities). Ratkevicius, N. y Moenne A. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago.

La macroalga verde *Enteromorpha compressa* es la especie dominante en zonas costeras del norte de Chile contaminadas con metales pesados, principalmente cobre y hierro. Esto sugiere la existencia de mecanismos muy eficientes de tolerancia entre los que se cuentan la exclusión y/o acumulación de metales y la activación del sistema de enzimas antioxidantes. Esta activación responde al stress oxidativo generado por el cobre y hierro que atacan el peróxido de hidrógeno y producen especies reactivas de oxígeno. Por consiguiente, se decidió analizar la capacidad de acumulación de cobre y hierro y la actividad de las distintas enzimas antioxidantes en esta alga. Se colectó agua y algas en sitios contaminados y no contaminados y se analizó la cantidad de estos metales. Se determinó que *E. compressa* de lugares contaminados es capaz de acumular importantes cantidades de cobre y hierro. Asimismo, se detectó que existe un aumento en la actividad de catalasas y ascorbato peroxidasas en algas de lugares contaminados mientras que no hay variación de la actividad glutatión peroxidasas. Sorprendentemente, se observó una disminución de la actividad glutatión reductasa en algas de sitios contaminados. Financiado por proyecto Dicyt USACH.

VII - 6 EXPRESION DIFERENCIAL DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA GENICA *Asr* POR ESTRES HIDRICO Y MADURACION DEL FRUTO EN TOMATE. (Differential expression of the members of the *Asr* gene family during water stress and fruit ripening in tomato) Maskin, L.; Carrari, F.O.; Gudesblat, G.E.; Moreno, J.E.; Frankel, N. y Iusem, N.D.. Laboratorio de Biología y Fisiología Molecular. FCEyN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

En plantas, la respuesta al estrés hídrico está regulada principalmente por la hormona ácido abscísico (ABA), que induce o reprime un número considerable de genes. Usando tomate (*Lycopersicon esculentum*) como modelo, investigamos la expresión diferencial de los genes *Asr1*, *Asr2* y *Asr3*, pertenecientes a la familia génica *Asr* (por *abscisic, stress* and *ripening*), bajo condiciones de estrés hídrico y en maduración de fruto. Utilizamos una estrategia basada en RT-PCR que nos permitió diferenciar la expresión de estos genes (cuyos transcritos son altamente homólogos y de tamaño similar) en distintos órganos. En condiciones de estrés hídrico, se detectó un claro aumento de la expresión de *Asr1* en hojas, mientras que en raíces se vio un incremento marcado del mRNA de *Asr2*. En el caso del fruto los patrones de expresión se mantuvieron constantes durante la maduración. Por otro lado, también se observó expresión de estos genes en semilla durante la embriogénesis.

Se realizó un alineamiento múltiple con secuencias proteicas de otras especies que presentan alto grado de identidad con las *ASR* de tomate, lo que permitió identificar un dominio conservado de 72 aminoácidos.

VII - 7 METABOLISMO DE GIBERELINAS EN PROTOPLASTOS DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*. (Gibberellin metabolism in *Gibberella fujikuroi* protoplasts). Torres, V., Urrutia, O., Burgos, A. y Rojas, M.C. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El ácido giberélico, fitohormona extensamente utilizada en la agricultura, es eficientemente producido por el hongo filamentoso *Gibberella fujikuroi*. La información acerca de las enzimas relacionadas con su biosíntesis es, sin embargo, escasa debido a la dificultad de aislarlas desde el micelio. Con el objeto de investigar las reacciones de hidroxilación y desmetilación oxidativa que definen la síntesis de las giberelinas bioactivas en este sistema, desarrollamos una metodología para obtener protoplastos activos en la síntesis de giberelinas desde los que se puedan extraer las respectivas oxidadas. Demostramos el requerimiento de quitinasa, glucuronidasa y glucanasa en la degradación de la pared del hongo, obteniéndose protoplastos de 5-10 μm de diámetro en un alto rendimiento (10^7 /mL) a partir del micelio. Estudiamos en los protoplastos, el metabolismo de los precursores ^{14}C -GA₁₂ aldehído (sustrato de la β -hidroxilasa y de la 7-oxidasa), ^{14}C -GA₁₂ (sustrato de la oxidasa del carbono 20) y ^{14}C -GA₄ (sustrato de la desaturasa). El ^{14}C -GA₁₂ aldehído fue utilizado eficientemente, generando giberelinas más polares que fueron identificadas como ^{14}C -GA₁₂, ^{14}C -GA₁₄ y ^{14}C -GA₉. Estas evidencian las actividades de 7-oxidasa, β -hidroxilasa y C20 oxidasa respectivamente. Los productos obtenidos a partir de ^{14}C -GA₁₂ resultan de la reacción de desmetilación oxidativa que genera la función lactónica de las giberelinas bioactivas. Experimentos preliminares indican que la fracción de protoplastos también transforma a la giberelina lactónica ^{14}C -GA₄. Las principales actividades de la última fase de la síntesis del ácido giberélico se encuentran presentes en los protoplastos de *Gibberella fujikuroi*.

Trabajo financiado por FONDECYT 1981073.

VII - 8 AVANCES EN LA CLONACION DEL GEN n RELACIONADO CON RESISTENCIA A VIRUS EN PLANTAS. (Cloning advance of n gene related with plant virus resistance). Stange, C., Arce-Johnson, P. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Las plantas poseen genes de resistencia cuyos productos interactúan con un elicitador del patógeno. Dicha interacción desencadena la respuesta de hipersensibilidad (HR) en la hoja infectada. Las plantas de tabaco Xanthi NN poseen el gen N de resistencia a tobamovirus (TMV) que codifica para una proteína de 131 kDa perteneciente a la familia de receptores TIR/NBS/LRR.

El Receptor N reconoce al elicitador del TMV-U1 y TMV-Cg, desencadenando HR a temperaturas bajo 28°C. Sobre esta temperatura el virus se disemina sistémicamente en plantas Xanthi NN. En plantas Xanthi nn sensibles, TMV-U1 se mueve sistémicamente. Sin embargo, TMV-Cg induce lesiones locales similares a HR, sin restringir el movimiento sistémico viral. Esto sugiere la presencia de un homólogo a un gen de resistencia, que induce una respuesta de resistencia fallida a TMV-Cg. Basándonos en la homología con el gen N, hemos denominado gen "n" al responsable de esta respuesta tipo HR. La infección de TMV-Cg en tabaco nn mostró que la respuesta tipo HR observada es sensible a la temperatura, análoga a lo que ocurre en plantas NN. Hemos amplificado por PCR los exones 1, 2, 3 y parte del exón 4 del gen n en plantas Xanthi nn. Los fragmentos fueron clonados y secuenciados. La secuencia nucleotídica mostró para el exón 1, 89,1% de homología con el exón correspondiente de N y 99,4%, 78,3% y 82% de homología para los exones 2, 3 y parte del 4, respectivamente. La secuencia aminoácídica para el exón 1 del gen n es 85,4% homólogo respecto de N y 99%, 71%, y 76,7% para los exones 2, 3 y la región 5' del exón 4, respectivamente. Utilizando RT-PCR se comprobó la expresión de los exones del gen n. Mediante Southern blot, se observa un patrón homólogo para genes de resistencia en tabacos NN y nn.

(Financiamiento Fondecyt 2000078 Estudiantes Doctorado y Fondecyt 8980005 Líneas Complementarias)

VII - 9 CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EN EL GEN QUE CODIFICA PARA EL TRANSPORTADOR DE NUCLEÓTIDO AZÚCAR ATUGALT2. (Characterization of a *Arabidopsis thaliana* mutant in the gen for the nucleotide-sugar transporter AtUGALT2). Marchant L., Silva H. y Orellana A. Laboratorio de Fisiología y Genética Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los polisacáridos de la pared celular vegetal, hemicelulosas y pectinas, son sintetizados en el aparato de Golgi. En este organelo existen glicosiltransferasas que forman estos polímeros utilizando nucleótidos azúcar. Estos son sintetizados en el citosol y deben ingresar al aparato de Golgi a través de proteínas transportadoras de membrana. Por lo tanto, estos transportadores deberían ser parte importante del mecanismo de síntesis de hemicelulosas y pectinas en los tejidos donde están siendo expresados.

Recientemente, en nuestro laboratorio, se ha clonado un transportador de UDP-galactosa de *Arabidopsis thaliana*, AtUGALT2. Con el objeto de determinar su función *in vivo* se han buscado plantas de *Arabidopsis* mutantes en AtUGALT2 mediante diferentes estrategias.

En este trabajo se presenta la caracterización molecular y fenotípica de una planta de *Arabidopsis* que posee una inserción del transposón Ds en el primer exón de este gen. Este transposón posee el gen, sin promotor, que codifica para la enzima β -glucuronidasa por lo que la expresión de este gen reportero en la planta puede relacionarse con la expresión de AtUGALT2. La planta mutante presenta expresión específica de GUS en distintos tejidos y estructuras. Además se analizó la expresión de AtUGALT2 en distintas partes de la planta silvestre utilizando RT-PCR y Northern-blot.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 100675

VII - 10 ROL DE LA SACAROSA EN EL ESTRÉS SALINO EN *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Role of sucrose in salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803). Desplats, P.A. y Salerno, G.L.- Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA. C.C.1348, 7600-Mar del Plata, Argentina. fibamdq@infovia.com.ar

Las cianobacterias son procariotes fotosintéticos capaces de adaptarse a ambientes extremos. *Synechocystis* sp. PCC 6803, cianobacteria moderadamente halotolerante, soporta concentraciones salinas de hasta 1,8 M mediante la acumulación de glucosilglicerol y, en menor proporción, de sacarosa. A pesar de ser considerada osmolito secundario, la sacarosa es indispensable en la respuesta a sal, ya que mutantes de interrupción en el gen de la sacarosa-fosfato sintasa (SPS) son incapaces de adaptarse a medios con 684mM NaCl (Desplats *et al.* 1999). En el presente trabajo se demuestra que la sacarosa alcanza un máximo a las 5 horas de iniciado el estrés salino, decreciendo inmediatamente hasta el nivel basal. La concentración máxima acumulada es diez veces menor que la de glucosilglicerol. La expresión del gen de la SPS es inducida por sal, con un máximo de RNAm a los 15 minutos, señal que desaparece a las 4 horas de estrés.

La SPS es activada *in vitro* por concentraciones de NaCl similares a las presentes dentro de las células durante las primeras horas de estrés. Los datos presentados demuestran el rol fundamental de la sacarosa en la respuesta al estrés salino durante las etapas tempranas de la adaptación, sugiriendo una función de posible molécula señal más que la de osmolito.

Apoyado por FIBA, CONICET, ANPCyT, UNMdP.

VIII - BIOLOGIA DEL DESARROLLO E INMUNOLOGIA

VIII - 1 CARACTERIZACION INICIAL DE LA HOMEOSTASIS DE HIERRO EN CELULAS NEURO-2A (N2A). (Initial characterization of iron homeostasis in Neuro-2A cells (N2A)). Núñez-Millacura C. y Núñez M.T.. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.

El hierro es necesario tanto para el desarrollo como para el normal funcionamiento del sistema nervioso central. En mamíferos la homeostasis celular de hierro es mantenida por la actividad del sistema Iron Responsive Element/Iron Responsive Protein (IRE/IRP), el cual controla la expresión de proteínas claves en la homeostasis de hierro. Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación de los niveles de hierro intracelular en neuronas. En este trabajo analizamos la participación del sistema IRE/IRP en la homeostasis celular de células de neuroblastoma Neuro-2A (N2A). La incubación de células N2A con concentraciones crecientes de hierro, resultó en niveles crecientes de hierro intracelular y en crecientes niveles de hierro reactivo o lábil (LIP). La sobreexpresión de Ferritina en células N2A resultó en incremento en la incorporación de hierro, la mantención de un bajo LIP y un sistema IRE/IRP activo, en tanto que la sobreexpresión del elemento IRE, indujo la inactivación del sistema IRE/IRP, la disminución del LIP y una actividad de incorporación de hierro que respondió poco a los niveles de hierro intracelular. Estos resultados indican que el sistema IRE/IRP mantiene la homeostasis de hierro en células N2A.

Financiado por proyecto FONDECYT 2000100 y por el proyecto P99-031 al Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

VIII - 2 LA EXORODOPSINA COMO UN MARCADOR DE DIFERENCIACION TEMPRANO EN LA GLANDULA PINEAL DE PEZ CEBRA (Exorhodopsin is an early differentiation marker in the zebrafish pineal organ). Núñez, V., y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El órgano pineal en los peces consiste en células fotorreceptoras y neuronas que proyectan al diencéfalo ventral. Los fotorreceptores de pineal expresan opsinas, las proteínas que, junto con el 11-cis-retinal, forman los pigmentos visuales. Recientemente se describió una nueva opsina, la exorodopsina, que no se detecta en retina pero sí en la pineal de peces adultos. Por constituir potencialmente un marcador útil de fotorreceptores en el desarrollo del órgano pineal, examinamos la expresión de la exorodopsina durante la embriogénesis del pez cebra (*Danio rerio*). Inesperadamente, el gen de exorodopsina se expresa en células de la pineal desde las 24 horas post-fertilización, un día antes que se detecten otros marcadores de diferenciación en éste órgano. Por marcaciones dobles usando anticuerpos específicos, hemos determinado que las células que expresan la exorodopsina son los fotorreceptores pineales y no otros tipos celulares. Paralelamente hemos iniciado un proyecto de identificación de elementos regulatorios de la transcripción que conduzcan a la expresión génica específica en pineal. Usando secuencias genómicas del gen de la exorodopsina correspondientes a regiones promotoras deseamos efectuar experimentos *in vivo* para aislar aquellos elementos cis que unan factores de transcripción específicos del órgano pineal.

Financiado por FONDECYT 1000879 e Iniciativa Científica Milenio #P99-137-F.

VIII - 3 ESTUDIO EPITOPICO DE HEMOCIANINA DEL MOLUSCO *Concholepas concholepas* MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES. (Epitopic Study of Hemocyanin from the Mollusk *Concholepas concholepas* using Monoclonal Antibodies). Oliva H., De Ioannes A.E. y Becker M.I. Laboratorio de Inmunología, BIOSONDA S.A.

Las hemocianinas son proteínas transportadoras de O_2 presentes en la hemolinfa de moluscos. Están organizadas como cilindros huecos ensamblados como decámeros, constituidos por subunidades con una Mr en torno a 400 KDa. Cada subunidad contiene 7 a 8 dominios funcionales que poseen centros de coordinación de O_2 mediante átomos de Cu^{+2} . Por su tamaño y origen filogenético distante de los mamíferos, son excelentes inmunostimulantes con aplicaciones en biomedicina. Por esta razón, estudiar la composición epitópica de la hemocianina de *Concholepas* (CCH) mediante anticuerpos monoclonales (AMC), es relevante por sus potencialidades en inmunofarmacología.

Ratones BALB/c fueron inmunizados con CCH nativa. El seguimiento de la respuesta inmune humoral se realizó mediante ELISA y *Western blot*. Linfocitos esplénicos de los ratones con mejor título de anticuerpos, se fusionaron con células mieloides NSO/2. La selección y caracterización de los hibridomas secretores de AMC específicos, se realizó por los métodos antes señalados y mediante inmunoelectroforesis con CCH nativa y con digestión controlada de proteasas. Además, se determinó su reacción cruzada con KLH y con hemocianinas de lapas Chilenas.

Entre los resultados se destacan: la obtención de un panel de anticuerpos que reconocen exclusivamente CCH, que son reactivos con epitopos comunes a las subunidades CCH-A y CCH-B y también, anticuerpos específicos para cada subunidad. Este conjunto de anticuerpos permiten proponer un mapa epitópico general para la molécula de CCH.

Financiamiento: FONDECYT 199-0258

VIII - 4 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS E INMUNOQUIMICAS DE HEMOCIANINA DEL MOLUSCO *Concholepas concholepas*. (Physicochemical and Immunochemical Properties of the Hemocyanin from the Mollusk *Concholepas concholepas*). De Ioannes P., Molledo B., Oliva H., Pacheco R., De Ioannes A.E. y Becker M.I. Laboratorio de Inmunología, BIOSONDA S.A.

Las hemocianinas son glicoproteínas presentes en la linfa de moluscos y artrópodos cuya función es transportar O_2 . Se destacan por su gran tamaño, compleja estructura cuaternaria, múltiples estados de agregación y numerosos centros de coordinación de O_2 mediante átomos de Cu^{+2} . Por su tamaño y origen filogenético distante de los vertebrados, han sido utilizadas en inmunología como proteínas transportadoras, como antígeno experimental y como inmunostimulantes con aplicaciones biomédicas. En este contexto, la hemocianina mejor conocida proviene del molusco californiano Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*) y se la denomina KLH. El aumento del uso de KLH como agente inmunoterapéutico ha producido escasez y ha motivado la búsqueda de moléculas con similares características. Es el caso de la hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH) cuyas propiedades inmunogénicas han sido demostradas en el desarrollo de anticuerpos contra péptidos y haptenos, sin embargo se desconoce su estructura. En este trabajo se presentan algunas características relevantes de CCH. Su purificación, mediante precipitación y cromatografía muestra una proteína homogénea e intacta con una Mr en torno a $3,6 \times 10^6$ KDa, en que predomina la forma didecámerica, observado con tinción negativa. Su análisis por PAGE en condiciones reductoras y disociantes muestra 2 bandas principales, CCH-A y CCH-B, con una Mr en torno a 346 KDa y 266 KDa, respectivamente, con un pI muy similar, en torno a pH 6,2. Estudios mediante inmunoelectroforesis confirman la presencia de dos subunidades y el análisis por *Western blot*, no muestra reacción cruzada entre CCH y KLH.

Financiamiento: FONDECYT 199-0258

VIII – 5 LA EXPRESION DE BIGLICAN AUMENTA EN LA REGENERACION MUSCULAR ESQUELETICA EN EL RATON. (*Biglycan expression is up-regulated in mouse skeletal muscle regeneration*) **Casar, J.C.**, Brandan, E. Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los proteoglicanos, macromoléculas formadas por una proteína central y cadenas de glicosaminoglicanos, son capaces de modular la actividad de factores de crecimiento e influenciar la proliferación y diferenciación celular. Decorina y biglicán son dos proteoglicanos de condroitín/dermatán sulfato que pueden unir TGF- β modulando su actividad biológica, y cuya expresión está aumentada en el músculo distrofico del ratón mdx. Para estudiar si el aumento de decorina y biglicán se relaciona al proceso de regeneración muscular, se evaluó la expresión de biglicán y decorina en un modelo de regeneración muscular esquelética inducida por BaCl₂.

La inyección de BaCl₂ produce la muerte y el reemplazo del 90% de las fibras musculares del músculo Tibial Anterior de ratón en 10-15 días. En este modelo se encontró un aumento significativo y transitorio de la expresión del mRNA de biglicán y no de decorina, entre el 2º y 7º día tras la inyección. La proteína biglicán presenta un aumento transitorio en el citoplasma de las fibras musculares nacientes que se observan desde el 4º día, y luego se ubica en el endomisio de las fibras maduras.

En cultivos de células musculares C₂C₁₂ se observó una caída en la expresión del mRNA de biglicán con la miogénesis.

Los datos sugieren un posible rol de biglicán en las etapas tempranas regeneración muscular esquelética.

(J.C.C., FONDECYT 2000113; E.B., Cátedra Presidencial en Ciencias, FONDECYT 1990151, FONDAF 13980001)

VIII – 6 ANALISIS IN VIVO DEL PROMOTOR DEL GEN FLOATING HEAD DE PEZ CEBRA. (In vivo analysis of the zebrafish *floating head* promoter.) **d'Alençon, C.**, Young, R. y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El gen *floating head* (*flh*) de pez cebra es un factor de transcripción que contiene un homeodominio y que participa en el desarrollo de dos estructuras del embrión temprano: la notocorda y el órgano pineal. En este último órgano, la expresión de *flh* ocurre comenzando en la gastrulación en el territorio del diencéfalo que dará origen a los dos tipos celulares de la pineal: los fotorreceptores y las neuronas de proyección. Peces mutantes para el gen *flh* carecen de notocorda y poseen un reducido número de neuronas pineales. Con el objetivo de lograr la sobreexpresión específica de genes exógenos en estas células previo a la diferenciación neuronal, hemos aislado fragmentos de DNA genómicos correspondientes al gen *flh* de pez cebra. Hemos clonado dos fragmentos correspondientes a secuencias 5' del gen: uno de 1.7 kb y otro de 7.3 kb. Ambos fragmentos fueron clonados río arriba del gen reportero GFP para analizar su capacidad de dirigir la expresión génica *in vivo*. Embiones de pez cebra fueron inyectados con estos constructos y en ensayos de expresión transientes se observó expresión de GFP. En estudios subsecuentes se diseccionará este promotor para obtener fragmentos que puedan regular independientemente expresión en pineal y en notocorda. De esta forma pretendemos aislar elementos cis que sean reconocidos por factores de transcripción específicos de pineal.

Financiado por FONDECYT 1000879 e Iniciativa Científica Milenio #P99-137-F.

VIII – 7 EL POSICIONAMIENTO NUCLEOSOMAL EN LA REGION PROMOTORA DEL GEN OSTEOCALCINA FACILITA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL BASAL Y AUMENTADA POR VITAMINA D₃ (The nucleosomal positioning at the osteocalcin promoter facilitates the basal and vitamin D₃-enhanced transcriptional activity) **Sierra, J.**, Puchi, M.; Imschenetzky, M y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

En células óseas que expresan osteocalcina (OC), el promotor presenta dos sitios hipersensibles a DNasa I localizados entre -600 y -400 (sitio distal) y entre -170 y -70 (sitio proximal). Estos sitios incluyen a elementos que regulan la transcripción basal tejido-específica de OC y el aumento inducido por vitamina D₃. Un nucleosoma se localiza entre estos dos sitios, permitiendo que el promotor se organice facilitando la interacción entre factores unidos a secuencias distales y proximales. En este trabajo hemos realizado construcciones donde se ha delecionado la secuencia -343/-165 del promotor de OC y reemplazada por fragmentos heterólogos o secuencias excluyentes de nucleosomas. Los constructos se transfectaron transientemente en células COS-7 y ROS 17/2.8, y estable-mente en células ROS 17/2.8. Posteriormente el efecto sobre la actividad transcripcional se evaluó utilizando como gen reportero luciferasa y el efecto sobre la estructura cromatínica, con ensayos de hipersensibilidad a DNasaI. Ambas estrategias mostraron diferencias significativas entre los constructos analizados. Postulamos que la región -343/-165 cumple un importante papel estructural, permitiendo una interacción funcional entre elementos regulatorios localizados a distancia dentro del promotor de OC.

FONDECYT 1000361 y 2000140.

VIII - 8 CAMBIOS MORFOLOGICOS DE ESPERMATIDAS REDONDAS DE RATA IN VITRO. (In vitro morphological changes of rat round spermatids) **Bucarey J.L.**, Herrera E. y Reyes J.G. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso (Patrocinio M.T. Nuñez).

La espermiogénesis consiste en cambios morfológicos y fisiológicos de las espermátidas redondas conducentes a la formación de espermios liberados luego al túbulo seminífero. En ratas esta etapa de la espermatogénesis es dependiente de testosterona, aunque los mecanismos celulares y moleculares de la regulación de este proceso no se conocen. En nuestros estudios sobre regulación de la espermatogénesis, hemos observado *in vitro* que las espermátidas redondas de rata aisladas muestran un cambio morfológico consistente en la adopción de figuras bipolares con proyecciones celulares de 10-30 μ m. Este fenómeno se evidencia en 30-40 % de las células. Por la morfología característica de los núcleos, así como las medidas de contenido relativo de DNA podemos afirmar que estas células fusiformes son espermátidas.

Hemos identificado tres factores de los cuales depende esta transición morfológica en espermátidas: 1) Metabolismo energético, evidenciado por la dependencia de la temperatura del cambio morfológico, y por el hecho que el fenómeno es inhibido y revertido por antimicina (inhibidor de respiración mitocondrial). 2) Calcio intracelular, ya que el porcentaje y la magnitud de los cambios morfológicos son superiores cuando se usan agentes farmacológicos que liberan Ca²⁺ intracelular, y además, el fenómeno desaparece al introducir un quelante de Ca²⁺ intracelular y 3) Comunicaciones celulares, ya que el porcentaje de células con cambio de forma es dependiente de la densidad celular, con un K_{0.5} de aproximadamente 0.6 millones de células/ml. Nuestros datos sugieren un modelo en que la jerarquía de los elementos que regulan este proceso sería 1º) Interacción celular, y 2º) Los cambios morfológicos son regulados en forma paralela por nucleótidos y Ca²⁺ intracelular. Nuestra hipótesis de trabajo es que estos cambios morfológicos están relacionados con cambios asociados al proceso espermiogénico en túbulo seminífero.

Financiado por FONDECYT 1990689 y DGI/UCV.

VIII-9 CELULAS DENDRITICAS DE PLACAS DE PEYER INDUCEN PREFERENCIALMENTE LA INTEGRINA DE HOMING A MUCOSAS $\alpha 4 \beta 7$ EN LINFOCITOS T DE RATON (Peyer's Patches Dendritic Cells Preferentially Induce the Mucosa Homing Integrin $\alpha 4 \beta 7$ on Murine T cells). Mora J.R.^{1,2}, Bono M.R.¹, & Roseblatt M.^{1,2}. ¹Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ²Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB, Santiago, Chile.

Los linfocitos T (LT) vírgenes migran sin preferencia por los tejidos linfoides, pero después de activarse migran hacia aquellos tejidos donde se activaron (*homing*). Se postula que los LT adquieren el *homing* en el tejido donde fueron activados, desconociéndose qué elementos específicos del tejido lo determinan. Nosotros encontramos que el fenotipo de *homing* está directamente influenciado por las células dendríticas (CD) del tejido, ya que LT vírgenes activados con CD de placas de Peyer (PP) presentan una expresión significativamente mayor de la integrina de *homing* a mucosas $\alpha 4 \beta 7$ comparados con LT activados con CD de ganglios (PLN), bazo, o timo. Además, hemos identificado en PP una subpoblación de CD mieloides (CD8 α ⁺) que expresa $\alpha 4 \beta 7$ y otra principalmente linfocítica (CD8 α ⁺) que expresa $\alpha E \beta 7$. Esta última induciría una mayor expresión de $\alpha 4 \beta 7$ en LT al momento de activarlos. Adicionalmente, encontramos que TGF β 1, un inmunomodulador en mucosas, disminuye la expresión de $\alpha 4 \beta 7$ en LT. Estos resultados son la primera evidencia que identifica un elemento tisular específico implicado en la determinación del *homing* en LT.

Financiado por FONDECYT 198208 (MR), 1990569 (MRB) y 2990013 y beca de Fundación Andes (JRM).

VIII - 10 MODIFICACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE CELULAS MUSCULARES INDUCE LA EXPRESION DE MARCADORES DE LINAJE OSTEOBLASTICO. (Extracellular Matrix Modifications of Muscle Cells Induce Osteoblastic Lineage Markers Expression). Osses, N. y Brandan E. Unidad de Neurobiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Mioblastos satélites corresponden a células comprometidas con el linaje muscular los cuales comparten con otros tipos celulares, como los osteoblastos, un origen embrionario en común. El ambiente celular podría ser determinante en la adquisición y/o mantención del linaje particular, siendo esencial en procesos de desarrollo o regeneración tisular. Hemos demostrado que la ausencia de una matriz extracelular (MEC) inhibe la diferenciación muscular. Evaluamos si la MEC tiene un rol en la mantención del linaje miogénico induciendo diferenciación de mioblastos (C₂C₁₂) en presencia de clorato, un inhibidor específico de la sulfatación de proteoglicanos y de la organización de la MEC. Encontramos un aumento en la expresión de marcadores de linaje osteoblástico, como actividad de fosfatasa alcalina (FA) y osteocalcina. Esto se revirtió por una MEC exógena. Los efectos inductores son independientes de la expresión de genes regulatorios miogénicos y osteoblásticos. La actividad de FA se encontró en células mononucleadas que han escapado del proceso de diferenciación muscular pero continúan expresando marcadores de compromiso miogénico como Myo-D y Myf-5. Estos resultados indican que la ausencia de una MEC modifica el linaje de células miogénicas a un fenotipo osteoblástico de manera independiente de la expresión de factores de transcripción.

N.O., Fondecyt 2990088; E.B., Cátedra Presidencial, Fondecyt 1990151, FONDAP13980001

IX - BIOLOGIA DEL DESARROLLO E INMUNOLOGIA

IX - 1 ANALISIS MOLECULAR DE LA INDUCCION DE CRESTAS NEURALES EN XENOPUS. Villanueva S., Ruiz P. y Mayor R. Nucleo milenio Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Durante la inducción neural, noggin, cordina y follistatina, difunden al ectodermo uniéndose a BMP. Altas concentraciones de BMP forman epidermis y bajas forman placa neural. Wnt, FGF y ácido retinoico transforman la placa neural en un eje postero-anterior. Adyacente a la placa neural están los pliegues neurales, que en la región anterior originan cerebro y en la posterior crestas neurales. Las crestas neurales se producirían por un gradiente de BMP: concentraciones crecientes expresan placa neural, cresta neural y epidermis. Proponemos que la inducción de crestas neurales se produce por inducción del pliegue neural anterior, que se posterioriza por Wnt, FGF y/o ácido retinoico. Experimentos confirman este modelo: Conjugados de pliegue neural anterior con mesodermo posterior, muestran expresión de Xslug, e inhibición de Xag en pliegue neural; al inyectar dominante negativo de FGF en caps animal disminuye Xslug. Al inyectar distintas concentraciones del receptor mutado de BMP en caps animal, se observa inducción de Xslug a 40 y 80 pg y Xag a concentraciones menores; al tratar los caps con bFGF aumenta Xslug versus Xag. Al inyectar en embriones el dominante negativo de ácido retinoico, aumenta la expresión posterior de cpl, al inyectar el constitutivo de ácido retinoico aumenta la expresión anterior de Xslug, inhibiendo cpl. Al cultivar embriones con ácido retinoico aumenta la expresión anterior de Xslug. Xslug, Xag y cpl son controlados por ácido retinoico y bFGF. Un modelo molecular de la inducción de las crestas neurales sería distinto.

IX - 2 GLICOESFINGOLÍPIDOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ANFIBIOS. Aybar^{1,2} M.J., Mayor² R, Sánchez¹ S.S. Depto. Biología del Desarrollo, INSIBIO (CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán, Argentina⁽¹⁾. Núcleo Milenio en Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Univ. de Chile, Santiago, Chile⁽²⁾.

En trabajos anteriores hemos demostrado una activa biosíntesis de glicosfingolípidos (GSL) y cambios en el patrón de expresión de estas moléculas durante la gastrulación del anfibio *Bufo arenarum*. En el presente trabajo, analizamos la participación del gangliosido GM1 en la adhesión de las células mesodérmicas y en el movimiento de extensión convergente del mesodermo dorsal. El gangliosido GM1 se localizó en los contactos focales en la interfase de la célula con su sustrato y se redistribuye durante el proceso de adhesión celular. Dos sondas diferentes dirigidas contra GM1 (subunidad B de la toxina del cólera y anticuerpo anti-GM1) inhibieron la adhesión de las células mesodérmicas a la matriz extracelular (MEC) nativa, fibronectina, EP3-EP4 y colágeno tipo IV. Se evaluó el efecto de la inhibición de la biosíntesis de GSL con un inhibidor específico de la enzima glucosilceramida sintasa (PPMP) sobre la adhesividad de las células mesodérmicas. Después de 90 minutos de incubación sobre un sustrato de MEC nativa, las células mesodérmicas tratadas con PPMP no evidenciaron adhesión ni extensión celular. La participación de GM1 en el movimiento de extensión convergente del mesodermo dorsal fue ensayada *in vitro* usando explantos en sándwich según Keller. Los explantos en sándwich cultivados en presencia de ambas sondas sufrieron una severa inhibición en la elongación y estrechamiento de los explantos. Se analizó también la expresión de los mRNA de diferentes enzimas de la síntesis de gangliosidos durante el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*. Nuestros resultados sugieren que los GSL participan en la adhesión celular y en la extensión convergente del mesodermo dorsal, apoyando el concepto de que estas moléculas están involucrados en las interacciones celulares del desarrollo embrionario de los anfibios.

IX - 3 EL GEN NOT REALLY STARTED CODIFICA PARA UNA PROTEINA DE MEMBRANA ESENCIAL PARA EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN PEZ CEBRA. (The *not really started* gene encodes a membrane protein essential for embryogenesis in zebrafish). Young, R.M. y Allende, M.L. Departamento de Biología y Millennium Nucleus in Developmental Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Mediante mutagenesis insercional con vectores retrovirales en pez cebra, hemos identificado un mutante letal recesivo. El fenotipo consiste en la aparición de un material opaco en la extensión de la célula vitelina en el segundo día post fertilización (dpf), que luego se extiende a todo el vitelo. Al 4º dpf, los embriones mueren producto de una necrosis masiva. El gen mutado se identificó usando PCR inverso y exon trapping. La inserción mutagénica ocurrió a 4 kb 5' del inicio del marco de lectura del gen que llamamos *not really started* (*nrs*) y cuya secuencia deducida indica que es una proteína de membrana que presenta alta homología a genes que confieren resistencia a tetraciclina en bacterias y a transportadores de azúcares. Rastros en bases de datos indican que también existen genes homólogos en *Arabidopsis*, ratón y humano. Análisis del mRNA de *nrs* mediante RT-PCR muestra que es un gen materno que se expresa hasta estadios adultos y que está ausente en mutantes homocigotos *nrs*. Mediante hibridación *in situ* observamos que el mRNA de *nrs* se expresa en la región donde se ubican los núcleos sincitiales del vitelo. En base a estos resultados proponemos que *nrs* es un transportador involucrado en el paso de nutrientes desde el vitelo hacia el embrión. Financiado por FONDECYT 3970014 y 1000879 e Iniciativa Científica Milenio #P99-137-F; R. Y. es becario CONICYT.

IX - 4 CARACTERIZACION ELECTROFISIOLÓGICA DE SUBTIPOS DE NEURONAS ESPINALES EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Xenopus laevis* (Electrophysiological characterization of spinal neurons subtypes in the embryonic *Xenopus laevis* development). Olguín P., Armisen R. y Kukuljan M. (Patrocinio: Norbel Galanti). Programa de Fisiología y Biofísica ICBM. Fac. Medicina. U. de Chile

Diferentes tipos de células excitables expresan diversos complementos de canales iónicos. Nuestro interés es conocer los programas moleculares que determinan la regulación de la expresión de un grupo de canales iónicos en un tipo celular específico. Estudiamos las neuronas espinales embrionarias de *Xenopus laevis*, las que empiezan a expresar canales activados por voltaje antes de su diferenciación morfológica. Los patrones temporales y la identidad molecular de los canales iónicos expresados en estas células son heterogéneos. Esta heterogeneidad podría ser explicada por la existencia de programas diferentes para los subtipos de neuronas espinales, las que son indistinguibles en cultivo. Para establecer una correlación entre la identidad celular y sus propiedades electrofisiológicas, caracterizamos las corrientes iónicas de neuronas morfológicamente indiferenciadas mediante patch clamp, y posteriormente establecimos la identidad de linaje celular mediante RT-PCR de célula única. Analizamos la expresión de los transcritos de *Xlim-3*, *XHB-9* y *XHox11L2*, cuya especificidad para neuronas motoras y sensitivas determinamos previamente mediante hibridación *in situ*. Se presentan las correlaciones entre los diversos patrones de desarrollo de excitabilidad y la identidad molecular de las neuronas estudiadas.

Financiamiento: Fondecyt 2980063 (RA) y 4000031(RA).

IX - 5 PATRON DE EXPRESION Y REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DE SCG10 DURANTE EL DESARROLLO TEMPRANO DE *XENOPUS LAEVIS* (Expression pattern and transcriptional regulation of SCG10 during the early development of *Xenopus laevis*). Fuentes, R.A.; Armisen, R. y Kukuljan M. Programa de Fisiología y Biofísica. ICBM. Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. (Patrocinado por M.J. González)

SCG10 es una proteína específica de neuronas, descrita como un factor desestabilizante de microtúbulos y con un papel crucial en el crecimiento dendrítico. En modelos murinos presenta altos niveles de expresión durante la etapa embrionaria y posnatal. El Factor Silenciador de Transcripción-RE1 (REST) ha sido identificado en estudios de líneas celulares como un regulador negativo de su transcripción. En este trabajo nos hemos propuesto caracterizar el patrón de expresión temporal y espacial de SCG10 en el embrión temprano de *X. laevis* para luego estudiar como la manipulación de la actividad de REST influye sobre dicho patrón. La hibridación *in situ* de embriones completos de *X. laevis* con una sonda contra SCG10 permitió la detección de transcritos del gen en neuronas primarias espinales y neuronas de los ganglios craneales desde el estadio de neurula tardía. La inhibición de la actividad de REST se logró mediante la inyección de cRNA que codifica una forma dominante negativa de REST en embriones en estadio de dos células. Tal manipulación tiene como consecuencia la represión de SCG10 en las zonas donde se expresa normalmente. Estos resultados sugieren procesos más complejos en la regulación de la transcripción tejido-específica de SCG10 que los planteados inicialmente sobre la base de estudios en líneas celulares.

Financiamiento: Fondecyt 2980063 (RA) y 4000031(RA)

IX - 6 LA UNION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION *cbf/nf*-Y AL PROMOTOR DEL GEN DE LA HISTONA AH3 ES REGULADA A TRAVES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO (The binding of the transcription factor CBF/NF-Y to the histone α H3 gene promoter is regulated during embryonic development) Medina, R., Puchi, M., Imschenetzky, M., Montecino, M. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Universidad de Concepción.

Durante la embriogénesis temprana del erizo de mar se expresan secuencialmente tres clases de genes de histonas. La transcripción de los genes alfa se inicia al estado de 16 células, alcanza un máximo al estado de 128 células y luego disminuye gradualmente hasta ser inhibida al estado de blástula. En nuestro laboratorio hemos determinado que el gen de la histona α H3 de *Tetrapygus niger* presenta una expresión temporal, el cual alcanza un máximo al estado de 128 células para luego desaparecer al estado de larva Pluteus. Análisis de footprinting revelan protección de la región -80 a -96 del promotor de este gen. Esta región se correlaciona *in vivo* con la existencia de un sitio hipersensible a DNasa I e incluye un sitio consenso CCAAT. Análisis de interferencia por metilación confirman la protección de residuos específicos de esta secuencia. Ensayos de retardo en gel y análisis de supershift indican la existencia de un complejo proteico que incluye al factor CBF/NF-Y con capacidad de unión a esta secuencia. Estos resultados nos permiten sugerir que la unión de CBF/NF-Y a la región proximal del gen de la histona α H3 se correlaciona directamente con la expresión temporal de este gen a través del desarrollo.

FONDECYT: 2990041

IX - 7 LISIS DE CELULAS U937 INFECTADAS CON S. TYPHI POR CELULAS NK HUMANAS. (Lysis of *S. typhi*-U937-infected cells by human NK cells). Jara, P., Carrasco, C., Navarro, P., Miranda, D., Blanco, L.P. & Puente, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

Las células NK participan en la respuesta defensiva anti-bacteriana a través de su actividad citotóxica (ACNK) frente a células infectadas por patógenos intracelulares, pero se desconocen los mecanismos implicados. En el presente trabajo se caracterizó la lisis de células U937 infectadas con la cepa *Salmonella typhi* Ty2 y la mutante en fosfatasa *S. typhi* TYT 1231. Se utilizaron como células efectoras linfocitos sanguíneos periféricos y células NK altamente purificadas por métodos inmunomagnéticos. Como células blanco se utilizaron células U937 infectadas por *S. typhi* Ty2 o TYT1231 (que presenta una limitada sobrevida intracelular), marcadas con ^{51}Cr . Como inhibidores de la ACNK, se utilizaron inhibidores de proteína quinasas: genisteína (proteínas tirosina quinasas: PTK); bisindolil-maleimida I (proteína quinasas C PK-C) y wortmanina (fosfatidil-inositol -3-quinasa). Nuestros resultados muestran que las células NK humanas presentan una actividad citotóxica significativamente mayor frente a células infectadas en relación a los controles no infectados, resultado primera vez descrito utilizando células NK puras. Esta citotoxicidad es significativamente inhibida por los inhibidores de proteína quinasas PTK y PK-C, por lo cual la lisis de las células infectadas ocurriría a través de los mismos mecanismos de lisis de células sensibles. Este resultado fue independiente del tipo bacteriano utilizado para infectar las células U937.

Proyecto FONDECYT 197-0226 y ENL-2000/16 DID-U. Chile

IX - 8 EL ALERGENO DEL LITRE INHIBE LA RESPIRACION Y MODIFICA COVALENTEMENTE PROTEINAS MITOCONDRIALES AISLADAS DESDE HIGADO DE RATA (The allergen from Litre inhibits respiration and chemically modifies proteins present in rat liver isolated mitochondria). Pacheco R.¹, Kalergis A.¹, Garbarino J.², Ferreira J.³, De Ioannes A.E.¹. (1) Lab. Inmunología. BIOSONDA S.A. (2) UFSM, Fac. Ciencias (3) ICBM Depto Farmacología Molecular y Clínica, Fac. Medicina, U. de Chile.

Litreol, [3-pentadecyl (10-en) catecol], el principio activo del Litre (*Lithraea caustica*), pertenece a la familia de los urushioles. Estos compuestos son responsables de una severa dermatitis de contacto, a que está expuesta un porcentaje significativo de la población humana.

Nuestro grupo ha demostrado que los urushioles inhiben la respiración mitocondrial a nivel del Complejo III. Este fenómeno es específico, porque requiere la presencia de la estructura catecólica y de la cadena alifática, ya que pentadecil fenol y 3 metil catecol no ejercen una inhibición significativa en la respiración. El alergeno del *poison ivy*, que posee tres veces más insaturaciones en la cadena alifática, es el inhibidor más potente de la respiración y el más alergénico en humanos.

Es aceptado que la inducción de reacciones de hipersensibilidad retardada por haptenos como Litreol, requiere la modificación covalente de proteínas propias. Por esta razón, se investigó la unión de Litreol marcado con ^3H en la cadena alifática a proteínas mitocondriales. Mediante análisis por medio de geles en dos dimensiones, se observó aparición de proteínas marcadas de ≈ 30 KDa. Estas proteínas se encuentran distribuidas en la membrana mitocondrial interna y corresponderían a citocromo c1, según la técnica de *western blotting*, usando anticuerpos policlonales específicos de c1.

Financiamiento FONDECYT: 1-00-0203 a ADI y 1-98-1066 a JFP

IX - 9 ADHESION LINFOCITARIA INDUCE MHC II, ICAM-1 Y VCAM-1 EN CELULAS ENDOTELIALES HUMANAS. (Lymphocyte adhesion induces MHC Class II, ICAM-1 and VCAM-1 on human endothelial cells). Reyes, L.^{1,2}, Rosembatt, M.^{1,2} y Bono, MR.¹. ¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ²Fundación Ciencia para la Vida y MIFAB, Santiago Chile.

La activación de células endoteliales por citoquinas induce la expresión de moléculas implicadas en la respuesta inmune, tales como MHC II, ICAM-1 y VCAM-1. En este trabajo se analizó la inducción de la expresión de varias moléculas de superficie en células endoteliales de amígdala humana por efecto de la adhesión de linfocitos T y B singénicos y alogénicos. La adhesión de linfocitos B induce la expresión de moléculas MHC-II, ICAM-1 y VCAM-1. La inducción de MHC II es inhibida por anticuerpos bloqueadores de la adhesión, y presenta una cinética más lenta y un nivel de expresión menor que el de células activadas con IFN- γ . Experimentos de RT-PCR muestran ausencia del mRNA del Transactivador de Clase II, indicando que este factor no está involucrado en la inducción. Experimentos de activación utilizando anticuerpos contra moléculas de adhesión sugieren que ICAM-1 no está involucrada en la inducción de MHC-II. Finalmente, contrario a lo que sucede con linfocitos B, la adhesión de linfocitos T induce sólo la expresión de ICAM-1. Estos resultados sugieren que la unión de linfocitos B a células endoteliales de amígdala resulta en un estado de activación con efectos en la respuesta inmune.

Financiado por Fondecyt 1990569 (MRB) y 1980208 (MR).

IX - 10 IL-6 NO ES ESTIMULO OSTEOGENICO PARA LA CELULA PROGENITORA MESENQUIMATICA. (IL-6 is not an osteogenic signal for mesenchymal progenitor cell). Erices, A. y Minguell, J.J. Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

Las citoquinas IL-6 y LIF regulan el metabolismo óseo ejerciendo su actividad biológica luego de interactuar con una cadena de receptor específica (IL-6R, LIFR) y una cadena transductora común (gp130). Las células progenitoras mesenquimáticas (CPM) de la médula ósea son precursores de osteoblastos y su diferenciación osteogénica puede ser inducida *in vitro*. En este estudio evaluamos: a) la producción de IL-6 y LIF, b) la expresión de receptores de membrana y solubles para IL-6 y LIF, y c) el efecto de estas citoquinas sobre la proliferación y diferenciación osteogénica de las CPM. Estas células expresan los mensajeros para IL-6 y LIF, secretan las citoquinas al medio como también la cadena soluble de gp130, y en la membrana expresan gp130, pero no IL-6R y LIFR. IL-6 o LIF, solos o en combinación con sus respectivos receptores solubles, no inducen la diferenciación osteogénica de CPM. Cuando el estímulo osteogénico es suplementado con estas citoquinas, no se observan cambios en la expresión de los marcadores de diferenciación (fosfatasa alcalina, mineralización de matriz). Sin embargo, la adición de la cadena soluble IL-6Rs, solo o con IL-6, produce una expresión más temprana y de mayor magnitud de estos marcadores. Estos resultados sugieren que el compromiso de las CPM con la vía de diferenciación osteogénica no es modulado por IL-6 o LIF. Sin embargo la diferenciación terminal de progenitores osteogénicos derivados de CPM puede ser regulada por IL-6, vía el receptor soluble IL-6Rs.

(Fondecyt 2980017 y Beca CONICYT)

X - MEMBRANA

X - 1 FOSFORILACION DE LRP Y MEGALINA: DOS RECEPTORES DE LA FAMILIA DEL RECEPTOR DE LDL. (Phosphorylation of LRP and Megalin: two members of the LDL-R family). Marzolo, M.P.¹, Solis G.¹, Li, Y.², Van Kerkhof² y Bu G.². ¹Departamento de Biología, Fac. Ciencias, U. Chile. ²Dept. Cell Biology and Physiology, Washington University School of Med. Financiado por : FONDECYT #1990600, y # 7990029 a MPM y NIH grant NS37525 a GB.

LRP y Megalina son miembros de la familia de receptores relacionados al LDL-R que endocitan lipoproteínas que contienen apoE además de varios otros ligandos no relacionados estructural ni funcionalmente. LRP es abundante en hígado y sistema nervioso central. Megalina se expresa en epitelios, como el renal y en la cara apical de las células epiteliales. Dada su función endocítica, ambos receptores tienen en su dominio citosólico, motivos que podrían ser funcionales en la endocitosis mediada por clatrina. Evidencias recientes muestran que receptores de esta familia no sólo participan en endocitar ligandos y reciclar a la membrana plasmática, sino que además se relacionan con mecanismos de transducción de señal. Es interesante que ambos receptores presentan secuencias consenso para fosforilación, tanto para proteína quinasa A (PKA), C (PKC) y caseína quinasa II. En este trabajo se evaluó la fosforilación de ambos receptores, *in vivo* tanto endógenos como de proteínas químicas que contienen el segmento citosólico de LRP o Megalina, como *in vitro*, en ensayos de fosforilación de proteínas GST-MegT y GST-LRP-T. Se demostró que LRP es fosforilado por PKA y que el sitio de fosforilación está en la serina 76 del segmento citosólico. La fosforilación de LRP parece facilitar la endocitosis del receptor. En el caso de megalina, la fosforilación parece ser mediada preferentemente por PKC y posiblemente ocurra en uno de los tres sitios consenso para esta quinasa.

X - 2 MECANISMO MOLECULAR DE PERFRINGOLYSIN O, UNA CITOLISINA DEPENDIENTE DE COLESTEROL QUE FORMA POROS EN LA MEMBRANA LIPIDICA. (Forming holes in a membrane bilayer: the mechanism of Perfringolysin O, a cholesterol dependent cytolysin). Heuck A. P., Tveten* R. K., and Johnson A. E. Texas A&M University, College Station, TX 77843-1114. *University of Oklahoma, Oklahoma City, OK 73190.

Perfringolysin O (PFO) is secreted from a pathogenic *Clostridium perfringens* bacteria as a water-soluble protein. Upon encountering a cholesterol-containing membrane, PFO binds, oligomerizes, and forms a very large "hole" in the bilayer. None of the four domains identified in the crystal structure of the PFO monomer contained an obvious site for membrane interaction, so we used cysteine-scanning mutagenesis in conjunction with a comprehensive set of independent fluorescence techniques to show that six short α -helices located in domain 3 of the monomer unfold to form two amphipathic transmembrane β -hairpins (TMHs) that span the membrane bilayer and creates the pore [Biochemistry (1998) 37, 14563; Cell (1999) 99, 293].

To investigate the mechanism of pore formation, we have examined domain-specific structural changes by monitoring both extrinsic and intrinsic fluorescence changes in the same PFO molecule during pore formation. The kinetics of these spectral changes reveal that two widely-separated regions of PFO, domains 3 and 4 are coupled both structurally and functionally, and interact with the membrane in an obligatory sequence. The role of domain 4 in pore formation is limited to triggering the insertion of the TMHs into the bilayer via its linkage to domain 3, thereby preventing the premature exposure and aggregation of the TMHs prior to insertion. This novel mechanism of pore formation therefore involves the sequential and coupled interaction of different domains of PFO with the membrane

X - 3 ALTERACIONES DEL TRANSPORTE HEPATOCITICO VESICULAR, EN UN MODELO DE COLESTASIA AGUDA. (Alterations of hepatocytic vesicular transport in a model of acute cholestasis) *Muñoz P., **Pizarro M., **Solis N., **Accatino L., *Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile; Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Valeska Vollrath.)

Las vías vesiculares son importantes en el transporte intracelular de solutos biliares en el hepatocito. Alteraciones en la secreción biliar pueden determinar colestasia.

Objetivo: Estudiar si la vía vesicular transcitótica (VVT) y la vía vesicular lisosomal (VVL) están alteradas en un modelo de colestasia aguda, inducida por estradiol-17 β -glucuronido (E17 β G). **Método:** Se administró E17 β G en una dosis i.v. (5,2 mg/Kg. de rata) a ratas Sprague-Dawley machos. Como marcadores de colestasia se determinaron: flujo biliar (FB), excreción biliar de sales biliares (SB) y fosfatasa alcalina (FA); como marcador de la VVT, peroxidasa de rábano (HRP); de la VVL al ³(H)-polietilenglicol - 900 (³H-PEG) como marcador exógeno, y la enzima N-acetil glucosaminidasa (NAG) como marcador endógeno.

Resultados: El E17 β G produce una disminución rápida, aguda y reversible en el FB, excreción biliar de SB y FA. La excreción biliar de HRP en el grupo colestásico fue menor que en el grupo control. Estudios con microscopía electrónica demostraron que el transporte de HRP hacia el canalículo está alterado. La excreción de ³H-PEG, así como el FB estimulado con la sal biliar dehidrocolato, disminuyó en el grupo colestásico. La excreción de NAG fue menor en el grupo colestásico.

Conclusión: El E17 β G, inhibe la VVT y la VVL, pudiendo contribuir a la insuficiencia secretora hepática característica de la colestasia inducida por este esteroide.

(Fondecyt 1971124).

X - 4 LA SOBREEXPRESION HEPATICA DE CAVEOLINA-1 EN RATONES INCREMENTA EL CONTENIDO DE COLESTEROL HEPATICO Y LA SECRECION BILIAR DE SALES BILIARES (Over-expression of Caveolin-1 in mice liver leads to increased hepatic cholesterol content and biliary bile salt secretion). Moreno M., Molina H., Amigo L., Zanlungo S., *Rodriguez-Boulán E., Vio C., Rigotti A., Miquel JF. Depto. Gastroenterología, Facultad de Medicina, Depto. Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Univ. Católica de Chile, Santiago-Chile; *Margaret M. Dyson Vision Research Institute, Cornell University Medical College, NY 10021, USA.

Los mecanismos que regulan el tráfico intracelular de colesterol hepático y la secreción de lípidos biliares son sólo parcialmente conocidos. Evidencias recientes sugieren que las caveolinas (cav) cumple un rol relevante en el transporte intracelular de colesterol *in vitro*. Nuestro objetivo fue caracterizar la función de esta proteína en el metabolismo del colesterol hepático *in vivo* y demostrar su rol en la secreción de lípidos biliares. Se sobreexpresó cav-1 y cav-2 en hígado de ratones C57BL6 mediante el uso de adenovirus recombinante, comparando el efecto con ratones C57BL6 infectados con adenovirus control. Se estudió la secreción de lípidos biliares, hepáticos y plasmáticos. La infección con Ad.cav-1 y Ad.cav-2 incrementó significativamente la expresión hepática de cav-1 (x10) y cav-2 (x8). La sobreexpresión de cav-1 aumentó significativamente el contenido de colesterol hepático (10%), el flujo biliar (20%), la secreción biliar de colesterol (40%) y aumentó discretamente la secreción de sales biliares (20%, p=0.08). No hubo cambios en el contenido de lípidos plasmáticos. Frente a la infusión endovenosa de taurocolato, la sobreexpresión de cav-1 indujo un importante incremento en la capacidad máxima de secreción de sales biliares (≥ 2 veces). Estos resultados demuestran que cav-1 modula el contenido de colesterol hepático y es relevante en la secreción hepática de colesterol y sales biliares. (Fondecyt 8990006).

X - 5 EXPRESION Y REGULACION DEL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B TIPO I (SR-BI) EN EL EPITELIO DE LA VESICULA BILIAR (Expression and regulation of scavenger receptor class B type I in gallbladder epithelium). Miquel JF¹, Moreno M¹, Molina H.¹, Amigo L¹, Wistuba I², Acton S³, Rigotti A¹. Deptos. de ¹Gastroenterología y ²Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, P. Univ. Católica de Chile; ³Cardiovascular Biology, Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA, USA.

La absorción de lípidos biliares en el epitelio de la vesícula biliar (VB) parece cumplir una función en la homeostasis del colesterol corporal y en la formación de cálculos vesiculares. Se ha propuesto que el receptor SR-BI participa en la absorción de colesterol en el intestino. Objetivo: evaluar la expresión de SR-BI en VB humana y de ratones y su regulación frente a un incremento en el contenido de lípidos biliares. Mediante inmunohistoquímica se observó que SR-BI se expresa en el dominio apical de células epiteliales de la VB, tanto en humanos como en ratones C57BL6. En VB de pacientes con colesteroles, se demostró que SR-BI se expresa en la membrana plasmática de macrófagos con citoplasma espumoso. Utilizando membranas totales de células epiteliales de VB, demostramos por western blot (WB) una señal específica para SR-BI. Se alimentaron ratones C57BL6 con dieta control y dieta rica en colesterol para cuantificar lípidos biliares y expresión de SR-BI en la VB. Mediante WB, se observó una correlación inversa entre la concentración de lípidos biliares y la expresión de SR-BI en la mucosa de la VB. Conclusión: SR-BI se expresa en el polo apical del epitelio de la VB humana y de roedores, y en células espumosas de VB con colesteroles. La hipersecreción de colesterol biliar inducida por una dieta rica en colesterol se asocia a una reducción de la expresión de SR-BI en la VB de ratones. Esto sugiere que SR-BI puede cumplir un rol funcional en la absorción de lípidos en la VB y que sus niveles de expresión en este epitelio están regulados por sustrato. (Fondecyt 8990006).

X - 6 METABOLISMO HEPATICO DE COLESTEROL Y ACIDOS BILIARES EN RATONES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR SCAVENGER CLASE B, TIPO I (SR-BI). (Hepatic cholesterol and bile acid metabolism in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice). Mardones P¹, Quiñones V¹, Amigo L¹, Miquel JF¹, Trigatti B², Krieger M², Rigotti A¹. ¹Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile y ²Biology Department, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA.

La expresión hepática del receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) modula el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas de alta densidad (HDL) al mediar la captación celular selectiva de colesterol-HDL en la superficie del hepatocito. Existen evidencias que demuestran que el colesterol-HDL captado por el hígado es destinado preferentemente a la secreción biliar de colesterol y sales biliares, lo que constituye el último paso del transporte reverso de colesterol mediado por HDL. Para evaluar el rol de SR-BI en este proceso estudiamos el contenido y la síntesis de colesterol en el hígado, la secreción de lípidos biliares y el metabolismo de ácidos biliares en ratones silvestres y ratones *knockout* de SR-BI (SR-BI KO). Los ratones SR-BI KO presentaron una disminución específica en la secreción de colesterol biliar, sin mayores alteraciones en los demás parámetros determinados. Estos resultados demuestran que la expresión hepática de SR-BI cumple un papel clave en el control selectivo del transporte de colesterol-HDL desde el plasma hacia la bilis y establecen una participación directa de SR-BI en la etapa final del transporte reverso de colesterol.

Financiamiento FONDECYT 8990006

X - 7 DISMINUCION DE LA SECRECION DE COLESTEROL BILIAR Y DEL DESARROLLO DE CALCULOS VESICULARES EN RATONES DEFICIENTES EN APOLOPROTEINA E ALIMENTADOS CON DIETAS ENRIQUECIDAS EN COLESTEROL (Impaired biliary cholesterol secretion and decreased gallstone formation in apolipoprotein E-deficient mice fed with high cholesterol diets). Amigo L., Quiñones V., Mardones P., Zanlungo S., Miquel JF., Nervi F., Rigotti A. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

Dado que la apolipoproteína E (apoE) tiene un rol clave en el metabolismo hepático del colesterol de origen dietético, ella podría regular la secreción de colesterol biliar y la formación de cálculos biliares inducidos por la suplementación de colesterol en la dieta. Para evaluar esta hipótesis, estudiamos la secreción de lípidos biliares y el desarrollo de coleditiasis en ratones silvestres y *knockout* de apoE alimentados con dietas enriquecidas en colesterol. El uso de una dieta rica en colesterol aumentó dramáticamente la secreción biliar de colesterol y la concentración de colesterol en la bilis vesicular de los ratones silvestres, mientras que estos cambios fueron significativamente menores en los ratones deficientes de apoE. Cuando los ratones *knockout* de apoE se alimentaron con una dieta que induce la formación de cálculos vesiculares presentaron una reducción en la saturación biliar de colesterol asociada a menor frecuencia de cristalización del colesterol biliar y de coleditiasis comparados con la cepa silvestre. Estos resultados demuestran que la expresión de apoE es un factor importante en la regulación de la hipersecreción biliar de colesterol y en la formación de coleditiasis inducidas por colesterol dietético en el ratón.

FONDECYT 8990006 y 1971092; DIPUC 9801E

X - 8 ASOCIACION FISICA Y FUNCIONAL ENTRE GLICOSILTRANSFERASAS DE GLICOLIPIDOS EN EL COMPLEJO DE GOLGI (physical and functional association of glycolipid glycosyltransferases in the Golgi complex). Giraudou, C. G., Daniotti, J. L. y Maccioni, H. J. F. IQUIBIC (UNC-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Las glicosiltransferasas que actúan tempranamente en la vía de síntesis del oligosacárido de los glicolípidos se distribuyen a lo largo de todo el Golgi, mientras que las que actúan al final se concentran en compartimentos distales del mismo. Esta organización topológica genera interrogantes acerca de posibles asociaciones entre ellas cuando solapan su localización en los distintos subcompartimentos del Golgi. Aquí examinamos la posible asociación entre la β -1,4-N-acetyl-galactosaminiltransferasa y la β -1,3-galactosyltransferasa, las cuales actúan secuencialmente en la síntesis de glicolípidos neutros y gangliósidos. Experimentos de inmunoprecipitación en células CHO-K1 transfectadas con versiones rotuladas de estas enzimas evidencian una asociación física entre ellas, en la cual están involucrados sus dominios NH₂-terminales (tallo citosólico, segmento transmembrana y unos pocos aminoácidos del tallo luminal). Los inmunocomplejos fueron funcionales *in vitro*, ya que catalizaron dos pasos sucesivos de transferencia de azúcares conduciendo a la síntesis de GM1 a partir de GM3 exógeno. Experimentos de Transferencia de Energía Resonante Fluorescente (FRET) entre proteínas fluorescentes con espectros de emisión y excitación solapados (ECFP y EYFP) fusionadas a los dominios NH₂-terminales de estas transferasas evidencian que *in vivo* se ubican en íntima proximidad (menos de 6 nm) en el complejo de Golgi tal que la transferencia de energía, FRET, es posible.

X - 9 SOBREEXPRESION DE RAB11 EN CELULAS K 562 ALTERA LA LIBERACION DE EXOSOMAS.

(Overexpression of Rab11 in K562 cells alters the release of exosomes) *Savina, A., *Vidal, M y *Colombo, M.I., *IHEM-CONICET, Fac. Ciencias Médicas, U. N. Cuyo, Mendoza, Argentina, y *Univ. Montpellier, Francia.

Durante el proceso de maduración del eritrocito se pierden selectivamente ciertas proteínas de membrana, que no necesita en su estado maduro, como son la acetilcolinesterasa y el receptor de transferrina. Esta pérdida selectiva se produce mediante la liberación al medio extracelular de pequeñas vesículas llamadas exosomas. Los exosomas se forman por invaginación de la membrana endosomal dando origen a cuerpos multivesiculares (MVB), que al fusionarse con la membrana plasmática liberan los exosomas al medio externo. Datos recientes indican que la línea celular eritroleucémica K562 posee altos niveles de Rab11, proteína de la familia de GTPasas Rabs, reguladoras del tráfico intracelular. Se generaron células transfectadas estables que sobreexpresan Rab11 fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). En células transfectadas con GFP-Rab11 wt se observó un aumento de la liberación de exosomas, mientras que la sobreexpresión de Rab11 S27N, mutante dominante negativa que no une GTP, inhibió dicha liberación. La sobreexpresión de GFP-Rab11 Q70L mutante activa, generó grandes vesículas en cuyo interior se pueden visualizar vesículas pequeñas marcadas con GFP-Rab11, sugiriendo que se tratarían de MVB. Por otro lado, el número de receptores de transferrina presentes en la superficie de las células que sobreexpresan Rab11 disminuyó en forma marcada con respecto a células transfectadas sólo con el vector. Estos resultados sugieren que Rab11 participaría no sólo en el transporte de transferrina hacia los MVB sino que también estaría involucrada en la formación del MVB afectando la liberación de exosomas.

X - 10 LOCALIZACION INTRACELULAR Y ESTUDIO FUNCIONAL DE LA GTP-PROTEINA RAB24. (The GTP-binding protein Rab24: intracellular localization and functional role). *Munafó, D., *Goud, B. y *Colombo, M.I. *IHEM-CONICET, Fac. Ciencias Médicas-UNCuyo-Mendoza-Argentina y *Instituto Curie, Paris, Francia.

Hasta el momento no se conoce la función de la proteína Rab24, miembro de la familia de GTP-proteínas Rab, que participan en distintas vías del tráfico mediado por vesículas. Se generaron mutantes de la proteína Rab24 (Rab24S67N y Rab24T21N) y se realizaron ensayos in-vitro de binding con ³⁵S-GTP para caracterizar la afinidad de dichas proteínas por el GTP. Con el propósito de estudiar su distribución intracelular se subclonó cDNA-Rab24 tipo salvaje (wt) y mutantes en el vector de la proteína fluorescente verde (GFP). Se realizaron estudios de colocalización por inmunofluorescencia, usando microscopía confocal, con marcadores de diferentes compartimientos intracelulares, en células transfectadas transientes y estables. La proteína Rab24wt presentó una distribución reticular perinuclear, la mutante Rab24-S67L se distribuyó en forma difusa en el citosol, mientras que la mutante Rab24-T21N se concentró en agregados vesiculares perinucleares. Se observó colocalización parcial de la proteína wt con marcadores de Golgi (CTR433, Rab6) y retículo endoplásmico, pero la mejor colocalización se obtuvo con la proteína Rab1, marcadora del compartimiento intermedio ER-Golgi. Rab24wt también colocalizó parcialmente con MDC, marcador específico de autofagosomas.

Se desarrolló un ensayo bioquímico para medir autofagocitosis en líneas celulares estables que sobreexpresan la proteína Rab24wt y mutantes. Resultados preliminares indicarían la participación de dicha proteína en la regulación de la vía autofágica.

XI - BIOLOGIA MOLECULAR

XI - 4 CARACTERIZACION DEL RETROTRANSPON

LTR TLC1.1 DE *Lycopersicon chilense* (Characterization of TLC1.1, a LTR retrotransposon from *Lycopersicon chilense*). Ruiz-Lara, Simón; Tapia, Gerardo; Yañez, Mónica.; Verdugo, Isabel; González, Enrique. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. (Patrocinado: Dr. Enrique González). (Financiamiento Fondecyt 1980387 y Programa de Investigación en Biotecnología Vegetal DIAT-UTAL)

Los retrotransposones LTR se encuentran ampliamente distribuidos en plantas desde algas unicelulares hasta angiospermas. Estos elementos para su propagación requieren de un RNA intermediario el que posteriormente es retrotranscrito a un DNA extracromosómico e insertado en un nuevo sitio en el genoma, provocando con ello duplicación del elemento, crecimiento del tamaño del genoma y mutaciones relativamente estables que alteran la expresión génica. Aunque están ampliamente distribuidos, solo algunos de ellos presentan actividad transcripcional y menor aún es el número de elementos que presentan capacidad transposicional. La actividad transcripcional esta restringida a ciertos tejidos de la planta durante su desarrollo y durante la respuesta de defensa de la planta frente a diferentes agentes bióticos y abióticos. En trabajos previos hemos descrito la presencia de cuatro familias de retrotransposones LTR en el genoma del tomate silvestre *Lycopersicon chilense*, los que denominamos TLC1, TLC2, TLC3 y TLC4. Las cuatro familias han probado ser transcripcionalmente activas en protoplastos obtenidos a partir de hojas. En esta comunicación se describe:

- 1) El aislamiento y determinación de la secuencia nucleotídica del retrotransposón TLC1.1.
- 2) La determinación mediante análisis Northern blot y RT-PCR de la presencia de RNAs intermediarios de dicho retrotransposón frente a diferentes agentes abióticos tales como: a) protoplastización, b) estrés por heridas y c) estrés por congelamiento.
- 3) La identificación de las regiones reguladoras de la transcripción en el LTR5' del retrotransposón en estudio, mediante ensayos de expresión transitoria en protoplastos electroporados con diferentes construcciones génicas del LTR 5' y secuencias parciales de él fusionadas al gen reportero GUS.
- 4) La identificación de las putativas secuencias nucleotídicas reguladoras de la transcripción del retrotransposón TLC1.1 en la región U3 del LTR 5'.

XI-2 REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DE *Ceriporiopsis subvermispora* INVOLUCRADOS EN LIGNINOLISIS. (Regulation of the expression of genes from *Ceriporiopsis subvermispora* involved in ligninolysis.) Polanco, R.¹, Avila, M.¹, Lobos, S.² y Vicuña, R.¹. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile¹. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile².

El sistema ligninolítico de *C. subvermispora* está compuesto por las enzimas manganoso peroxidasa (MnP) y lacasa. Estas actividades son inducidas exclusivamente por Mn y cobre, respectivamente. Otros metales como Cd²⁺, Zn²⁺ y Ag⁺ no son capaces de producir este efecto. Estudios de expresión mediante Northernblot han demostrado que el gen *Cs-lcs1*, el que codifica para lacasa, es inducido específicamente por Cu²⁺ y Ag⁺. El gen *Cs-mnp2*, que codifica para MnP, es inducido exclusivamente por Mn²⁺. En las regiones promotoras de los correspondientes genes se han encontrado secuencias tipo MRE y ACE, las cuales se han descrito como sitios reconocidos por factores de transcripción activados por metales. Para detectar la existencia de proteínas que reconozcan en forma específica elementos discretos de las regiones promotoras de estos genes hemos utilizado en geles de retardo dos fragmentos de la región 5' del gen *Cs-lcs1*: uno contiene la secuencia ACE y el otro posee sitios MRE. Hasta ahora hemos observado un reconocimiento específico para ambas sondas, aunque en las condiciones ensayadas, no hemos detectado una dependencia por metales para dicho reconocimiento. Financiado por Fondecyt 2000088 y 8990004 (Líneas Complementarias).

XI-3 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS HOMOCARIOTICAS DEL BASIDIOMICETE LIGNINOLITICO *Ceriporiopsis subvermispora*. (Isolation and characterization of homokarion strains of ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*) Tello M.^a, Cullen D.^b, Vicuña R.^c, Lobos S.^a. ^a Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ^b Forest Products Laboratory, Madison Wisconsin. ^c Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile

Ceriporiopsis subvermispora es un basidiomicete ligninolítico que muestra gran multiplicidad de isoenzimas de manganoso peroxidasa (MnP) y lacasa cuando es crecido en medio salino. Algunas de estas isoenzimas presentan diferencias en sus secuencias aminoterminales, por lo que posiblemente están codificadas en genes distintos. El número exacto de genes que codifican para MnP (*Csmnp*) es desconocido y determinar si dos genes son distintos o sólo se trata de variantes alélicas es muy difícil dado que este organismo no esporula y el análisis de segregación es imposible de realizar. En este trabajo se comunica el aislamiento de cepas homocarióticas de *C. subvermispora*. Estas cepas fueron preparadas mediante preparación de protoplastos, los cuales fueron analizados mediante PCR para las variantes alélicas del gen *Csmnp2*. Estas cepas permitieron establecer que *Csmnp1* y *Csmnp3* son genes diferentes, cada uno de los cuales tiene una variante alélica que fue identificada mediante amplificación por PCR. El análisis isoelectroforético de las actividades MnP y lacasa en los homocariotes mostró un patrón simplificado con respecto a la cepa dicariótica, indicando procesamiento post-transcripcional diferentes. Esto explicaría la multiplicidad de isoenzimas encontradas en la cepa silvestre.

Financiado por FONDECYT 899004 de Líneas Complementarias.

XI-4 EL GEN DE ENDOXILANASA A DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIA Y ANALISIS TRANSCRIPCIONAL. (Endoxylanase A gene from *Penicillium purpurogenum*: sequence and transcriptional analysis). Bull. P., Schachter, K., Chávez, R., Almaraz, C., Peirano, A. y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El xilano requiere de varias xilanasas para su degradación. El hongo *Penicillium purpurogenum* secreta varias enzimas xilanolíticas, entre ellas las endoxilanasas A y B. Aquí describimos la secuenciación y el análisis transcripcional del gen de *xynA*. Con distintas estrategias de PCR se amplificó y secuenció el gen *xynA*. El gen tiene 1450 pares de bases, contiene 8 intrones y codifica para una proteína madura de 302 aminoácidos con un peso de 32 538. En la región río arriba del gen (766 pares de bases secuenciados) existen varios posibles sitios regulatorios: 3 sitios de unión para el represor CreA, 3 sitios de unión para el inductor por pH PacC y un sitio de unión para el activador específico XlnR. Además existe un sitio de unión para el factor PTA1, no descrito en genes xilanolíticos. Análisis de Northern blot de cultivos con distintas fuentes de carbono indican que el gen es reprimido en glucosa y sólo se expresa en forma aguda en presencia de xilano de cáscara de avena. No se observa expresión en xilano de abedul, xilosa o xilitol. Estos resultados muestran un patrón de expresión único respecto a otras xilanasas de hongos.

Financiamiento: FONDECYT 2990078 y 8990004 y DIPUC. R.C. es becario CONICYT.

XI-5 CLONAMIENTO Y CARACTERIZACION DE NEUROFISINA Y COPEPTIDO ASOCIADOS A LOS PRECURSORES DE ISOTOCINA-VASOTOCINA DEL TELEOSTEO *Cyprinus carpio*. (Cloning and Characterization of Neurophysin and Copeptin associated to precursors of Isotocin-Vasotocin in the teleost fish *Cyprinus carpio*). Flores, C., Muñoz, D. y Figueroa, J. E. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (E-mail: jfigueroa@uach.cl)

Isotocina y Arginina-vasotocina son nonapéptidos, generados como parte de la expresión de poliproteínas mayores que contienen varios motivos. Postulamos que uno de ellos, el copeptido, es relevante en la regulación de la expresión de prolactina desde *rostral pars distalis* de pituitaria de carpa.

Para clonar ambos genes de carpa y establecer su posible interrelación con prolactina, se derivó una región de consenso en la Neurofisina a partir de la cual se sintetizaron oligonucleótidos con los que se amplificó un fragmento de 170 pb. Este fragmento fue clonado y secuenciado para luego emplearlo como sonda. Posteriormente, se rastreó una biblioteca genómica de carpa, construida en el vector Lambda Fix-II, a partir de la cual se aislaron varios clones. El análisis de la secuencia de un clon de Isotocina, reveló la típica organización estructural de estos genes así como también la alta conservación e identidad de secuencia en la región correspondiente a la neurofisina y menor en la región del copeptido, con respecto a otras especies de peces. A partir de la secuencia aminoácida derivada de la región Neurofisina y del Copeptido asociado a ella, se sintetizaron péptidos de 16 aminoácidos, los que fueron utilizados para generar anticuerpos policlonales para estos dos motivos péptídicos. Se espera utilizar estos anticuerpos en la purificación y caracterización de Neurofisina-Copeptido.

Fondecyt 1990710

XI - 6 α -L-ARABINOFURANOSIDASA DE *Penicillium purpurogenum*: SECUENCIACION Y CARACTERIZACION DEL GEN. (α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: sequence and characterization of its gene) Carvallo, M., De Ioannes, P., Peirano, A., Schachter, K., Bull, P., y Eyzaguirre, J. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El xilano es un heteropolisacárido constituido por una cadena de xilosa sustituida por ácidos orgánicos y arabinosa. La biodegradación del xilano requiere la liberación enzimática de los residuos de arabinosa, realizada por la α -L-arabinofuranosidasa. En nuestro laboratorio hemos purificado y caracterizado esta enzima, secretada por el hongo filamentoso *Penicillium purpurogenum*. En este trabajo se presenta la secuenciación y caracterización de su gen. A partir de la secuencia N-terminal se diseñaron oligonucleótidos degenerados para amplificar por PCR el tercio inicial del gen, el cual fue secuenciado. El resto del gen fue amplificado por RACE, a partir de RNA total de un cultivo del hongo crecido en arabitol, sustrato que induce una alta expresión de la enzima. Posteriormente, el gen fue amplificado a partir de DNA genómico, por PCR. Se ha obtenido la secuencia completa del cDNA y aproximadamente un 95% del gen, sin que se haya detectado la presencia de intrones. El gen tiene un marco abierto de lectura de 1443 pares de bases, que codifica para una proteína madura de 481 residuos. El alineamiento de ésta muestra alta similitud con otras arabinofuranosidasas de hongos pertenecientes a la familia 54 de las glicosil hidrolasas.

Financiado por FONDECYT 8990004 Líneas Complementarias y DIPUC.

XI - 7 BIOGENESIS DEL COMPLEJO II DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN *ARABIDOPSIS*. (Biogenesis of mitochondrial chain respiratory complex II in *Arabidopsis*). Figueroa, P., León, G., Elorza, A. y Jordana, X. Departamento Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El complejo II (succinato deshidrogenasa, SDH) de la mitocondria contiene 4 subunidades: la flavoproteína (SDH1), la proteína hierro-azufre (SDH2), y las proteínas integrales de membrana SDH3 y SDH4. Se han identificado genes *sdh2*, *sdh3* y *sdh4* funcionales en el genoma mitocondrial de organismos inferiores. En animales todas las subunidades SDH están codificadas en el núcleo, son sintetizadas en el citoplasma e importadas por la mitocondria. La planta modelo *Arabidopsis thaliana* carece de genes *sdh* funcionales en la mitocondria, lo cual sugiere que los genes han sido transferidos al núcleo durante la evolución.

En este trabajo mostramos que el genoma nuclear de *Arabidopsis* contiene dos genes *sdh1*, tres genes *sdh2*, dos genes *sdh3* y un gen *sdh4*. Estos se transcriben y el nivel de mRNA difiere de un tejido a otro, siendo mayor en flor. Las subunidades periféricas son más conservadas a nivel de secuencia primaria que las subunidades integrales de membrana. Las subunidades SDH son importadas *in vitro* en mitocondrias y sufren el procesamiento proteolítico de su presecuencia de destinación mitocondrial. El gen *sdh3* nuclear adquirió su señal de destinación organelar desde un gen pre-existente que codifica para otra proteína mitocondrial, probablemente mediante mecanismos de duplicación y recombinación.

Financiado por FONDECYT Complementario 8980005, de Doctorado 2970071, y ECOS-CONICYT C98B01.

XI - 8 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL PRODUCTO DEL GEN W DEL BACTERIOFAGO λ . (Purification and characterization of the W gene product of the λ phage). Murialdo, H. Fundación Ciencia para la Vida. Santiago-Chile.

La morfogénesis del bacteriófago λ necesita los productos de tres distintos caminos morfogenéticos: la replicación del ADN viral, el ensamblaje de procabezas y la polimerización de colas. Una vez que el ADN ha sido debidamente procesado y translocado al interior de la procabeza, el vértice portal es sellado y la adición de la cola completa la partícula viral. El producto del gen W, gpW, es requerido para que cabezas y colas se adhieran. GpW es una proteína básica de 68 aminoácidos y es componente estructural del virion.

En esta presentación se describe la construcción de plasmidios que sobreproducen gpW y su purificación esencialmente hasta homogeneidad. La proteína es un monómero en solución con un alto contenido de α -hélice y estable a alta temperatura. El orden de la reacción en que interviene gpW, -la unión de cabezas y colas para la formación de bacteriófagos biológicamente activos-, sugiere que entre cuatro a seis moléculas de gpW participan en la reacción y son incorporadas a la estructura. FONDECYT 1980209.

XI - 9 REGULACION POR FOSFORILACION DE LA UNION DEL RECEPTOR DE $1\alpha,25$ -DIHIDROXIVITAMINA D3 AL PROMOTOR DEL GEN DE OSTEOCALCINA DE RATA (The binding of the $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 receptor to the rat osteocalcin promoter is regulated by phosphorylation). Paredes, R., Gutiérrez, J., Imschenetzky, M. y Montecino, M. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

El promotor del gen de osteocalcina (OC) contiene un elemento de respuesta a vitamina D3 (OCVDRE), al cual se une el receptor de $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D3 (VDR) como heterodímero con el receptor del ácido 9-*cis*-retinoico (RXR α). Este sitio se superpone una secuencia de unión para el factor de transcripción YY1. VDR/RXR α se une al VDRE en forma independiente del ligando y en un contexto no nucleosomal. Es así como al remodelar estos nucleosomas con el complejo SWI/SNF purificado, VDR/RXR α es capaz de interactuar. Además, hemos evaluado si la fosforilación de VDR por PKC, CK2 y ERK-1 modula su unión al promotor de OC. Mediante ensayos de retardación en gel utilizando proteínas recombinantes, se observó que YY1 se une con baja afinidad y en forma excluyente, respecto a VDR/RXR α . Al fosforilar VDR *in vitro* con PKC se inhibe la unión al promotor, a su vez que, al fosforilar RXR α con ERK1 no hay efecto en la unión del heterodímero. Postulamos que existe una regulación de la unión de YY1 y VDR/RXR α al promotor de OC mediada por fosforilación y remodelación nucleosomal, la cual permitiría la unión del factor de transcripción YY1 en condiciones de represión transcripcional.

FONDECYT1000361.

XII - MICROBIOLOGIA II

XII-1 CAPACIDADES DEGRADATIVAS DE *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134 Y JMP222 QUE CONTIENEN GENES *TFD* QUE PERMITEN LA DEGRADACION DE CLOROCATECOLES Y GENES *XYL*, QUE CODIFICAN PARA TOLUATO 1,2-DIOXIGENASA. (Degradative properties of *R. eutropha* strains JMP134 and JMP222 engineered with chlorocatechol degradation *tf**d* genes, and toluate 1,2-dioxygenase *xyl* genes). Ledger, T., Pérez-Pantoja, D., *Pieper, D.H., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE. * Div. of Microbiol. Natl. Res. Centre for Biotechnology. GBF. GERMANY.

R. eutropha JMP134 (pJP4) crece en 3-clorobenzoato (3-CB), utilizando dos módulos genéticos para la degradación de clorocatecoles: *tf**d*C₁D₁E₁F₁ y *tf**d*D₁C₁E₁F₁. Esta bacteria no crece en otros clorobenzoatos. Cuando se introdujo en el cromosoma de *R. eutropha* JMP134 una copia del mini-operón *xylS/xylXYZL*, que codifica para la toluato 1,2-dioxigenasa, de baja especificidad de sustrato y la dihidroxibenzoato deshidrogenasa, permitiendo la transformación de 4-clorobenzoato (4-CB) a 4-clorocatecol, los derivados resultantes crecieron eficientemente en 4-CB. Inesperadamente, todos estos derivados fueron capaces de crecer en 3,5-diclorobenzoato (3,5-DCB). Al introducir estos genes *xyl* en derivados de *R. eutropha* JMP222, carentes de pJP4, que contenían uno de los dos módulos *tf**d* en plasmidios de número de copia intermedio, los derivados fueron capaces de crecer en 4-CB, pero sólo aquellos que poseían el módulo *tf**d*₁, crecieron en 3,5-DCB. Estos resultados sugieren fuertemente que en *R. eutropha* existe un regulador tipo XylS, que puede inducir los genes *xyl* en presencia de 4-CB o de 3,5-DCB. Además, apoyan la idea que la maleilacetato reductasa codificada en el módulo *tf**d*₁ (*tf**d*F₁) y no en el módulo *tf**d*₂ (*tf**d*F₂), es la que juega un rol principal en la degradación de compuestos diclorados.

Financiado por FONDECYT 8990004 y una colaboración entre CONICYT y el BMBF/FZK, Karlsruhe, Alemania.

XII - 12 GENES PARA LA DEGRADACION DE 2,4,6-TRICLOROFENOLEN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134. (Genes for 2,4,6-trichlorophenol degradation in *R. eutropha* JMP134). Matus, V., Sánchez, M.A., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE.

R. eutropha JMP134 (pJP4) es una bacteria capaz de crecer en el contaminante ambiental 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF). La vía degradativa clave, dilucidada en nuestro laboratorio, implica la formación del 6-clorohidroquinol como intermediario y requiere las actividades enzimáticas 2,4,6-triclorofenol monooxigenasa (2,4,6-TCF-MO) y maleilacetato reductasa (MAR) para llevar a cabo las reacciones iniciales y finales, respectivamente. Basándose en secuencias de otros genes bacterianos del catabolismo de triclorofenoles, se diseñaron partidores para PCR que permitieron detectar la presencia de secuencias codificantes para ambas enzimas en la cepa JMP134 y también en la cepa JMP222, carente del plasmidio pJP4. Con ello se demostró la existencia de un tercer gen codificante por MAR, distinto de los dos genes MAR (*tf**d*F₁ y *tf**d*F₂), presentes en el plasmidio. Eso sí, al comparar en las cepas JMP134 y JMP222, las tasas de crecimiento y consumo de 2,4,6-TCF, se observó una diferencia significativa a favor de la primera, indicando la participación de las funciones plasmidiales en esta capacidad degradativa. Por otra parte, mediante cultivos de aislamiento por enriquecimiento en 2,4,6-TCF de muestras de suelo, se observó una selección de microorganismos, determinado por un número menor de señales más abundantes que arroja el análisis mediante polimorfismos de fragmentos de restricción terminales (T-RFLP), con partidores bacterianos para rDNA 16S. En estas muestras se verificará la presencia de bacterias que porten secuencias para 2,4,6-TCF-MO y MAR, usando los partidores desarrollados para su detección en *R. eutropha* JMP134.

Financiado por los proyectos FONDECYT 8990004 y 2980041.

XII - 3 EFECTO DEL REORDENAMIENTO DE GENES *TFD* EN EL CATABOLISMO DE CLOROAROMATICOS EN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134. (Effect of the *tf**d* gene rearrangement in chloroaromatic catabolism in *R. eutropha* JMP134). Clément, P., Manzano, M., Trefault, N. de la Iglesia, R., *Pieper, D., & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. CHILE. * Div. of Microbiol. Natl. Res. Centre for Biotechnology. GBF. GERMANY.

R. eutropha JMP134 (pJP4) crece en contaminantes como el 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) y el 3-clorobenzoato (3-CB). Los genes catabólicos claves están ubicados en el pJP4, un plasmidio de 88 kb, en dos módulos genéticos (*tf**d*₁ y *tf**d*₂) no idénticos y redundantes, que se complementan entre sí. Cuando el pJP4 se integra en el cromosoma, la cepa derivada continúa creciendo en 2,4-D, pero deja de hacerlo en 3-CB. En cambio, cuando la cepa silvestre es sometida a una presión selectiva con mayor concentración de 3-CB, se obtiene un derivado que crece mejor en 3-CB, pero deja de crecer en 2,4-D. Se ha caracterizado cada uno de estos derivados. La integración cromosomal de pJP4 se produce a nivel de la secuencia de inserción ISJP4, la que se duplica, dejando separados por más de 90 kb, a los dos módulos genéticos. Esta separación y/o la disminución de número de copias de los genes plasmidiales, producto de la integración, hacen limitante la expresión de los genes necesarios para crecer en 3-CB. En concordancia con lo anterior, ambos módulos genéticos se duplican, formando parte de una repetición invertida de cerca de 22 kb, en un derivado de pJP4 presente en la cepa que crece a mayor concentración de 3-CB. En la formación de esta larga repetición invertida, producida posiblemente por un doble entrecruzamiento entre dos moléculas de pJP4, se produce la delección de parte del plasmidio, lo que explica la pérdida de la capacidad para crecer en 2,4-D, observado en este derivado.

Financiado por FONDECYT 8990004 y una colaboración entre CONICYT y el BMBF/FZK, Karlsruhe, Alemania.

XII-4 EFECTO DE LA DOSIS GENICA DE LAS ENZIMAS DE LA VIA DEGRADATIVA DE CLOROCATECOLES EN *RALSTONIA EUTROPHA* JMP134. (Gene dosage effect of the chlorocatechol pathway enzymes in *R. eutropha* JMP134). Pérez-Pantoja, D., Saavedra, M., Ledger, Th. & González, B. Dept. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago. Chile.

R. eutropha JMP134 (pJP4) crece en 3-clorobenzoato (3-CB). Los clorocatecoles formados durante la degradación de 3-CB son transformados hasta β -cetoadipato mediante una vía compuesta de cuatro enzimas: clorocatecol 1,2-dioxigenasa, cloromuconato cicloisomerasa, dienolactona hidrolasa y maleilacetato reductasa. Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en el plasmidio pJP4 organizados en dos operones homólogos, denominados módulo I y módulo II, cada uno conteniendo el conjunto de los cuatro genes. Cuando cada módulo fue independientemente clonado bajo el control de su regulador en un vector de número de copias intermedio, y estas construcciones fueron introducidas en *R. eutropha* JMP222, carente del pJP4, ambos derivados fueron capaces de crecer en 3-CB. Sin embargo, cuando estos módulos fueron insertados en el cromosoma de la cepa JMP222, los derivados fueron incapaces de crecer en 3-CB. El análisis de la expresión de las enzimas de cada módulo indicó que las tres primeras enzimas del módulo II eran menos activas que las correspondientes del módulo I. En cambio, la cuarta enzima del módulo II resultó mucho más activa que la correspondiente del módulo I. Estos antecedentes hacen suponer que habría uno o más pasos limitantes en esta vía metabólica, los que son resueltos mediante una mayor dosis génica. Esto se confirmó cuando cada uno de los genes de las enzimas más activas fue clonado por separado bajo el control de su regulador, e introducido en múltiples copias, en derivados de la cepa JMP222 que contenían una copia cromosomal del módulo I.

Financiado por FONDECYT de Líneas Complementarias 8990004

XII-5 ORGANIZACION Y EXPRESION TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES NECESARIOS PARA LA PRODUCCION DE MICROCINA E492 ACTIVA (Expression and transcriptional Organization of the genes necessary for the production of active microcin E492) Corsini, G.* y Lagos, R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La microcina E492 es un antibiótico polipeptídico de *M*, 7000 producido y secretado por *Klebsiella pneumoniae* RYC492. A diferencia de otras bacteriocinas, la microcina E492 se sintetiza en forma activa sólo en fase exponencial de crecimiento, y esta regulación no está asociada al factor sigma de fase estacionaria (*rpoS*).

Los determinantes genéticos necesarios para la producción de microcina E492 activa fueron clonados, secuenciados y expresados de *E. coli*. Los genes *mceA-B* participan en la síntesis e inmunidad de la microcina, los genes *mceF-G-H* en la exportación y los genes *mceC-D-I-J* están implicados en la maduración de la microcina.

En este trabajo se determinó la organización transcripcional de estos genes, la cual está compuesta por 7 unidades transcripcionales: *mceBA*, *mceC*, *mceD*, *mceE*, *mceF*, *mceHG* y *mceJIHG*. Se caracterizaron las secuencias promotoras de estas unidades transcripcionales y se analizaron sus patrones de transcripción en distintas etapas de crecimiento y condiciones de cultivo. Se determinó que los genes *mceA-B-C-E-F-G-H* se transcriben tanto en fase exponencial como estacionaria de crecimiento. En cambio, para los genes *mceD-I-J*, se observó una disminución en su expresión en fase estacionaria. La disminución de la transcripción de estos genes, daría cuenta de la pérdida de producción de microcina activa en fase estacionaria.

FONDECYT 1991017 y 2000016. * Becario CONICYT.

XII-6 ESTUDIO GENETICO MOLECULAR DEL GEN DE FITOENO DESHIDROGENASA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Molecular genetic study of the phytoene deshydrogenase gene from *X. dendrorhous*. León, R.; Barahona, S.; Sepúlveda, D.; Quatrini, R.; Alcaíno, J.; Martínez, C. y Cifuentes, V. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. email: vcifuent@uchile.cl

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura carotenogénica que sintetiza astaxantina cuya ruta de biosíntesis ha sido determinada a partir del análisis químico de sus intermediarios. En este trabajo se describe el aislamiento y caracterización del gen *ATX3* que codifica la enzima fitoeno deshidrogenasa aislado de un fragmento *Bam*HI de 18,5 kb de la genoteca de la cepa silvestre. Un sub fragmento de 3,6 kb fue secuenciado e indica que el gen tiene un tamaño de 2,8 kb. El análisis de su secuencia indica que la región codificante corresponde a una proteína de 582 aa y está interrumpida por 11 intrones. Se observan dos zonas conservadas de unión a nucleótido y a fitoeno respectivamente y su perfil de hidrofobicidad sugiere 7 regiones unión a membrana. Adicionalmente, tiene homología con fitoeno deshidrogenasas de hongos y bacterias.

Análisis de cariotipo electroforético e hibridación de DNA asociado a mapeo de restricción sugieren que el gen se encuentra en un fragmento *Pst*II de aproximadamente 30 kb en copia única en el genoma. La transformación de la cepa silvestre con una delección del gen produce colonias pálidas y la re-transformación de los clones pálidos con la misma delección resulta en la generación de clones albinos. El análisis por PCR de los clones transformantes indica que los clones pálidos son heterocigotos y los albinos son homocigotos. Estos resultados dan evidencia que indica que *X. dendrorhous* es un organismo naturalmente diploide.

Financiado por DID ENL 2000/17 U. de Chile.

XII-7 EFECTO DE LA DEHIDROLEUCODINA SOBRE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* EN CULTIVO. (The effect of Dehydroleucodine on cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*) Jiménez Ortiz, V.^{1,2}, Sosa M.A.¹, Giordano O.², Galindo, M.³, Galanti N.³ ¹IHEM, UNCuyo; ²ICBM- Facultad de Medicina, U. de Chile; ³Cat. Qca. Orgánica, UNSL.

La dehidroleucodina (DhL) es un principio activo extraído de la planta *Artemisia douglassiana*, que responde a una estructura de sesquiterpeno lactona. Basándonos en la actividad antiprotozoaria descrita para otros extractos naturales, hemos estudiado el efecto de esta droga purificada, sobre cultivos de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

Epimastigotes de la cepa tulahuén fueron cultivados en medio Diamond a 28° C y tratados con distintas concentraciones de DhL (1-20 ug/ml). A las 24 horas de tratamiento, concentraciones de 2,5 y 5 ug/ml de DhL son efectivas para inhibir la proliferación de los epimastigotes. A concentraciones superiores a 5 ug/ml, DhL induce la muerte de los parásitos, observándose cambios morfológicos importantes tales como alteración de la forma, vacuolización citoplasmática y picnosis nuclear y lisis celular.

El efecto antiproliferativo y la inducción de muerte celular, fueron dependientes de la concentración y el tiempo de exposición a la droga, y hemos determinado en forma precisa las dosis de DhL para provocar la inhibición de la proliferación y/o la muerte celular. Además se realizó un estudio detallado sobre la estabilidad de la droga en el medio de cultivo y confirmamos que el efecto inhibitorio se debe a la acción de la DhL y no a la acción de los solventes utilizados como vehículo. Ensayos previos mediante incorporación de leucina tritiada indican que la DhL no afectaría la síntesis proteica de *T. cruzi*.

Estos resultados indican que DhL podría ser utilizada como una droga en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Nos proponemos estudiar el mecanismo de acción de DhL y el

XII - 8 ASPECTOS CELULARES DE LA DIFERENCIACION POST-LARVAL DE *Mesocostoides corti*. (Cellular aspects of the post-larval differentiation of *M. corti*). Espinoza, J.; Ferrer, S; Galindo, M. y Galanti, N.. Lab. de Biología Molecular, Prog. de Biología Celular y Molecular, I.C.B.M., Facultad de Medicina, Universidad. de Chile.

Mesocostoides corti, es un platelminto parásito perteneciente a la clase Céstoda. En su ciclo de vida presenta dos formas morfológicamente diferenciables, una forma larval que parasita a reptiles y roedores y una forma adulta que parasita a mamíferos carnívoros. En este parásito se conoce poco acerca de su diferenciación y desarrollo debido, en parte, a su condición de endoparásito obligado y a su complejo ciclo de vida. Para superar esta limitación, hemos desarrollado un sistema de cultivo *in vitro* en el cual inducimos el desarrollo de *M. corti* hasta el estado adulto, utilizando un tratamiento con tripsina por 24 horas, en medio RPMI 1640 con suero fetal de bovino 20%. El estudio de las larvas así tratadas, se prolongó por 14 días obteniendo muestras cada 24 horas. Utilizando este protocolo obtenemos al 5º día post-tratamiento con la proteasa, larvas segmentadas y al 10º día, gusanos adultos con órganos reproductores, que caracterizan al estado. Con el fin de caracterizar los cambios celulares producidos durante la diferenciación del parásito, se realizó un estudio morfológico a través de microscopía óptica y electrónica de transmisión y de barrido. La actividad proliferativa del parásito fue caracterizada mediante la incorporación y cuantificación de timidina-³H en el ADN y mediante análisis autorradiográfico en cortes histológicos. Los datos disponibles muestran una disminución de la actividad proliferativa del parásito al 5º día post-tratamiento con tripsina, coincidente con el día en que se produce su segmentación. Estos resultados sugieren que ambos procesos están, al menos, temporalmente desacoplados durante el desarrollo del parásito.

Este análisis celular y molecular, nos ha permitido identificar territorios celulares en el parásito que están en activa proliferación y que pueden participar en la ulterior diferenciación del mismo. El establecimiento de esta relación nos permitirá identificar los genes que regulan estos procesos y posteriormente su localización *in situ*. Financiado por Proyectos: Andes-Antorcha-Vitae, SAREC, DID-U. Chile I013/2

XII - 9 ROL DE LA SACAROSA SINTASA EN CIANOBACTERIAS (Sucrose synthase role in cyanobacteria). Curatti, L.¹, Flores, E.² y Salerno, G.L.¹ - ¹Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600 - Mar del Plata - Argentina; ² IBV y F-CSIC-Sevilla-España - fibamdq@infovia.com.ar

El metabolismo de la sacarosa ha sido ampliamente estudiado en plantas superiores, en contraste con lo que se conoce en microorganismos. Recientemente, hemos reportado la purificación y caracterización bioquímica de la sacarosa sintasa (SuS) de *Anabaena* sp. PCC 7119 y posteriormente el aislamiento del gen que la codifica (*susA*). A partir de distintas evidencias, se ha adjudicado a SuS la síntesis de sacarosa durante la fijación de dinitrógeno en cianobacterias. En este trabajo se ha investigado el rol de SuS en *Anabaena* sp. PCC 7119. Tanto la actividad enzimática, como los niveles de su proteína (determinado por inmunoanálisis) y de sus transcritos (por RT-PCR competitiva y extensión del cebador) fueron menores durante la fijación de dinitrógeno que en células creciendo en nitrógeno combinado. Se aislaron mutantes por inserción (*susA*-) que son capaces de crecer en condiciones diazotróficas a una tasa similar a la cepa original. La cepa mutante presenta varias veces incrementados los niveles de sacarosa. Estos resultados indican que SuS no actúa en la síntesis sino en el clivaje de sacarosa, y queda por establecer si la disminución de la expresión de SuS está relacionada con la fijación de nitrógeno a través de la regulación de los niveles de sacarosa en células vegetativas.

Apoyado por ANPCyT, FIBA, UNMdP, CONICET

XII - 10 AISLAMIENTO DE MUTANTES EN EL GEN *tonB* QUE COMPLEMENTAN MUTACIONES EN EL GEN DE INMUNIDAD A MICROCINA E492. (Isolation of mutants on *tonB* gene that revert mutations on immunity gene to microcin E492). *Baeza, M., Monasterio O. y Lagos R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La microcina E492 es una bacteriocina cuyo mecanismo de acción es por la formación de canales iónicos en la membrana citoplasmática de las bacterias sensibles, y que requiere de la proteína TonB para su translocación/inserción en la membrana. La cepa productora de esta microcina se protege de la autodestrucción mediante la síntesis de una proteína de inmunidad (MceB), que es integral de membrana. La acción protectora de esta, podría ser mediante una interacción con TonB, impidiendo la translocación/inserción de la microcina en la membrana, o por una interacción directa con la microcina E492 que neutraliza su acción.

Para dilucidar el mecanismo de MceB, se realizó mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina y se aislaron cuatro mutantes puntuales que resultaron en una pérdida de la inmunidad. Las mutantes presentaron un cambio conservado de un residuo de alanina por una valina en la posición 17 (1 mutante) y 77 (3 mutantes). De acuerdo con la predicción topológica de MceB estos cambios estarían ubicados en la primera y tercera hélice transmembrana respectivamente. La naturaleza de los cambios nos sugiere una interacción específica, por lo que se investigó la posibilidad de encontrar mutantes compensatorias en TonB. Se aislaron 16 mutantes en TonB que recuperan la inmunidad. La caracterización de estas mutantes nos permitirá definir la posible interacción de TonB con MceB.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1991017 y 2990028. *Becario CONICYT

XIII - BIOMEDICINA

XIII - 1 ESTUDIO CLINICO-GENETICO MOLECULAR DE LA FIBROSIS QUISTICA EN LA V REGION, CHILE

(Molecular genetics and clinical study of cystic fibrosis in the V region, Chile). Molina, G.¹; González, F.¹; Cave, R.²; Deglin, M.³; Millinarski, A.³; Carvallo P.⁴. ¹Laboratorio de Biología y Genética Molecular, ²Laboratorio de Inmunología, ³Departamento de Pediatría, Universidad de Valparaíso; ⁴Laboratorio de Genética Molecular Humana, Pontificia Universidad Católica de Chile. Socio Patrocinante Dra. Pilar Carvallo.

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad hereditaria letal más frecuente en poblaciones caucásicas. En Chile, se ha estimado una incidencia de 1:4000 recién nacidos, basándose en la composición étnica. El diagnóstico se efectúa por una concentración de cloro en el sudor > 60 Meq/L. Es causada por mutaciones en el gen CFTR, siendo la más común $\Delta F508$. En poblaciones étnicamente similar a la nuestra, $\Delta F508$ es la mutación mas frecuente seguida por G542X. Previamente se había reportado en pacientes chilenos, una frecuencia de $\Delta F508$ de 29.2 %. Nuestro objetivo es la detección de las mutaciones presentes en CFTR, en 14 pacientes con un diagnóstico clínico concluyente de FQ. Los 14 pacientes presentan cuadros respiratorios recurrentes, acompañado mayoritariamente por mala absorción y electrolitos en sudor alterados. En 11 pacientes, se encontraron valores normales de inmunoglobulinas séricas, linfocitos totales, CD3⁺, y B. Las mutaciones $\Delta F508$, G542X y N1303K fueron analizadas mediante RFLP-PCR. Se detectó la mutación $\Delta F508$ en 5 cromosomas y la mutación G542X en 2. Esta es la primera vez que se detecta la mutación G542X en la población chilena. Proyecto Apertus.

XIII - 2 ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO, EN PACIENTES CON INSENSIBILIDAD PARCIAL A LA HORMONA.

(Molecular study on the growth hormone receptor gene in patients with partial GH insensitivity) ¹Sjöberg, M., ¹Espinosa, C., ¹Dagnino, A., ²Salazar, T., ²Cassorla, F., ²Mericq, V., ¹Carvallo, P. ¹Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, ²IDIMI, Universidad de Chile, Santiago.

Defectos en la hormona de crecimiento (GH), o su receptor (GHR) constituyen algunas de las causas conocidas de la talla baja severa, como es el caso del síndrome de insensibilidad a GH (IGH o síndrome de Laron). El síndrome IGH o de Laron es causado por mutaciones, que se presentan comúnmente en forma homocigota en el gen GHR. Diversos niños presentan una talla baja no patológica, llamada idiopática, que podría estar causada por alteraciones menores en la GH o su receptor. En este trabajo se analizó de la secuencia codificante del gen GHR en 26 pacientes chilenos, con talla baja idiopática, con el fin de analizar la presencia de mutaciones. Se extrajo DNA genómico de cada paciente, y se amplificaron por PCR los exones 2 al 10 del gen GHR. Cada uno de los fragmentos amplificados fueron analizados por la técnica de SSCP, y posteriormente secuenciados. Se detectaron dos cambios polimórficos, uno correspondiente a una transición de A-G en la tercera posición del codón 168, en el exón 6, presente en 6 pacientes. El segundo corresponde a una transversión C-A en la primera posición del codón 526, en el exón 10, encontrada en 13 pacientes. Además se encontró una mutación presente en un paciente y en su padre en forma heterocigota, que corresponde a una transición C-T en la primera posición del codón 161, en el exón 6. La mutación genera un cambio aminoácido de arginina por cisteína en una región del dominio extracelular del receptor que presenta 7 cisteínas. Interesantemente esta mutación fue descrita previamente en pacientes con IGH, en forma homocigota, y ahora se encuentra en forma heterocigota en un paciente con insensibilidad parcial a GH. (Fondecyt 197-0276)

XIII - 3 RELACION ENTRE NGF Y SU RECEPTOR DE BAJA AFINIDAD (p75NGFR) CON LA GENERACION DE QUISTES OVARIOS (The relationship between NGF and its low affinity receptor (p75NGFR) with the generation of cystic ovaries) Avalos AM, Lara HE, Fiedler, JL. Laboratorio de Neurobioquímica. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Chile.

El síndrome de ovario poliquístico (PCOS) afecta a la mujer frecuentemente y está asociado con alteraciones endocrinas y anovulación. La administración de valerato de estradiol (EV) en ratas produce una condición de ovario poliquístico similar al PCOS humano. En este modelo ocurre un aumento en la síntesis y liberación de noradrenalina desde los terminales nerviosos simpáticos que inervan el ovario y también se producen cambios en los niveles ováricos del factor de crecimiento nervioso (NGF) y de su receptor p75NGFR, los que podrían mediar la generación de quistes ováricos.

El objetivo de este estudio fue verificar, en ratas denervadas con guanetidina (GD), si el EV es capaz de inducir cambios en el contenido de NGF y en la expresión de p75NGFR que podrían relacionarse con la formación de quistes en ausencia de innervación simpática. Encontramos que el tratamiento con GD aumentó el contenido de NGF, sin modificar la expresión de p75NGFR. El tratamiento con EV disminuyó el contenido de NGF y aumentó significativamente la expresión de p75NGFR. El tratamiento con GD y EV produjo resultados similares al EV. En conclusión, el efecto del EV prima por sobre el efecto de la GD y estaría asociado con un aumento temprano en la expresión de p75NGFR, lo cual regularía la disminución del NGF y podría comandar la formación de quistes ováricos en ausencia de innervación simpática.

Fondecyt 199-0771, DID Sal 002/2

XIII - 4 ACTIVIDAD METALOPROTEINASICA ANORMAL EN PACIENTES CON PARAPARESIA ESPASTICA TROPICAL

(Abnormal metaloproteinase activity in patients with tropical spastic paraparesis). Vasquez¹E, Collados¹L, Kettlun¹ AM, García¹ L, Salgado¹ S, Cartier² L, Valenzuela¹ MA. ¹Depto Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Univ. Chile; ²Depto Ciencias Neurológicas, Fac. Medicina. Univ. Chile.

La modificación proteolítica de la superficie neuronal por actividad metaloproteinásica de matriz extracelular (MMP) sería relevante en la regeneración neuronal. La paraparesia espástica tropical (PET) asociada al retrovirus HTLV-1, muestra la degeneración axomiélica en los haces corticoespinales de la médula espinal, vinculada con la infección de los linfocitos T.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el tipo de actividad MMP presente en el líquido céfalorraquídeo (LCR) de pacientes con PET (23 casos) con controles (23 casos). Esto se realizó mediante zimografía para las MMP-2 y MMP-9 e "immuno dot" para MMP-3. El posible daño de la barrera hematoencefálica se detectó cuantificando la albúmina humana mediante electroforesis capilar. A su vez los cambios relativos de los TIMPs (inhibidores tisulares de las MMPs) se determinaron mediante "immunowestern blot".

En el LCR de todos los individuos estudiados se detectó MMP-2, en cambio sólo en pacientes con PET se observó MMP-9, la que mostró diferencias en la intensidad entre pacientes. La presencia de MMP-3 en los pacientes con PET fue más evidente, en cambio fue difícilmente detectada en los controles. También se observó un aumento de los niveles de los TIMPs comparado con los valores promedios de los controles.

Financiado por Fondecyt 1000-874.

XIII – 5 ALELOTIPIFICACION A TRAVES DE TODO EL GENOMA EN CANCER DE LA VESICULA BILIAR (CVB) (Genome-wide allelotyping analysis in gallbladder carcinoma). Wistuba I, Tang M, Maitra A, Alvarez H, Troncoso P, Pimentel F, Gazdar A. Deptos. de A. Patológica y Cirugía, Facultad de Medicina, P. Univ. Católica de Chile; Hamon Center, UT-Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. (FONDECYT 1990489).

El CVB es una de las neoplasias con más alta mortalidad en Chile. Existe escasa información acerca de las alteraciones genéticas involucradas en su patogenia. La identificación de genes supresores de tumores (GST) relevantes en una neoplasia incluye el estudio de delecciones de las regiones cromosomales que los contienen, conocido como an lisis de pérdida de heterocigocidad (PH) o alelotipificación. Nuestro objetivo fue determinar el patrón de PH en CVB a través de la alelotipificación de todo el genoma humano para identificar GST potencialmente importantes en su patogenia. Se realizó alelotipificación de ADN extraído de tejido microdisecado de 24 CVB mediante amplificación por PCR de 170 marcadores microsatélites localizados en todos los brazos cromosomales autosómicos no acrocéntricos y el cromosoma X. Se determinó una alta tasa de PH en CVB, expresada por el índice de fracción de pérdida de alelo (promedio 43%). Trece brazos cromosomales (3p, 6q, 7q, 8p, 9p, 9q, 11q, 12q, 17p, 18q, 19p, Xq, 22q) presentaron una muy alta frecuencia (>60%) de PH. Se identificaron a lo menos 22 regiones cromosomales ("hot-spots") con frecuencia de PH >50%, algunas de las cuales contienen GST potenciales o conocidos. Nuestros resultados proveen información acerca de las regiones cromosomales ("hot-spots") que pueden contener GST potencialmente relevantes en la patogenia del CVB. La determinación del papel de estos genes en CVB es fundamental para el conocimiento de su patogenia y el diseño de futuras estrategias en la detección precoz y en eventuales terapias génicas en esta neoplasia.

XIII – 6 PROBABLE MECANISMO CONDUCTENTE A LA OBLITERACION DEL ACUEDUCTO CEREBRAL EN EL RATON MUTANTE *hyh* QUE DESARROLLA HIDROCEFALIA CONGENITA. (Probable mechanism leading to the obliteration of the cerebral aqueduct in the mutant mouse *hyh* developing congenital hydrocephalus). Wagner, C., Rodríguez, EM., Rodríguez, S.

La hidrocefalia congénita humana y de otras especies mamíferas puede ser del tipo comunicante o no comunicante. Esta última se caracteriza por la obstrucción de conductos cerebrales estrechos, como el acueducto de Silvio (AS). Se ha postulado que la obliteración del AS es la causa primaria de la hidrocefalia congénita. Se ha observado que en ratones hidrocefálicos de la cepa *hyh* recién nacidos coexiste una hidrocefalia moderada con un AS caudal comunicante. Esto indica que la obliteración del AS caudal no es causa primaria de hidrocefalia. Además, en crías hidrocefálicas de PN-5 se observó obliteración del AS caudal. Estos hallazgos nos llevaron a realizar un estudio morfológico en crías de ratones heterocigotos entre los días PN-2 y PN-4, para detectar el momento en que se produce la obliteración del AS caudal y obtener evidencias que clarifiquen el mecanismo involucrado en ella. Se observó que las crías hidrocefálicas de todas las edades estudiadas, presentaron denudamiento endimario en zonas bien delimitadas. Un animal PN-4 presentó hidrocefalia moderada coexistente con un AS caudal comunicante, pero con denudamiento endimario de sus paredes. Este hallazgo indica que el denudamiento endimario es un evento que precede a la obliteración del AS caudal. Ninguna de las crías *hyh* presentó fibra de Reissner en el AS, a diferencia de sus hermanas normales. Esto sugiere que una alteración del complejo órgano subcomisural-fibra de Reissner coexiste con el denudamiento endimario del AS o lo precede.

Proyecto FONDECYT-1000435.

XIII – 7 CAMBIOS GENETICOS TEMPRANOS EN PIEL HUMANA NORMAL CON EXPOSICION SOLAR CRONICA (Early genetic changes in normal human skin with chronic sun exposure). Brown, N., Carvallo, C., Graumann, R., González, S., Molgó, M., Alvarez, M., y Ziegler, A. Programa de Cáncer, P. Universidad Católica de Chile (Patrocinante: P. Carvallo)

En cáncer de piel no-melanocítico, 23% de los carcinomas de células escamosas (CCE) y 31% de las queratosis actínicas premalignas (QA), presentan pérdida de heterocigocidad en el cromosoma 3p. La mutación del gen supresor de tumores p53 es frecuente en ambas lesiones (>60%) y constituye un cambio genético temprano. Para estudiar las alteraciones tempranas que llevan al desarrollo de CCE y QA, analizamos 33 pares de biopsias de piel humana normal tomadas de una zona expuesta y de una protegida del sol, respectivamente. El análisis de pérdida de heterocigocidad reveló delecciones sólo en piel expuesta: 5/23 (22%) muestras tuvieron pérdida en 3pter-p24.2, y 2/15 (13%) en 3p24.2-p22. Se midió la actividad de telomerasa en extractos de cada biopsia por la posible existencia de un gen represor en 3p. No hubo una diferencia significativa entre la actividad en pieles expuestas y no expuestas, ni una correlación entre actividad y pérdidas cromosomales en 3p. Finalmente, la sobreexpresión de p53 en los tejidos fue 3 veces más frecuente en piel expuesta que en piel no expuesta, concordante con una mayor frecuencia de mutación de p53. Los datos sugieren que en cáncer de piel no-melanocítico las pérdidas cromosomales en 3p son un evento temprano que puede preceder la mutación de p53. Fondecyt 1980926.

XIII – 8 CELULAS PRODUCTORAS DE MMPs EN GLANDULAS LABIALES DE PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN Y SU ACCION PROTEOLITICA SOBRE MOLECULAS DE MEC. (Detection of metalloproteinases producing cells in labial glands of patients with Sjögren's syndrome and its proteolytic action on ECM). Pérez, P., Alliende, C., Goicovich, E., Aguilera, S., Leyton, C. y González, MJ. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile, clínica INDISA.

El síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatía que afecta a las glándulas salivales (GS). Estas presentan infiltración linfocitaria, autoanticuerpos y pérdida de funcionalidad. Tradicionalmente, se ha considerado al infiltrado inflamatorio responsable de la destrucción del parénquima glandular. Sin embargo, ratones NOD, que desarrollan esta patología, cuando se cruzan con ratones *scid*, la progenie exhibe daño glandular en ausencia de infiltrado inflamatorio. Además, presentan altos niveles de MMPs, enzimas que participan en el remodelamiento de la MEC. En GS de pacientes con SS encontramos niveles elevados de actividad gelatinolítica de MMP-9 y niveles bajos de MMP-2, sugiriendo que estas enzimas podrían estar involucradas en el daño glandular observado en el SS. Considerando estos antecedentes decidimos investigar las células que producen MMPs y confirmar la capacidad de homogeneizados glandulares de pacientes para degradar moléculas de MEC. Con este propósito, en biopsias de pacientes con SS e individuos controles se detectaron por inmunohistoquímica las MMPs 2, 3 y 9; y se realizaron ensayos de degradación para colágeno IV, laminina y fibronectina. Las tres enzimas se detectaron exclusivamente en células acinares y ductales. En pacientes se observó marcada inmunoreactividad para MMP-3 y 9, mientras MMP-2 mostró baja intensidad en ambos grupos, correlacionándose con la actividad gelatinolítica. Los ensayos de degradación de sustrato revelaron una elevada actividad proteásica en los homogeneizados de pacientes para las moléculas estudiadas. Estos resultados sugieren que MMPs presentes en acinos y ductos degradarían la lámina basal, gatillando la destrucción del parénquima glandular.

Parcialmente financiado por laboratorios Tecnofarma y Chile.

XIII - 9 DESORGANIZACION DE LA LAMINA BASAL DE ACINOS Y DUCTOS DE GLANDULAS LABIALES DE PACIENTES CON SINDROME DE SJÖGREN (Disorganization of the basal lamina in acini and ducts of labial glands of patients with Sjögren's syndrome). Molina, C.; Aguilera, S.; Fernández J.; Olea N. Alliende, C.; Leyton, C.; Pinto, R. y González, M.J. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Universidad de Chile y Clínica INDISA.

Para la integridad estructural y funcional de los epitelios es fundamental la interacción de la célula epitelial con la lámina basal. En el síndrome de Sjögren las glándulas salivales experimentan una pérdida progresiva del parénquima glandular. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que los homogeneizados de las glándulas salivales de estos pacientes presentan un incremento importante en la actividad gelatinolítica de MMP-9, enzima que degrada colágeno IV, componente de lámina basal.

En este trabajo evaluamos si la destrucción del parénquima glandular está correlacionada a alteraciones en su lámina basal. Para esto se utilizaron biopsias de pacientes con síndrome de Sjögren y de individuos controles, por métodos inmunohistoquímicos se detectó la presencia y distribución de colágeno IV y laminina. Además las muestras se analizaron por microscopía electrónica.

En los individuos controles la lámina basal se presentó como una línea de inmunoreactividad intensa y de límites definidos alrededor de acinos y ductos. En los pacientes con síndrome de Sjögren se observaron alteraciones en la intensidad y distribución de inmunoreactividad para colágeno IV y laminina. Estos cambios se presentaron solamente en acinos y ductos y no afectaron la lámina basal de otras estructuras, esto sugiere que se trata de un proceso degradativo localizado. Las alteraciones en la lámina basal no se correlacionaron con la presencia de infiltrados inflamatorios. El análisis de la microscopía electrónica mostró una desorganización importante de la lámina basal y en algunas zonas esta estructura estaba completamente ausente, confirmando los hallazgos inmunohistoquímicos.

Estos resultados junto a aquellos obtenidos por otros autores en modelos experimentales permiten postular que un daño inicial en la interacción célula exocrina-lámina basal podría desencadenar una cascada de eventos que gatille en parte la pérdida en la homeostasis glandular.

Parcialmente financiado por DID-053 1998, U de Chile, Labs. Chile y Tecnofarma.

XIII - 10 DESTINACION ANORMAL DE PROTEINAS DE MEMBRANA PEROXISOMAL EN CELULAS HUMANAS MUTANTES EN LA BIOGENESIS PEROXISOMAL. (Abnormal targeting of peroxisomal membrane proteins in human peroxisomal biogenesis mutant cells) Toro, A., Araya, C., Perez, C. Venegas, A., Koenig, C. y Santos, M. J. Departamento de Biología Celular y Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Las afecciones a la biogénesis peroxisomal (ABP) corresponden a un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas, que producen múltiples defectos en la función peroxisomal. A nivel morfológico, la gran mayoría de las líneas celulares derivadas de pacientes con ABP, presentan fantasmas peroxisomales (FPs), en lugar de peroxisomas normales. Estos FPs se caracterizan por poseer la capacidad de importar proteínas de membrana peroxisomal (PMPs), pero no proteínas de matriz (Santos et al. Science 239: 1536-1538 (1988). Sin embargo, estudios recientes han reportado la ausencia de FPs en algunos pacientes con ABP. Ello reviste gran interés, ya que ello podría ayudar a descifrar etapas de la biogénesis de PMPs.

Aquí describimos 2 líneas celulares de pacientes con ABP que presentan ausencia de FPs. En ellas, el nivel de las proteínas PMP70 y PMP22, era normal, concentrándose en la fracción organelar. Sorprendentemente, los fibroblastos de estos pacientes presentaron la PMP53, localizadas erróneamente en las mitocondrias. Además, estas líneas celulares pertenecen a nuevos grupos de complementación genética y complementan entre sí. Proponemos un modelo para explicar cómo estas 2 líneas celulares, con distintos genes afectados, presentan PMPs erróneamente en las mitocondrias.

Financiamiento FONDECYT 1980978.

XIV - EXPRESION GENICA Y TRANSDUCCION DE SEÑALES

XIV - 1 CaMK Y MAPK PARTICIPAN EN LA EXPRESION DE PROTEINAS SINAPTICAS (CaMK and MAPK are involved in the synaptic protein's expression). Mendoza I., García C.J., Awad Y., García-Olivares J., Tonk E. y Cárdenas A.M. Laboratorio de Farmacología, Escuela de Medicina y Centro de Neurociencia de Valparaíso, Universidad de Valparaíso, Chile. Financiado por Fondecyt 1991018 y Centro de Neurociencia de Valparaíso. Patrocinio: Dr. Gustavo González.

Examinamos las vías de transducción de señales involucradas en la inducción de la expresión de la proteína presináptica SNAP-25, utilizando inhibidores selectivos de protequinasas. La incubación de células cromafines en un medio enriquecido en K^+ (38 mM) durante 48h aumentó $2.2 \pm 0.3\%$ ($n=12$) la expresión de SNAP-25. Esta elevación en los niveles de la proteína fue reducida por los inhibidores de la calmodulinkinasa (CaMK), KN62 (10 μ M) y KN93 (10 μ M) en un $70 \pm 9\%$ ($n=7$) y en un $88 \pm 11\%$ ($n=5$), respectivamente. KN92 (10 μ M), análogo inactivo de KN93, inhibió en un $29 \pm 5\%$ ($n=3$). Los inhibidores de la proteinkinasa activada por mitógenos (MAPK), PD98059 (50 μ M) y U0126 (10 μ M), también inhibieron el aumento en la expresión de SNAP-25, bloqueando por un $45 \pm 11\%$ ($n=5$) y $59 \pm 16\%$ ($n=4$), respectivamente. La incubación de las células en presencia de KN93 (10 μ M) más U0126 (10 μ M), inhibió en un $89 \pm 11\%$ ($n=4$). El aumento en los niveles de SNAP-25 inducido por despolarización no fue afectado por H-89 (inhibidor de la proteinkinasa A) ni por Gö-6976 (inhibidor de la proteinkinasa C). Estos resultados sugieren que tanto CaMK como MAPK están involucradas en la inducción de la expresión de SNAP-25.

XIV - 2 ACTIVACION DE ERK-2 Y FAK EN CARDIOMIOCITOS SOMETIDOS A ESTIRAMIENTO MECANICO O TRATADOS CON AGONISTAS HIPERTROFICOS. (Activation of ERK-2 or FAK in strain- and hypertrophic agonists- treated ventricular myocytes in culture). Meléndez J., Campos X, Gálvez A, Lavandero S. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile.

Las proteínas kinasas ERK-2 (Extracellular Regulated-Kinase-2) y FAK (Focal Adhesion Kinase) son transductores claves en la hipertrofia cardíaca inducida por estímulos químicos y/o mecánicos. En este trabajo se evaluó el curso temporal de la activación de ERK-2 a corto y mediano plazo y su relación con la hipertrofia cardíaca *in vitro*. Además, se determinó si FAK experimenta transactivación por agonistas hipertrofos en cardiomiocitos en cultivo. Cardiomiocitos neonatos de rata fueron tratados entre 0-120 min. y/o por 24-72h con angiotensina II (AII, 1mM), fenilefrina (10 μ M), factor de crecimiento análogo a insulina tipo I (IGF-I, 100 nM), sometidos a estiramiento estático multiaxial (12%) o tratados con un anticuerpo anti β 1-integrina (100 μ g/ml). Tanto para ERK-2 como para FAK, se determinó el grado de fosforilación por IWB. Para relacionar estos cambios con el proceso hipertrofico, se determinaron los niveles proteicos de β -MHC. Los resultados mostraron que ERK-2 fue fosforilada tempranamente (5 min.) por todos los estímulos siendo inhibida parcialmente por citocalasina-D. Se observó la activación sostenida de ERK-2 a las 24 y 48 h. La expresión de β -MHC aumentó con IGF-I a las 24h y para el resto de los estímulos a las 48h. La activación de ERK-2 (24h) fue inhibida por PD-98059 (PD, inhibidor de MEK) para todos los estímulos, excepto para el estiramiento. La expresión de β -MHC (24h) fue atenuada sólo en las células tratadas con PD e IGF-I. La acción de genisteina (G, inhibidor de tirosina-kinasas) sólo se observó en presencia de IGF-I, AII y el anticuerpo anti β 1-integrina, siendo la expresión de β -MHC atenuada sólo en los miocitos tratados con G e IGF-I. Todos los estímulos mostraron activación de FAK aunque en magnitudes y tiempos distintos.

Se concluye que el estiramiento mecánico multiaxial, y otros agonistas hipertrofos, comparten vías transduccionales comunes durante el establecimiento de la hipertrofia cardíaca.

Fondecyt 2960046 ; 1980908

XIV - 3 ANALISIS MEDIANTE MICROARRAYS DE EXPRESION GENICA DIFERENCIAL EN EXPLANTES DE RETINA FETAL HUMANA CULTIVADOS CON DHA. (Microarray analysis of differentially expressed genes in human fetal explants cultured with DHA) Martínez, J.I., Uauy R, Rojas C.V. INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: Martínez, J)

La deficiencia dietaria de DHA en neonatos produce disminución en la agudeza visual y alteraciones electro- retinográficas en los fotorreceptores bastones. El DHA y otros ácidos grasos polinsaturados modulan la expresión de genes del metabolismo lipídico, de glucosa, del proceso inflamatorio y otros. Este trabajo se ha enfocado a determinar el efecto de DHA sobre la expresión génica en explantes de retina fetal humana. A partir de los mRNAs extraídos de explantes cultivados con o sin DHA se sintetizó cDNAs marcados con distintos fluoróforos, que fueron hibridados a los "DNA-microarrays". La expresión génica diferencial fue determinada de la intensidad relativa de los fluoróforos en cada gen del microarray. El nivel de los transcritos cambió en 19% de los 2400 genes analizados, de los cuales el 80% incrementó su expresión en presencia de DHA. Entre los últimos, se encuentran aquellos que codifican enzimas del metabolismo lipídico (β -oxidación, elongación, desaturación de ácidos grasos y síntesis de colesterol). Entre otros, también aumentaron los transcritos relacionados con síntesis de prostaglandinas (inhibidor de la PLA2, leucotrieno A-4 hidrolasa, hidroperóxido glutatión peroxidasa) y los genes de transducción señales MEK-ERK (Erk 1, Erk-1).

Los múltiples cambios de expresión génica podrían explicar los efectos del déficit de DHA en la función visual.

Financiamiento: Cátedra Presidencial 1996

XIV - 4 DIFERENCIACION DE LA LINEA NEURAL B12 MEDIADA POR ACTIVADORES DE PPAR GAMMA; SINERGISMO CON ACIDO RETINOICO. (B12 Neural cell line differentiation by PPAR gamma activators; synergism of Retinoic acid). Roth A., Leisewitz A., Inestrosa N.C. y Bronfman M. Unidad de Bioquímica Celular y Genética, Fac. de Cs. Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

El Sistema Nervioso Central (SNC) presenta un alto contenido de lípidos y una gran variedad de estructuras lipídicas complejas, por lo que es de gran interés caracterizar sus mecanismos de regulación en el CNS y la susceptibilidad a modificaciones por factores exógenos.

Los factores de transcripción activados por ácidos grasos PPAR (peroxisome proliferator activated receptor, α, δ, γ) son una subfamilia de receptores nucleares activados por ligandos (incluyendo drogas de uso médico y contaminantes ambientales), que forman hetero-dímeros con el receptor de ácido retinoico y regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo lipídico. La línea neural B12 pertenece al linaje oligodendroglítico ya que expresa β -Galactocerebrósido, CNPase y MOSP; además presentan las tres isoformas de PPAR. Activadores de PPAR γ (troglitazona y PGJ2) generan arresto de la proliferación y diferenciación morfológica de dichas células. El cipofibrato, activador débil de PPAR γ es sinérgico con ácido Retinoico, diferenciando las células B12 a concentraciones 1000 veces menores a las necesarias para obtener el mismo efecto por cualquiera de estas vías independientes. Además, la activación de PPAR α por cipofibrato genera un aumento de expresión de Acyl-CoA Oxidasa, enzima limitante en la β -oxidación peroxisomal. Estos resultados demuestran un rol interesante y diferencial de los PPARs en una línea neural emparentada con los oligodendrocitos, encargados de la síntesis de la estructura lipídica más importante del SNC: La vaina de Mielina.

Agradecimientos: Fondecyt: 2980023 y 1990155, Fondap y MIFAP.

XIV - 5 AUMENTO DE LA COMUNICACION INTERCELULAR MEDIADO POR ACIDO RETINOICO SE CORRELACIONA CON CAMBIOS EN PROLIFERACION Y APOPTOSIS EN CELULAS MCF-7. (Enhanced gap junctional intercellular communication by retinoic acid correlates with cell growth and cell death changes in MCF-7 cells). Sáez, C.G., Montoya, M.I. y Alvarez, M. G. Programa de Cáncer. P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Dr. José Chianale).

Como agentes quimiopreventivos, los retinoides inhiben el crecimiento y promueven la diferenciación celular siendo su mecanismo de acción aún investigado. Un crecimiento disminuido y un estado de mayor diferenciación celular ha sido, por otro lado, correlacionado con un aumento de la comunicación intercelular (CI) por Uniones en Hendidura (UHs). Estudiamos el efecto del ácido all-trans retinoico (AR) sobre la CI por UHs, en células humanas de cáncer mamario (MCF-7), como uno de los posibles mecanismos de su acción quimiopreventiva. Se analizó la CI mediante microinyección de Amarillo de Lucifer y "scrape-loading", y la expresión de conexinas 43, 40 y 26 (proteínas estructurales de las UHs) por inmunocitoquímica en células MCF-7 tratadas con AR 10^{-6} M durante 6 días. La proliferación celular se analizó por incorporación de Bromo-deoxy-uridina y la muerte celular por tinción con yoduro de propidio y degradación de DNA. AR aumentó la CI por UHs (35% $\pm$ 5%) en células MCF-7 hasta 72 h de tratamiento e indujo una redistribución de conexinas 43, 40 y 26 hacia la membrana de aposición. En las células tratadas con AR se observó una disminución de la proliferación celular y un retardo en la apoptosis comparadas con las células control. Los resultados sugieren que AR aumenta la CI por UHs en células MCF-7, lo que se correlaciona con cambios celulares relacionados con proliferación y apoptosis celular. Fondecyt # 1990120.

XIV - 6 CARACTERIZACION DE LA QUINASA RELACIONADA A LA CDC2P, CRK3, EN TRYPAÑOSOMA CRUZI (Characterization of the Cdc2p-related kinase, CRK3, in *T. cruzi*). Santori MI, Laría S., Gomez EB, Muñoz MJ y Téllez Iñón MT. INGBI - CONICET y FCEyN, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) son elementos esenciales en el control del ciclo celular eucariota. La actividad de estas quinasas está regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación, así como por la asociación a ciclinas e inhibidores de CDKs. En distintos protozoarios se han descrito proteínas relacionadas a la Cdc2p, Cdc2p-Related Kinases (CRKs), por homología de secuencia sin poder asignarles una función en el control del ciclo celular.

Numerosas CRKs han sido descritas en tripanosomátidos, sin embargo, no se ha establecido su función. En nuestro laboratorio se han clonado dos quinasas relacionadas a la Cdc2p: TzCRK1 y TzCRK3. Mediante la técnica del doble híbrido se identificaron tres ciclinas asociadas a TzCRK1, TzCYC4, 5 y 6.

Ensayos de Western blot empleando un antisuero policlonal, revelaron la presencia de la TzCRK3 en distintas fracciones subcelulares del parásito. En los distintos estadios del parásito se observaron diferencias tanto en el patrón de migración como en la localización subcelular de la quinasa. A partir del suero total específico, se purificaron IgGs. Estas fueron usadas en ensayos de inmunoprecipitación de extractos solubles de epimastigotes. Los complejos inmunoprecipitados presentaron actividad de quinasa de histona H1. Los inhibidores específicos de CDKs, Olomucina, Flavopiridol y Roscovitina, anularon la actividad quinasa inmunoprecipitada.

Dos de las tres ciclinas identificadas para TzCRK1, CYC4 y 5, fueron capaces de asociarse además, con TzCRK3. Esto sugeriría que ambas quinasas pertenecen a la familia de las CDKs.

Financiado por UBA, FONCYT, CONICET y OMS.

XIV - 7 ROL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-KINASA (PI3-K) EN LA RESPUESTA ANTIAPOPTOTICA DEL IGF-1 EN EL CARDIOMIOCITO (Role of PI3-K on the IGF-1 antiapoptotic response in cardiomyocytes). Eltit JM, Morales MP, Lavadero S. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Hemos demostrado en el cardiomiocito que: a) el estrés hiperosmótico produce apoptosis, siendo prevenida por el factor de crecimiento análogo a insulina tipo-1 (IGF-1) (BBRC 70:1029, 2000) y b) la activación del receptor para IGF-1 (RIGF-1) estimula las actividades de PI3-K y de proteína quinasa B (PKB), sustrato fisiológico de PI3-K. Por ello, en este trabajo se evaluó la participación de la PI3-K en la acción antiapoptótica del IGF-1 en cultivos de cardiomiocitos de rata expuestos a sorbitol (0,3 M) por 24 h.

Los resultados mostraron que la fragmentación del DNA (evaluada por electroforesis en gel de agarosa y por la técnica de TUNEL) y niveles de la proteína proapoptótica bcl-xs aumentaron, respecto a los controles, en 470, 64 y 310%, respectivamente, en los cardiomiocitos expuestos a sorbitol. IGF-1 (100 nM) atenuó todos estos parámetros de apoptosis. Sin embargo, LY-294002, un inhibidor específico para PI3-K a 10 y 50 μ M, revirtió por completo la acción protectora del IGF-1 en los cultivos de cardiomiocitos. Por último, LY (10 y 50 μ M), disminuyó en un 56 y 100%, respectivamente, la fosforilación de PKB dependiente de IGF-1.

Se concluye que PI3-K constituye parte del sistema transduccional del RIGF-1 que participa en la regulación de la apoptosis del cardiomiocito estimulada por estrés hiperosmótico.

FONDECYT 1980908

XIV - 8 FasL EN UTERO DE RATON INDUCE APOPTOSIS DE LINFOCITOS T ACTIVADOS. (FasL in the mouse uterus induces apoptosis of activated T cells). Yarela-Nallar, L., Figueroa, C., Gonzalez P., Cárdenas, H., Imarai, M. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

El tracto reproductor femenino puede ser invadido por diversos microorganismos patógenos que inducen respuesta inmune local. Los efectos inflamatorios pueden ser dañinos para la función normal de estos órganos y pueden tener graves consecuencias como la infertilidad. En este trabajo se planteó que en el tracto reproductor de ratonas en etapas normales del ciclo reproductivo, la respuesta inmune local se regula en forma análoga a los sitios con privilegio inmune, es decir, mediante la expresión constitutiva de FasL e inducción de apoptosis linfocitaria. Se examinó la presencia de la proteína FasL en el útero y oviducto mediante inmunofluorescencia indirecta y se determinó que FasL está presente en el epitelio y estroma uterino y oviductal. En el útero, FasL se encuentra también en la serosa. Mediante Western blot se confirmó la presencia de la proteína y a través de RT-PCR se detectó el mRNA de FasL. Por último, utilizando los métodos de TUNEL y anexina V se determinó que FasL en las células de útero induce apoptosis de linfocitos activados. Estos resultados sugieren que la apoptosis linfocitaria producida por la interacción de Fas-FasL podría ser uno de los mecanismos de regulación de la respuesta inmune local en el tracto reproductor femenino.

Financiamiento DICYT-USACH

XIV - 9 EFECTOS DE LA ADMINISTRACION AGUDA Y REPETIDA DE ANFETAMINA SOBRE LOS NIVELES DE mRNA DEL RECEPTOR OPIOIDE delta EN CEREBROS DE RATA. (Effects of acute and repeated amphetamine administration on delta-opioid receptor mRNA levels in rat brain). Magendzo, K y Bustos, G. Lab. de Farmacología-Bioquímica, Facultad de Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Gysling, K).

La inyección aguda de drogas de abuso produce activación locomotora en animales de experimentación. Cuando dichas drogas son administradas de manera repetida e intermitente, la intensidad de la respuesta locomotora aumenta progresivamente, persistiendo incluso después de discontinuar la droga. Este fenómeno, conocido como sensibilización conductual, provee de un modelo para estudiar los cambios neuroadaptativos que subyacen a la conducta adictiva.

El sistema dopaminérgico mesolímbico juega un papel fundamental en las propiedades recompensantes de las drogas de abuso. Sin embargo, los cambios neuronales producidos por las drogas de abuso que se traducen en cambios conductuales persistentes no son bien conocidos. Evidencias anatómicas, electrofisiológicas, bioquímicas y conductuales demuestran una estrecha interacción entre el sistema dopaminérgico y el sistema opioide. Por este motivo nuestra hipótesis de trabajo es que cambios en la expresión de los receptores opioides delta (DOR) se correlacionarían con el desarrollo de sensibilización conductual. Con este fin se estableció el paradigma de sensibilización conductual en ratas Sprague-Dawley, mediante la administración repetida e intermitente de D-anfetamina (1.5 mg/kg). Los animales sensibilizados fueron decapitados y los cerebros fueron extraídos y cortados utilizando un criostato. Los niveles de mRNA de DOR fueron cuantificados en regiones mesolímbicas del cerebro mediante la técnica de hibridación *in situ* cuantitativa, utilizando sondas de cRNA marcadas con digoxigenina. Nuestros resultados muestran una disminución significativa de los niveles del mRNA de DOR en el área tegmental ventral (VTA) de cerebros de ratas sensibilizadas a amfetamina comparado con los animales controles.

Financiamiento FONDECYT 2990084 y 8970010

XIV - 10 ANALISIS MOLECULAR DE LA EXPRESION GENICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN UN CULTIVO DE NEURONAS RCSN INCUBADAS CON SALSOLINOL. POSIBLES IMPLICANCIAS EN LA ETIOPATOGENESIS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. (Molecular analysis of the expression of antioxidant enzymes in a RCSN neuron culture incubated with salsolinol. Possible implications in the etiopathogenesis of Parkinson diseases). Dagnino-Subiabre, A., ¹Martínez, P., ¹Paris, I., ²Caviedes R., ²Caviedes P., ¹Segura-Aguilar J. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ²Programa de Morfología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El salsolinol es una neurotoxina endógena que se forma espontánea y enzimáticamente a partir de la dopamina. El salsolinol está presente en la sustancia nigra y se encuentra en alta concentración en fluidos cerebrospinales de pacientes con Parkinson. Esta neurotoxina produce apoptosis en neuronas y estaría involucrada en la etiopatogénesis de la enfermedad de Parkinson. En este estudio se analizó la expresión de los genes que codifican a las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión-peroxidasa, SOD1 y DT-diaforasa en un cultivo de sustancia nigra de rata (RCSN) en presencia salsolinol. Para esto se incubaron por 10 minutos las células RCSN en 3 condiciones: salsolinol, dicumarol (un inhibidor específico de la enzima DT-diaforasa) y salsolinol mas dicumarol, todos en concentraciones finales de 100 µM. El análisis molecular consistió en la extracción de RNA total, transcripción reversa y PCR a diferentes números de ciclos. Este análisis reveló que el salsolinol en presencia o ausencia de dicumarol, regula negativamente la expresión de los mRNA de catalasa y glutatión-peroxidasa. Estos resultados sugieren que al inhibirse el principal sistema de detoxificación del H₂O₂, este al acumularse podría servir de sustrato a peroxidasas que oxidan el grupo catecol del salsolinol a una orto-quinona, la cual puede ser reducida con 2 electrones por la DT-diaforasa hasta una hidroquinona, siendo esta una vía de detoxificación de la acción degenerativa del salsolinol.

Financiado por FONDECYT 1990622 y 1980906.

XV - BIOLOGIA CELULAR

XV - 1 HISTONA H1 ES UN LIGANDO ENDOGENO DE PROTEOGLICANES DE HEPARAN SULFATO EN LA MATRIZ EXTRACELULAR QUE INDUCE LA PROLIFERACION DE CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS. Henríquez JP., Fuentealba L. y Brandan E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Durante la diferenciación terminal del músculo esquelético, la expresión de proteoglicanos de heparán sulfato (PGHSs) – componentes esenciales de la matriz extracelular (MEC) – está altamente regulada. Más aun, hemos demostrado que ellos cumplen una función crítica en el gatillamiento del proceso. Con el fin de indagar en nuevas funciones de los PGHSs durante la miogénesis hemos estudiado la presencia de ligandos no descritos para estas moléculas y su posible función. Mediante ensayos de *overlay* con [³⁵S]-heparina (análogo de cadenas de HS) identificamos un doblete de 33 y 30 kDa (p33/30) en fracciones solubles en Tritón X100 y KCl. Ensayos de desplazamiento por heparina y de marcación con biotina en células intactas sugieren que p33/30 se localiza extracelularmente donde incrementa a medida que la diferenciación muscular transcurre. A partir de fracciones purificadas y por MALDI-MS y secuenciación N-terminal identificamos a p33/30 como histona H1. Esta histona H1 extracelular colocaliza con PGHSs en la MEC pero no en la superficie de los miotubos. La cuantificación de fenómenos de muerte celular durante la diferenciación de las células C₂C₁₂ sugiere que ellos no darían cuenta de la localización extracelular de histona H1. Ensayos de incorporación de [³H]-timidina mostraron que histona H1 promueve la proliferación de mioblastos C₂C₁₂. Esta es la primera evidencia de un ligando endógeno de PGHSs con funciones particulares durante el proceso de miogénesis terminal.

(JPH: FONDECYT 2980049, 4000024; EB: FONDECYT 1990151, FONDAP 13980001, MIFAB, Cátedra Presidencial en Ciencias).

XV - 2 RAB22a ALTERA LA MORFOLOGIA Y FUNCION DE LA VIA ENDOCITICA. (rab22a alters the morphology and function of the endocytic pathway). Mesa, R. Salomón, C. Roggero, M. Mayorga, L. IHEM, Fac. CS. Médicas, U. N. Cuyo - CONICET, CC56, 5500 Mendoza. E-mail: rmesa@fmed2.uncu.edu.ar

En los procesos de endocitosis y exocitosis, la fusión de endomembranas cumple un papel fundamental. Entre las proteínas que regulan esta fusión se encuentran las Rabs. Las Rabs son una familia de proteínas reguladas por GTP y que alternan entre dos estados; estado activo, cuando unen GTP y estado inactivo, cuando hidrolizan GTP a GDP. Hay varias Rabs ya identificadas en compartimientos bien definidos pero muchas otras Rabs tienen función aún desconocida, entre ellas Rab22. La sobreexpresión transiente de Rab22a en células CHO nos indica que GFP.Rab22wt (tipo salvaje) se localiza en la periferia de pequeñas y grandes vesículas que colocalizan con endosomas tempranos y tardíos mientras que GFP.Rab22Q64L (mutante positiva) se encuentra en la periferia de grandes vesículas que colocaliza con endosomas tempranos, endosomas tardíos, lisosomas y autofagosomas. Por el contrario, GFP.Rab22S19N (mutante negativa) se distribuye en forma difusa con poca asociación a membranas. La endocitosis en fase fluida de HRP como la mediada por receptores de transferrina fue inhibida por Rab22wt y la mutante negativa, este efecto no fue observado con la mutante positiva quien produjo la aparición de vesículas gigantes conteniendo GFP.Rab22Q64L y marcadores de la vía endocítica. Nuestros resultados indican que rab22 participa activamente en el transporte endocítico.

XV - 3 LOCALIZACION DE COXIELLA BURNETII EN COMPARTIMIENTOS INTRACELULARES MARCADOS CON PROTEINAS RAB7. (*Coxiella burnetii* Localizes in a Rab7-labeled Compartment). Berón, W., #Rabinovitch, M y *Colombo, M.I. *Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, y #Escuela Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brasil.

Coxiella burnetii (CB), agente causal de la fiebre Q, es un microorganismo que se replica en la célula huésped formando grandes vacuolas con características fagolisosomales. Poco se conoce sobre el tráfico intracelular de este microorganismo y sobre el mecanismo de supervivencia intracelular. Para caracterizar el compartimento donde reside y multiplica este microorganismo, se infectaron células Hela durante 48h con CB. Por microscopía óptica se observaron grandes vacuolas conteniendo numerosos microorganismos (V-CB). La formación de V-CB se inhibió, en forma reversible, en células tratadas con vinblastina, un agente que despolimeriza microtúbulos. Estos resultados sugieren que los microtúbulos son requeridos para la formación de las V-CB. Ya que varias GTPasas pequeñas regulan el transporte vesicular, estudiamos si Rab5 y Rab7, marcadores de endosomas tempranos y tardíos, respectivamente, interaccionan con las V-CB. Células infectadas con CB, se infectaron con virus Sindbis recombinantes para sobreexpresar proteínas GFP-Rabs. Análisis por microscopía de fluorescencia reveló que CB reside en compartimientos tardíos de la vía endocítica marcados con Rab7 cepa salvaje y con la mutante Rab7-Q67L (deficiente en actividad GTPasa). Las V-CB se marcaron también con la mutante Rab5Q79L (deficiente en actividad GTPasa). Sin embargo no se observó colocalización con Rab5 cepa salvaje ni con la mutante dominante negativa Rab5S34N. Las V-CB fueron accesibles a Lysotracker, un marcador de compartimientos ácidos, y a monodansylcadaverina, un marcador específico de autofagosomas. Estos resultados sugieren que CB reside en un compartimento ácido con características de endosomas tardíos interrelacionados con la vía autofágica.

XV - 4 CARACTERIZACION DEL TRANSPORTE DE ACIDO ASCORBICO EN NEURONAS CORTICALES EMBRIONARIAS. (Characterization of ascorbic acid uptake in embryonic cortical neurons). Castro, M.A. y Nualart F. Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. (Patrocinio: Alejandro Reyes).

En muchos mamíferos, la síntesis de vitamina C ocurre en el hígado, por tanto, tejidos que acumulan esta vitamina, como el tejido cerebral, deben expresar transportadores de membrana que permitan su captación. Muchos tipos celulares incorporan la vitamina C en su forma oxidada, ácido dehidroascórbico, a través de los transportadores de glucosa, mientras que otras células especializadas lo hacen a través de transportadores de ascorbato y sodio (SVCT), que permiten la entrada de vitamina C reducida al espacio intracelular. A pesar que existen evidencias suficientes para señalar que en distintos niveles del Sistema Nervioso Central adulto se expresan estos transportadores, no se ha caracterizado su expresión durante el desarrollo cerebral. En esta oportunidad realizamos experimentos cinéticos para caracterizar la captación de ascorbato en neuronas embrionarias de ratón. Además, empleamos estrategias para identificar molecularmente los transportadores de ascorbato por medio de RT-PCR y análisis de secuencia. En cultivos de neuronas embrionarias se observó transporte dependiente de sodio de vitamina C reducida. Este transporte fue saturable, sensible a la temperatura y constituido por dos componentes de alta afinidad, con valores aparentes de K_m de 103 μM y menor que 8 μM, respectivamente. Uno de los componentes se identificó molecularmente como SVCT2. Por consiguiente, queda establecido que en estadios tempranos del desarrollo cerebral, las células neuronales adquieren capacidad antioxidativa, expresando transportadores de ascorbato y sodio.

Financiado parcialmente por Proyecto FONDECYT 1980130

XV - 5 SINAPTOTAGMINA VI PARTICIPA EN LA REACCION ACROSOMAL (Synaptotagmin VI play a role in the acrosome reaction) Michaut M., De Blas G., Tomes C., Yunes R., Mayorga L. Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Fac. Cs. Médicas. Univ. Nac. de Cuyo.

Las sinaptotagminas (STG) representan una familia de proteínas de membrana con una amplia distribución en tejido nervioso y otros órganos. Estas proteínas están formadas por un único dominio transmembrana y por una extensa región citoplasmática que contiene dos copias del dominio C2, que une calcio y fosfolípidos. La STG mejor caracterizada, STG I, es esencial para la exocitosis de vesículas sinápticas, indicando un rol de STG en la fusión de membranas calcio dependiente. La reacción acrosómica (RA) es un proceso exocítico regulado por calcio. Utilizando el modelo de espermatozoides humanos permeabilizados con estreptolisina-O, estudiamos el efecto del dominio citoplasmático de STG I y STG VI, obtenidos como proteínas de fusión con GST, en la RA estimulada por calcio. El resultado fue inhibitorio para ambos dominios, siendo más potente la inhibición de STG VI ($ED_{50} \approx 2 \mu\text{g/ml}$) que la de STG I ($ED_{50} \approx 20 \mu\text{g/ml}$). Análisis por Western blott utilizando un anticuerpo contra el dominio citoplasmático de STG VI, detectó la presencia de una banda de 65 kDa en extractos de espermatozoides humanos. El mismo anticuerpo también inhibió la RA estimulada por calcio. Nuestros resultados indican que STG VI está presente en espermatozoides humanos e interviene en la exocitosis del contenido acrosomal.

XV - 6 HFE REGULA NEGATIVAMENTE EL TRANSPORTE APICAL DE HIERRO EN CELULAS EPITELIALES CACO-2. (HFE negatively modulates apical iron uptake by intestinal epithelial (Caco-2) cells). Arredondo, M., Mura, C., Muñoz, P. y Núñez, M.T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias e Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología, Universidad de Chile.

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad autosomal recesiva caracterizada por una elevada absorción intestinal de hierro que resulta en la progresiva recarga corporal de este. El mecanismo celular por el que HFE, el producto normal del gen de la HH regula la absorción intestinal de hierro no es conocido. Bajo la hipótesis de HFE debe regular algún aspecto clave de la absorción intestinal de hierro, en este trabajo se caracterizó el efecto de la sobreexpresión de HFE en células Caco-2 en la absorción de hierro. Encontramos que el efecto primario de la sobreexpresión de HFE fue una marcada reducción de la incorporación apical de hierro, la primera y más regulada etapa de su absorción, a pesar de un incremento en 8 veces de la masa del transportador apical DMT1. Ya que HFE C282Y, el producto de la mutación de HFE encontrada en HH no alcanza la membrana plasmática, este efecto inhibitorio de HFE debiera perderse en la HH. De esta manera, la acción inhibitoria de HFE en la incorporación apical de hierro encontrada aquí, da una explicación molecular a la aumentada absorción intestinal de hierro encontrada en HH.

Financiado por proyecto FONDECYT 2990116, proyecto de enlace del D.I.D. Universidad de Chile y por proyecto P99-031 al Instituto Milenio de Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

XV - 7 EXPRESION DE RECEPTORES PARA GM-CSF, IL-3 E IL-5 EN CELULAS GERMINALES MASCULINAS (Expression of GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors in male germ cells) Werner, E., Brito, M., Zambrano, A., Espinoza, M., Pérez, M., Rauch, M.C. y Concha, I.I. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

El factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), Interleuquina-3 (IL-3) e Interleuquina-5 (IL-5) son glicoproteínas que regulan importantes respuestas biológicas tales como proliferación, supervivencia y diferenciación. Los receptores de alta afinidad para estas citoquinas están compuestos de una subunidad α específica para cada ligando, y una subunidad β común.

Los receptores para GM-CSF han sido identificados en la mayoría de los tipos de células progenitoras mieloides y también en células maduras. Los receptores para IL-3 están presentes en células progenitoras hematopoiéticas primarias, eosinófilos y basófilos; mientras que la expresión de receptores para IL-5 se ha demostrado principalmente en eosinófilos.

GM-CSF e IL-3 estimulan un aumento de la captación de glucosa en células humanas del sistema inmune, lo cual confirma que GM-CSF e IL-3 tienen efectos biológicos similares, compartiendo ambos un patrón similar de expresión de sus receptores.

En nuestro laboratorio hemos demostrado la expresión de receptores funcionalmente activos para GM-CSF en células no hematopoiéticas, tales como células germinales masculinas. La unión de GM-CSF a su receptor en espermatozoides de toro revela que éstos tienen acerca de 105 sitios de alta afinidad con un Kd de 222 pM y aproximadamente 1100 sitios de baja afinidad con un Kd de 10 nM., señalizando un aumento en la captación de glucosa y vitamina C. Adicionalmente, en estas mismas células hemos evaluado la presencia de receptores para IL-3 e IL-5 y hemos determinado que estas citoquinas compiten cruzadamente por el transporte de glucosa.

FONDECYT 199.0094

XV 8 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ATPasa DE MIOSINA II POR FOSFORILACION CON EMAP2 KINASA. (Inhibition of myosin II ATPase activity by phosphorylation with EMAP2 kinase). López, L.A. IHEM, UNCuyo cc565500 Mendoza. Argentina. email: llopez@fmed2.uncu.edu.ar.

Al ser fosforilada por EMAP2 kinasa (EMAP2k), la proteína asociada a microtúbulos MAP2 pierde la afinidad por los microtúbulos y de ese modo restablece el transporte mediado por las proteínas motoras (1).

Se analizó si EMAP2k participa regulando la actividad de otros elementos del citoesqueleto. Se estudió si miosina II de músculo liso (SMII), es sustrato de EMAP2k y si la fosforilación altera la capacidad de hidrolizar ATP in vitro.

EMAP2k fue aislada de microtúbulos de cerebro de embrión de pollo y SMII de testículo de rata. Se midió el grado de fosforilación de SMII utilizando ATP-P32 y analizando las proteínas en PAGE-SDS (4%) y autorradiografía. Se comparó la capacidad de SMII y SMII fosforilada (SMII-P) de hidrolizar ATP utilizando el medio KCl-EDTA, ATP y midiendo el fosfato liberado por reacción colorimétrica.

Se comprobó que EMAP2k fosforila solo el isotipo SM2 de SMII (2) y tal fosforilación lleva a la reducción en cinco veces la actividad ATPasa de SMII-P. (SMII hidrolizó $1 \pm 0,02 \mu\text{M ATP/min/mg}$ de proteína, mientras que SMII-P hidrolizó $0,2 \pm 0,01 \mu\text{M ATP/min/mg}$ de proteína).

De estos resultados se desprende que EMAP2 kinasa podría estar cumpliendo un papel importante en los mecanismos intracelulares mediados por el sistema contractil actina-miosina.

(1) Luis A. López and Michael Sheetz (1995) JBC 270:12511-517
(2) SMII es una mezcla de dos proteínas hexaméricas constituidas por dos cadenas pesadas de 204 kDa (SM1) o de 200 kDa (SM2) y dos pares de cadenas livianas de 16 y 20 kDa.

XV 9 LA PLACA DEL SUELO *IN VITRO* SECRETA COMPUESTOS SIMILARES O IDENTICOS A LAS GLICOPROTEINAS CONSTITUTIVAS DE LA FIBRA DE REISSNER. (Bovine floor plate explants secrete into the culture medium a compound homologous to RF-Gly I secreted by the subcommissural organ.). Guñazu M.F., Richter H., Rodríguez E.M. Instituto de Histología y Patología. UACH.

La placa del suelo (PS) participa en la morfogénesis del Sistema Nervioso Central. Recientemente algunos autores han propuesto una relación entre los productos secretados por el órgano subcomisural (OSC) y la PS basados en métodos inmunológicos y de biología molecular.

En el presente trabajo se analizaron explantes hasta de 30 días de cultivo mediante: microscopía óptica y electrónica; inmunocitoquímica; Western Blot y RT-PCR. El medio condicionado se analizó por Western Blot. Se utilizaron partidores de PCR y anticuerpos anti-secuencia derivados de RF-Gly I en conjunto con anticuerpos policlonales (AFRU) contra RF-Gly I y otros componentes secretorios del OSC. Se obtuvieron los siguientes resultados: 1) Hasta 15 días de cultivo, las células de la PS presentan características de células secretoras e inmunorreaccionan con los anticuerpos que reconocen RF-Gly I y AFRU. 2) RT-PCR de explantes de PS generan una señal equivalente a la del OSC de bovino *in situ*. 3) Los medios condicionados mostraron dos compuestos de 540 y 60 kDa, que reaccionan con anticuerpos AFRU. Estas y otras evidencias sugieren que las células de PS mantienen su capacidad de secreción *in vitro*, liberando un compuesto idéntico o altamente relacionado con las glicoproteínas secretoras del OSC.

Proyecto FONDECYT 1000435.

XVI - FISILOGIA/BIOQUIMICA

XVI - 1 ACIDOS GRASOS DE FOSFOLIPIDOS EN PLASMA Y ERITROCITOS DE LACTANTES DESNUTRIDOS ALIMENTADOS CON LECHE MATERNA O FORMULAS. (Fatty acid profiles of plasma and erythrocyte phospholipids in breast-fed or formula-fed malnourished nursing infants). Marín M.C., Rey G.E., Rodrigo M.A., Alaniz M.J.T. de. INIBIOLP (Fac. Cs Médicas-UNLP), Hospital de Niños de La Plata.

Los ácidos grasos polinsaturados (AGP) derivados de los ácidos esenciales intervienen en la formación y en el mantenimiento de estructuras de membrana, en la síntesis de lípidos estructurales y en el desarrollo neural. Se conocen anomalías en funciones neurológicas de lactantes alimentados con fórmulas respecto a lactantes alimentados con leche materna, y el efecto de la desnutrición calórico-proteica sobre la composición en AGP. Se estudió el efecto de diferentes fórmulas comerciales sobre la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de plasma y eritrocitos, en tres grupos de lactantes desnutridos, dos recibieron fórmulas (una sólo aporta ácidos linoleico y α -linolénico, y la otra tiene agregados AGP de mayor longitud de cadena) y el tercer grupo, fue alimentado con leche materna. Se determinó la composición en ácidos grasos de fosfolípidos de plasma y eritrocitos. Los resultados mostraron en lactantes alimentados con fórmulas mayor proporción de ácidos saturados y monoinsaturados, y menor porcentaje en el total de ácidos polinsaturados, las diferencias fueron más marcadas en los que recibieron fórmulas sin suplemento de AGP. Se concluye que en lactantes desnutridos el uso de fórmulas enriquecidas en ácidos grasos polinsaturados logra restaurar en parte, el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos de plasma y eritrocitos.

XVI - 2 EFECTO DEL HIERRO *IN VITRO* SOBRE LA GENERACION DE OXIDO NITRICO HEPATICO EN RATASEUTIROIDEAS E HIPERTIROIDEAS. (*In vitro* effect of iron on the generation of nitric oxide by the liver of euthyroid and hyperthyroid rats). Cornejo, P., Tapia, G., Videla, L. A., Fernández, V. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Patrocinio: V. Fernández.

El óxido nítrico ($\bullet$ NO), radical libre generado por la óxido nítrico sintasa (NOS), al interactuar con el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), produce peroxinitrito, poderoso agente prooxidante. De esta manera, $\bullet$ NO puede contribuir a la condición de estrés oxidativo hepático inducida por la administración de hierro (Fe) o por el hipertiroidismo. Estudios previos señalan que la producción de $\bullet$ NO hepático es incrementada por la sobrecarga aguda de Fe y el hipertiroidismo, como también por la interacción de Fe y T_3 . Este trabajo evalúa cambios en la producción de $\bullet$ NO (oxidación de oxihemoglobina a metahemoglobina por $\bullet$ NO) luego de la adición de Fe (1 μ mol/mg proteína) a muestras de citosol hepático obtenidos de (a) ratas eutiroides y (b) ratas hipertiroides (0,1 mg/kg de L-3, 3', 5'-triiodotironina o T_3 en 2 días consecutivos). La generación de $\bullet$ NO aumenta tanto en muestras del grupo eutiroides (97%) como en las del grupo hipertiroides (173 %), reproduciendo parcialmente los efectos *in vivo* del metal y sugiriendo una activación directa de la NOS hepática por Fe, efecto que contribuiría significativamente a la condición prooxidativa inducida por Fe y T_3 .

Financiado por FONDECYT 1000887.

XVI - 3 METABOLISMO HEPATICO DE COLESTEROL EN RATONES DEFICIENTES EN LA PROTEINA NPC-1 (Hepatic cholesterol metabolism in NPC-1 deficient Mice). Mendoza, H., Amigo, L., Rigotti, A., Nervi, F., Zanlungo, S. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El hígado es un órgano clave en el metabolismo de colesterol y en su eliminación a través de la bilis. Aunque el colesterol captado desde las lipoproteínas plasmáticas constituye la fuente principal de colesterol secretado a la bilis, se desconoce la contribución relativa de las diferentes vías de catabolismo hepático de colesterol lipoproteico a la secreción biliar. Dado que la proteína NPC1 juega un rol clave en la vía endocítica de captación de colesterol lipoproteico en el hígado, el objetivo fue estudiar el metabolismo de colesterol y la secreción de lípidos biliares en el modelo murino deficiente en NPC1 (NPC1^{-/-}). Los ratones NPC1^{-/-} se alimentaron por dos semanas con una dieta control o rica en colesterol, y se midió el contenido hepático de colesterol y la secreción de lípidos biliares. **Resultados:** Usando ambas dietas el hígado de los ratones NPC1^{-/-} contenía más colesterol que los controles. En dieta control los ratones NPC1^{-/-} mostraron una mayor secreción biliar de colesterol con respecto a los controles. Sin embargo, bajo una dieta rica en colesterol los ratones controles incrementaron la secreción biliar de colesterol, mientras que los NPC1^{-/-} no lo hicieron. **Conclusión:** la expresión hepática de NPC1 es un factor importante en la regulación del metabolismo hepático de colesterol y la secreción de lípidos biliares.

Financiado por Fondecyt 1000567.

XVI - 4 LA SOBREEXPRESION DE "STEROL CARRIER PROTEIN-2" EN EL HIGADO MEDIANTE ADENOVIRUS MODIFICA EL METABOLISMO DE LOS ACIDOS GRASOS. (Adenovirus-mediated hepatic overexpression of sterol carrier protein-2 leads to modifications in fatty acid metabolism). Zanlungo, S., Amigo, L., Mendoza, H., Miquel, JF, Rigotti, A., Nervi, F. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Sterol carrier protein-2 (SCP-2) es una proteína que tiene la capacidad de unir con alta afinidad distintos tipos de lípidos. Aunque se ha demostrado que SCP-2 tiene un sitio de unión para ácidos grasos no se sabe si participa en el transporte y metabolismo de los mismos. Nuestro objetivo fue caracterizar la función de SCP-2 en el metabolismo hepático de ácidos grasos *in vivo*. Se obtuvo sobreexpresión hepática de SCP-2 en ratones C57BL/6 con adenovirus recombinante SCP-2 (Ad.rSCP-2) y se compararon con controles sin infectar y ratones infectados con un adenovirus control (Ad.E1A).

La sobreexpresión de SCP-2 disminuyó en un 60% la neosíntesis hepática de ácidos grasos lo que se correlacionó con una disminución de un 75% en el contenido hepático de triglicéridos. Consistente con la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, en los ratones infectados con Ad.rSCP2 comparados con los infectados con Ad.E1A., se redujo en un 63% la secreción hepática de triglicéridos asociados a VLDL y en un 50% los niveles de los transcritos de ApoB, la apolipoproteína más importante de las VLDL.

Nuestros resultados indican que SCP-2 juega un rol importante en el metabolismo de ácidos grasos y triglicéridos, y en la síntesis de lipoproteínas hepáticas *in vivo*.

Financiado por proyectos Fondecyt 1000739 y 1000567.

XVI - 5 IMPORTANCIA DE LA ADRENAL SOBRE LA REGULACION DE 11SS-HIDROXIESTEROIDE DEHIDROGENASA 2 (HSD2) RENAL EN DIFERENTES TIPOS DE ESTRES AGUDO. (Rol of the adrenal on the regulation of renal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 during different types of acute stress). Zallocchi, M., Igarreta, P., Calvo, J.C., Lantos, C.P. y Damasco, M.C. Programa de Regulación Hormonal y Metabólica. CONICET. UBA.

La 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa 2 (HSD2) renal metaboliza corticosterona (glucocorticoide activo) a 11-dehidrocorticosterona (glucocorticoide inactivo), otorgando especificidad a aldosterona por su receptor. En estudios previos demostramos que animales sometidos a diferentes tipos de estrés, presentaban un aumento de la Vmax de la HSD2 renal. En este trabajo estudiamos si la glándula adrenal media este aumento. Cuatro grupos de ratas: Adrenalectomizadas (ADX) basales, operación simulada (Sham) basales, ADX con estrés producido por canulación de estómago (ADX + sonda) o por sobrecarga con 10 ml de CIH 200mM (ADX + CIH). Para actividad incubamos microsomas renales 10 min a 37°C con corticosterona tritiada y fría y NAD⁺. Para abundancia utilizamos la técnica de Western-blot con la fracción microsomal. **Resultados:** Cinética enzimática: Vmax: Sham basales 10.2 $\pm$ 0.8; ADX 7.9 $\pm$ 0.9; ADX + sonda 16.6 $\pm$ 0.6*** y ADX + CIH 6.6 $\pm$ 1.1, pmoles/min/mg proteínas (***p < 0.001 versus ADX). No se observaron modificaciones significativas en el Km. Abundancia: No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados.

Conclusión: La adrenal mediaría la activación de la HSD2 producida por la acidosis pero no la producida por el estrés de la canulación

XVI-6 INHIBICION DE LA RESPIRACION POR ESTERES DEL ACIDO 2,6-DIHIROXI-4-CARBOXIFENOXIACETICO (DIHICARFACET) Y SU PAPEL EN LA RES-TAURACION DE LA SENSIBILIDAD A DROGAS EN EL CARCINOMA MULTIRRESISTENTE TA3-MTX-R (inhibition of respiration by esters of 2,6-dihydroxy-4-carboxyphenoxy-acetic acid and their roles as sensitivity restorers to drugs on the multiresistant carcinoma TA3-MTX-R). Ferreira, J., Grifó, B., Gajardo, P., Pavani, M., Guerrero, A., Repetto, Y., *Cordano, G., *Rivera, E., *Muñoz, S. y *Medina, J. Prog. de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina y *Depto. de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El ácido gálico es citotóxico selectivo sobre una gran variedad de células cancerosas. Esta propiedad aumenta con la lipofiliidad de la molécula. Por lo cual, a partir de él, se sintetizó el ácido DIHICARFACET, del cual se obtuvieron diésteres con alcoholes de 3 y 4 átomos de C.

Se estudió sus efectos sobre la respiración y el crecimiento celular en cultivos del carcinoma TA3 y de la línea multirresistente TA3-MTX-R. La respiración fue inhibida debido al bloqueo del flujo de electrones, principalmente, a nivel del Complejo III de la cadena respiratoria; con lo cual, la generación del potencial de transmembrana fue interrumpida y la síntesis de ATP estaría también inhibida. El grado de inhibición (IC₅₀: 0,1-0,5 mM), si bien fue mayor al aumentar el tamaño del alcohol, fue muy similar en ambos tumores. Estos hechos explicarían la disminución del crecimiento tumoral. Al ser combinados con 5-fluóuracilo o vinblastina, este efecto fue sinérgico y la línea TA3-MTX-R fue nuevamente sensible.

Financiamiento: FONDECYT N° 1981066

XVI - 7 LA DESPOLIMERIZACION MICROTUBULAR Y EL CALCIO CITOSOLICO MODIFICAN LA CAPTACION DE PALMITATO Y LA BIOSINTESIS DE PALMITOLEATO EN CELULAS HEP-G2, A TRAVES DE DIFERENTES MECANISMOS. (Microtubular disrupting agents and cytosolic calcium modify palmitate uptake and palmitoleate biosynthesis in Hep-G2 cells through different mechanism). Marra, C.A. y Alaniz, M.J.T. INIBIOLP (Inst. Investig. Bioquímicas de La Plata). Cat. Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas. Univ. Nac. de La Plata. 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina.

En trabajos previos demostramos que los despolimerizantes microtubulares inhiben la captación de 16:0 y su conversión en 16:1 y que la deficiencia de calcio en ratas produce disminución de la $\Delta 9$ desaturasa microsomal hepática. En este trabajo investigamos si ambos fenómenos regulatorios (niveles de calcio y polimerización tubular) comparten el mismo mecanismo de acción. Encontramos que el tratamiento de células Hep-G2 con Ionomicina ó A-23187 inhibió la captación de palmitato. La complejación del calcio mediante BAPTA-AM ó EGTA en células permeabilizadas con digitonina causó incremento de la captación de 16:0 e inhibió su conversión a 16:1. Asimismo aumentó la actividad de acil-CoA sintetasa e inhibió la actividad de fosfolipasa A_2 . La despolimerización tubular, por otra parte, provocó una inhibición tanto de la captación de palmitato como su conversión a 16:1, sin modificar los niveles de calcio citosólico (medidos por Fura II-AM), no afectó la actividad de acil CoA sintetasa e inhibió la de fosfolipasa A_2 . Los resultados sugieren que la desorganización del citoesqueleto afecta la captación y transformación de palmitato por un mecanismo diferente al que desencadena la alteración del nivel de calcio citosólico.

XVI - 8 LA SEÑAL DEL CALCIO REGULA LA CAPTACION Y METABOLISMO DE PALMITATO EN CELULAS HEP-G2. (Calcium-signaling pathway modulates palmitate uptake and metabolism in Hep-G2 cells). Marra, C.A. y Alaniz, M.J. T. INIBIOLP (Inst. Investigac. Bioquímicas de La Plata). Cat. de Bioquímica, Facultad de Ciencias Médicas. Univ. Nac. de La Plata, 60 y 120. (1900) La Plata. Argentina.

Se estudió el mecanismo de transducción involucrado en la captación y desaturación del palmitato en células Hep-G2 utilizando diferentes antagonistas de la ruta del calcio. El pretratamiento de las células con un inhibidor de fosfolipasa-C (neomicina) ó con inhibidores de PK-C (staurosporina, calphostina-C) no impidió el aumento de la captación de calcio provocado por ionomicina ó A-23187. Este efecto desapareció por preincubación con antagonistas de calcio/calmodulina (trifluoperazina, W-7, calmidazolium ó KN-62). Diferentes tiempos de preincubación con PMA no produjeron cambios significativos. La respuesta a los ionóforos fue parcialmente mimetizada por inhibición de proteín-fosfatasa con calyculina-A y en menor medida con ácido okadaico. En células al estado basal, BAPTA, W-7 y KN-62 estimularon la captación de palmitato y la actividad de acil-CoA sintetasa, e inhibieron la actividad de fosfolipasa A_2 y la biosíntesis de palmitoleato. Los resultados sugieren que la captación y metabolismo del palmitato en células Hep-G2 se encuentran controlados por una proteín-quinasa calcio/calmodulina-dependiente, de modo tal, que la supresión de su actividad tónica incrementa la captación e inhibe la conversión del sustrato y su estimulación disminuye la captación sin causar cambios en la desaturación oxidativa.

XVI - 9 IMPORTANCIA DE LAS PROPIEDADES REGULADORAS DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA EN LA GLICOLISIS Y GLUCONEOGENESIS. (The importance of the regulatory properties of phosphofructokinase in glycolysis and gluconeogenesis). Ortega^{a,c}, E., Guixé^b, V. y Cascante^a, M. (Facultat de Química, Universitat de Barcelona^a; Facultad de Ciencias, Universidad de Chile^b; Facultad de Ciencias, Universidad de la República^c, Uruguay).

Tradicionalmente, se supone que para el estudio de la regulación de una vía metabólica se necesita identificar la etapa limitante de ésta para luego estudiar todas las posibles interacciones de la enzima con los componentes de la vía. En la glicólisis, este papel ha asignado a la fosfofructoquinasa (PFK), dado su complejo mecanismo cinético y a la gran cantidad de efectores que modulan su actividad.

En *E. coli* existen dos isoenzimas de PFK: Pfk-1 presenta una cinética sigmoide para la fructosa-6-P e inhibición alostérica por ADP y PEP. Pfk-2 presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos e inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P. Además disponemos de una mutante de Pfk-2, llamada Pfk-2* que no presenta inhibición por MgATP.

Actualmente conocemos las propiedades cinéticas de las distintas formas de PFK, además de las velocidades de crecimiento en distintas fuentes de carbono, y la concentración intracelular de algunos metabolitos para estas cepas isogénicas de *E. coli* que poseen PFK con distintas propiedades reguladoras. En el presente trabajo se utiliza un modelo computacional de simulación metabólica y las herramientas del análisis del control metabólico para estudiar los cambios en el control de la glicólisis-gluconeogénesis dependiente del perfil de isoenzimas de PFK. (Financiado Proyecto Fondecyt 1981091 y AECl)

XVI - 10 UNA ESTRATEGIA GENERAL PARA EL DISEÑO Y POSTERIOR ANALISIS DE GRANDES CAMBIOS METABOLICOS (A general strategy for the design and subsequent analysis of large metabolic changes). Acerenza, L. Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

En el curso de la evolución, la maquinaria bioquímica celular ha desarrollado un conjunto de comportamientos tendientes a contrarrestar una gran diversidad de desafíos impuestos por el entorno. La transición entre dos modos de operación, desencadenada por un cambio ambiental, depende de la existencia de mecanismos moleculares que producen grandes cambios en concentraciones de metabolitos o flujos. Algunos de estos mecanismos actúan "prendiendo" y "apagando" la actividad de enzimas mediante ciclos de modificación covalente. Estas respuestas de tipo todo o nada no se pueden describir adecuadamente mediante las estrategias de análisis y diseño del control metabólico que han sido desarrolladas para pequeños cambios.

En la presente contribución mostramos como la aplicación de un procedimiento general de diseño y análisis de grandes cambios metabólicos permite diseñar una cascada monocíclica que presenta comportamiento todo o nada. La aplicación de este método requiere la consideración de todas las restricciones (estructurales, cinéticas y de diseño) involucradas en el problema. A partir de estas restricciones se puede realizar un análisis de las propiedades de sensibilidad posibles en las condiciones de diseño impuestas. En particular, la aplicación de teoremas de sumación válidos para grandes cambios metabólicos permite demostrar que existe una fuerte dependencia entre las respuestas producidas por el cambio de algunos parámetros del sistema. Destaquemos finalmente que algunas de las respuestas que son imposibles bajo ciertas condiciones podrían implementarse mediante la modificación de la estructura de la red o el empleo de leyes cinéticas más flexibles que enriquecen los patrones que pueden obtenerse.

Panel 1

BIOLOGIA CELULAR

1 - ESTUDIO DE LA MAQUINARIA MOLECULAR QUE REGULA EL RECICLAJE DESDE EL FAGOSOMA (Study of molecular machinery involved in recycling from phagosomes) Damiani, MT, Colombo M.I. - Laboratorio de Biología Celular y Molecular-IHEM-CONICET FCM-UNCuyo-Mendoza-Argentina.

La fagocitosis es el mecanismo utilizado por las células para internalizar rápida y específicamente partículas de gran tamaño (microorganismos). Los fagosomas tempranos son estructuras dinámicas que intercambian material con otros compartimientos tales como endosomas, el trans-Golgi y la membrana plasmática a través de eventos de fusión y de la formación de vesículas de reciclaje. Los mecanismos moleculares involucrados en la formación de vesículas de reciclaje desde el compartimento fagosomal no están claramente dilucidados. El tratamiento con wortmanina, un inhibidor de la PI-3 kinasa disminuyó la internalización y el reciclaje del marcador fagocítico. Resultados similares se obtuvieron con Fluoruro de Aluminio, compuesto que activa la forma GDP de proteínas G heterotriméricas, indicando que moléculas involucradas en mecanismos de traducción de señales regularían dicho proceso. La participación del citoesqueleto en el transporte de vesículas de reciclaje se estudió con agentes que interfieren con la polimerización de microtúbulos (nocodazol, colchicina y vinblastina). El reciclaje desde el fagosoma no fue significativamente modificado por la presencia de estos inhibidores sugiriendo que los microtúbulos no estarían involucrados en este proceso. Estos resultados concuerdan con reportes previos que señalan que nocodazol, si bien altera la distribución intracelular de los endosomas no modifica el reciclaje de transferrina, sugiriendo que el reciclaje desde el compartimiento endosomal y del fagosomal serían regulados por una maquinaria molecular semejante.

2 - CARACTERIZACION Y LOCALIZACION IN VIVO DE RAB4 SALVAJE Y MUTANTES (Characterization and in vivo localization of Rab4wt and mutants) Cordero, J. y Colombo, M.I. IHEM-CONICET, Facultad de Cs. Médicas, U.N.C., Mendoza, Argentina.

Rab4 es un miembro de la familia de proteínas Rab involucradas en el transporte mediado por vesículas. Trabajos previos indican que Rab4 colocaliza con el receptor de transferrina en compartimentos endocíticos tempranos, regulando el reciclaje de dicho receptor desde el compartimento endosomal a la membrana plasmática. Se generaron la mutante activa, Rab4Q67L, y la inactiva Rab4S22N, como proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) observando en células vivas su localización por microscopía de fluorescencia. GFP-Rab4 cepa salvaje se localizó en vesículas cercanas a la membrana plasmática y en la región perinuclear con alto grado de colocalización con el marcador de endosomas tempranos dextrano-rodamina, internalizado por endocitosis. Rab4Q67L se distribuyó mayormente en la región perinuclear y sólo se observó colocalización con dextrano-rodamina en aquellas estructuras vesiculares cercanas al núcleo. En cambio, la mutante Rab4S22N se concentró en la región perinuclear con escasa colocalización con dextrano-rodamina.

Por otro lado se estudió la función de Rab4 en la endocitosis y reciclaje de transferrina en células TRV-b1 que sobreexpresan el receptor de transferrina humano. La sobreexpresión de Rab4 cepa salvaje y de la mutante S22N inhibió el reciclaje de transferrina a la membrana plasmática respecto a las células control. En cambio la mutante activa Q67L aumentó significativamente el reciclaje del receptor de transferrina.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de Rab4 altera morfológica y funcionalmente el centro de reciclaje perinuclear.

3 - ADP-RIBOSILACION DE RAB5 POR LA TOXINA EXOS DE P. AERUGINOSA AFECTA LA ENDOCITOSIS (ADP-ribosylation of Rab5 by ExoS of *P. aeruginosa* Affects Endocytosis) ¹ Barbieri, A. ¹ Sha, Q. ² Bette-Bobillo, P. ¹ Stahl, P. D. y ² Vidal, M.. ¹ Cell Biology and Physiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA ² CNRS, Université Montpellier II, Montpellier, France.

Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S (ExoS) is an ADP-ribosyltransferase that modifies low-molecular weight GTPases. Ras ADP-ribosylation by ExoS has been shown to occur *in vitro* and *in vivo*, leading to inhibition of Ras signal transduction. Initial experiments showed that several members of the Rab family are also modified by ExoS. Rab proteins are crucial regulators of intracellular vesicle traffic. Here we studied the effect of Rab5 ADP-ribosylation by ExoS on its cellular function, i.e. regulation of early endocytic events. Co-culture of CHO cells with *P. aeruginosa* induced a marked decrease in horseradish peroxidase (HRP) uptake compared to non-infected cells, while co-culture with a *P. aeruginosa* mutant strain that fails to produce ExoS did not lead to any change in HRP uptake. Microinjection of recombinant ExoS into *Xenopus* oocytes induced strong inhibition of basal HRP uptake by oocytes. Moreover, co-injection of recombinant ExoS with Rab5 abolished the typical stimulation of HRP uptake obtained after the GTPase microinjection. Cytosols prepared from injected oocytes were used in an endosome-endosome fusion assay. Cytosol from ExoS microinjected oocytes was ineffective in promoting endosome-endosome fusion. However, in these conditions, the addition of Rab5 to the assay led to fusion recovery. Finally, EEA1 binding to immobilized Rab5 fused with glutathione S-transferase was highly diminished after GTPase ADP-ribosylation by ExoS, and EEA1 association with endocytic vesicles was significantly decreased in the presence of the bacterial enzyme.

4 - REQUERIMIENTO DE CALCIO PARA LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS PERMEABILIZADOS (Calcium requirement in acrosomal exocytosis in permeabilized human spermatozoa) De Blas G., Michaut M y Mayorga L. Lab. de Biología Celular y Molecular. IHEM-CONICET. Fac. de Ciencias Médicas. Univ. Nac. de Cuyo.

Durante la reacción acrosómica, paso fundamental en la fecundación en mamíferos, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona en múltiples puntos con la membrana acrosomal externa, con posterior vesiculización y exposición del contenido acrosomal. Esta exocitosis regulada puede desencadenarse provocando un aumento de calcio citoplasmático con el agregado de ionóforos específicos. En espermatozoides permeabilizados hemos observado que concentraciones micromolares de calcio libre inducen la exocitosis del gránulo acrosómico. Bario y estroncio provocaron también la exocitosis, pero a concentraciones próximas a 1 mM. La reacción es también inducida por el agregado de Rab3A recombinante activado (una GTPasa monomérica presente en el acrosoma). En este último caso no se requiere el agregado de calcio. Rab3A indujo secreción acrosomal aún en la presencia de 10 mM EGTA o 5 mM BAPTA sugiriendo que calcio no es requerido luego de la activación de Rab3A. Sin embargo, agregado del ionóforo A23187, que permitió la salida del calcio contenido en el acrosoma, inhibió completamente la exocitosis inducida por Rab3A. Estos resultados sugieren que calcio es requerido luego de la activación de Rab3A, y que probablemente el mismo sea aportado localmente desde el acrosoma por la apertura de canales ubicados en la membrana de este gránulo secretorio.

5 - IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA RECONOCIDA POR AUTOANTICUERPOS INDUCIDOS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV) (Identification of a protein recognized by antibodies induced by mouse hepatitis virus (MHV)). Mathieu PA*, Gómez KA*, Coutelier J-P*, Retegui LA. *IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, y #Unit of Experimental Medicine. Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Se ha demostrado que la infección de ratones con el MHV-A59 afecta la respuesta inmune, ya que el virus induce hipergamaglobulinemia, con predominancia de inmunoglobulinas (Ig) de la subclase IgG2a, y aumenta una respuesta autoinmune preestablecida. Experimentos de western-blot indicaron que en los sueros de ratones CBA/Ht y BALB/c infectados con el MHV-A59 existían autoanticuerpos (autoAb) que reconocían una proteína de aproximadamente 40kDa presente en hígado y riñón. La proteína fue purificada e identificada como la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), la última enzima involucrada en el catabolismo de tirosina. A pesar de la presencia de los autoAb, los ratones no manifestaron síntomas de tirosinemia, ya que los niveles plasmáticos de aminoácidos fueron similares en los animales controles e infectados. Se determinó que los autoAb anti-FAH correspondían a diferentes subclases de Ig, y que su presencia no se correlacionaba con una concentración elevada de Ig sérica, lo cual permite descartar la activación policlonal inespecífica de células B como responsable del proceso autoinmune. Además, experimentos de competición en el western-blot indicaron que los autoAb estaban dirigidos contra un epítopo críptico de la proteína. Se concluye que la inducción de autoinmunidad se debería a la similitud entre la FAH y alguna de las proteínas virales.

6 - EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE INTERFERON- α 2b Y FLAVONOIDES EN UNA LINEA DE CELULAS TUMORALES (Antiproliferative effect of interferon- α 2b and flavonoids on a human tumour cell line) Blank V., Poli, C.; Marder, M.; Roguin, L. IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina.

Los interferones (IFN) constituyen una familia de proteínas que se caracterizan por ejercer actividades antiviral, antiproliferativa e inmunomodulatoria. En un trabajo previo mostramos que el IFN- α 2b inhibe la proliferación de una línea de células provenientes de un carcinoma cervical humano (WISH). Puesto que también se ha demostrado la acción antimitotónica de algunos flavonoides sobre el crecimiento de células tumorales, decidimos evaluar el efecto de un conjunto de flavonoides naturales y sintéticos sobre el crecimiento de células WISH, en presencia y ausencia de IFN- α 2b. De 24 flavonoides ensayados, los dos derivados sintéticos más efectivos fueron la 2'-nitroflavona y la 2',6-dinitroflavona, con DE50 aprox. 3 μ M, mientras que el flavonoide natural crisina mostró una DE50 50 μ M. Cuando la acción de cada uno de estos compuestos se evaluó en presencia de una concentración subóptima de IFN- α 2b, se obtuvo una mayor actividad antiproliferativa equivalente a la suma de los efectos de los componentes individuales. Sin embargo, ninguno de los flavonoides inhibió la unión de [125 I]IFN- α 2b a receptores de células WISH, sugiriendo que actúan por un mecanismo distinto al utilizado por el IFN.

Los resultados obtenidos demuestran una mayor eficiencia biológica de los flavonoides en combinación con el IFN- α 2b, y sugieren que la presencia de un grupo NO₂ en la posición 2' sería importante para ejercer un efecto citostático.

7 - ESTUDIO DE LA INTERACCION DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS CON SUS RECEPTORES MEDIANTE EL USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (Monoclonal antibodies as probes to study the interaction of the granulocyte colony stimulating factor to its receptors) Marino*, V.; Sterin-Prync*, A.; Roguin*, L. *IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica y *BIOSIDUS S.A. Buenos Aires, Argentina.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una glicoproteína de 174 aminoácidos que estimula la proliferación y diferenciación de precursores neutrófilos. Con el propósito de caracterizar su interacción con receptores, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-hG-CSF, denominados 6E3 y 8C2. Ensayos de ELISA de competición indicaron que los dos mAbs reconocieron al hG-CSF nativo, aunque sólo el mAb 8C2 detectó a la proteína reducida y bloqueada. Mientras el mAb 6E3 inhibió la proliferación inducida por hG-CSF de células NFS-60 (leucemia mieloide murina), el mAb 8C2 no produjo ningún efecto. Además, sólo el [125 I]mAb 8C2 reconoció al hG-CSF previamente unido a receptores de membranas celulares. Para identificar los epítopos reconocidos por los mAbs, se realizaron digestiones proteolíticas del hG-CSF con distintas endoproteinasas: Arg-C, Glu-C, quimotripsina y tripsina. La inmunorreactividad de los péptidos obtenidos se analizó por Western Blot. La secuencia de aminoácidos de algunos de estos fragmentos se determinó por degradación de Edman. Los resultados indicaron que el mAb 6E3 reconoció un epítopo conformacional localizado en la región 1-122/123 del hG-CSF y probablemente involucrado en el dominio de unión a receptores. Por otro lado, el mAb 8C2 estaría dirigido contra un epítopo lineal, comprendido entre los aminoácidos 41-58 de la citoquina, que queda expuesto luego de la unión del hG-CSF a sus receptores.

8 - UBICACION RELATIVA DE LOS SITIOS A LOS QUE SE UNEN DIFERENTES HORMONAS LACTOGENICAS EN EL RECEPTOR DE PROLACTINA (PRLR). (Relative localization of the prolactin receptor binding sites to different lactogenic hormones) Longhi S., Blank V., Roguin L., Cristodero M., Retegui L. IQUIFIB (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina.

Han sido determinados los aminoácidos involucrados en la unión de la hormona de crecimiento humana (hGH) al PRLR, mientras que los dominios de unión de otras hormonas lactogénicas, tales como la prolactina ovina (oPRL) y el lactógeno placentario humano (hPL), aún no han sido identificados. Como la hGH, la oPRL y el hPL compiten entre sí por la unión al PRLR, se ha propuesto que se unen al mismo sitio del receptor, aunque este hecho no ha sido demostrado.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el/los sitio/s del receptor al que se unen la oPRL y el hPL coinciden total o parcialmente con el de la hGH. Para ello utilizamos membranas que expresan el PRLR (células Nb2 e hígado de rata) y, como reactivo biológico, un anticuerpo monoclonal (Mab R7B4) que reconoce un epítopo del PRLR parcialmente solapado con el sitio de unión de la hGH.

El Mab R7B4 inhibió la unión de la [125 I]-hGH a microsomas de hígado de rata, pero no afectó la de la [125 I]-oPRL y la [125 I]-hPL, lo cual sugiere que el sitio al que se unen estas dos hormonas coincide sólo en parte con el correspondiente a la hGH. Por otro lado, el Mab inhibió de la misma forma la unión de la hGH y de la oPRL a los receptores presentes en las células Nb2, pero no afectó la del hPL, lo cual indica que en estos receptores los sitios de unión de la hGH y de la oPRL serían idénticos y distintos al del hPL.

9 - CAPACIDAD DE GLICOCONJUGADOS CON ACTIVIDAD DE GRUPO SANGUINEO A PARA ACTUAR COMO RECEPTORES DE LA TOXINA LABIL AL CALOR DE *E. COLI* EN CELULAS HT-29. (Ability of glycoconjugates with A blood group activity to act as *E. coli* heat-labile toxin receptors). Galván E.M., Monferran C.G. CIQUIBIC. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

La toxina lábil al calor de *Escherichia coli* (LT-I) y la toxina colérica (TC) comparten un alto grado de homología estructural, funcional e inmunológica. Aunque el gangliósido GM1 es considerado el receptor de ambas toxinas, LT-I parece utilizar además receptores no reconocidos por TC. Resultados previos obtenidos en conejo sugieren que glicoconjugados con actividad de grupo sanguíneo ABH están involucrados en la respuesta secretoria inducida por LT-I *in vivo*. En el presente trabajo se estudió la participación de glicoconjugados con actividad de grupo sanguíneo A como receptores de LT-I en la línea celular de adenocarcinoma HT-29, cuando GM1 fue bloqueado por la subunidad B de TC. La unión de LT-I a las células fue específica y pudo ser bloqueada, en forma dependiente de la dosis, con anticuerpos monoclonales anti-A y lectina *Helix pomatia*. Asimismo, LT-I fue capaz de producir un incremento en los niveles de AMPc celular aún en presencia de subunidad B de TC y este efecto pudo ser inhibido por ligandos del antígeno A. Se investigó la naturaleza de los glicoconjugados con actividad antigénica A y se observó que esta actividad estaba presente sólo en algunos glicolípidos. Estos resultados sugieren que glicolípidos con actividad de grupo sanguíneo A pueden ser receptores funcionales de LT-I, no reconocidos por TC, en células HT-29. Subsidiado por: CONICOR, CONICET, FONCyT, SECyT-UNC.

10 - EXPRESION DE GLICOSILTRANSFERASAS DE GLICOLIPIDOS EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (Expression of glycolipid glycosyl-transferases in *Saccharomyces cerevisiae*). Valdez-Taubas J. y Maccioni, H.J.F. Dpto. Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET) Fac. Ciencias Químicas, Univ. Nac. de Córdoba.

Los dominios transmembrana de proteínas residentes del Golgi, son capaces de conferir dicha localización a proteínas reporteras. Sin embargo, la ausencia de homología entre estos dominios no ha permitido definir residuos específicos para la retención. Para definir determinantes de retención de glicosiltransferasas de glicolípidos de eucariotas superiores en el Golgi, intentamos expresarlas heterológamente en *S. cerevisiae* con vistas a aplicar estrategias genéticas de selección de mutantes. Hemos construido vectores centroméricos que dirigen la expresión de α -2,8 sialiltransferasa de pollo (GD3 sintasa) y de la β -1,3 galactosiltransferasa de ratón (GM1 sintasa) o de fusiones que comprenden el tallo citoplasmático y el segmento transmembrana de GM1 sintasa, GD3 sintasa y β 1,4 N-acetilgalactosaminiltransferasa humana (GM2 sintasa) al extremo N-terminal de la GFP (*Green fluorescent protein*). Mediante microscopía de fluorescencia, la fusión GD3 sintasa-GFP, mostró una débil señal de fluorescencia con una distribución compatible con localización en endomembranas. Para el caso de la GM1 sintasa-GFP, utilizando vectores multicopia y optimizando los sitios de iniciación de la traducción para su utilización por *S. cerevisiae*, hemos incrementado el nivel de expresión, detectando un patrón de fluorescencia puntuado, característico del aparato de Golgi. Los resultados indican que, las señales que dirigen a estas proteínas dentro de la vía secretoria y determinan su localización en el sistema de endomembranas en eucariotas superiores, serían funcionales en levadura.

11 - GLUTATION Y VARIACION INDIVIDUAL DE LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN OVINO. (glutathione and individual variation in ram semen cryopreservation). Medina, V.H.; Aisen, E.G.; Quintana, M.M.; Vera Bertoldi, D.V.; Morello, H.; de la Sota, R.L.; Venturino, A. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue, Cinco Saltos, Río Negro y 'Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata Argentina. aventu@uncoma.edu.ar

El semen ovino presenta variaciones entre individuos a la congelación y descongelación en lo que respecta a su calidad para la inseminación artificial, habiéndose observado efectos importantes por el tipo de diluyente empleado. Evaluamos aquí los niveles de glutatión en eyaculados provenientes de diferentes carneros, y el efecto de la congelación en dos tipos de diluyentes. Se seleccionaron seis carneros Merino Australiano de buena calidad de eyaculado, determinada por microscopía óptica, congelando el semen en un diluyente isotónico y otro hipertónico (+ trealosa 100 mOsm) bajo N₂ líquido. Se determinaron dos grupos de carneros con distinta congelabilidad por evaluación microscópica. Se midió glutatión por las técnicas de reciclado y tioles ácido solubles. El glutatión en semen fresco presentó medidas semejantes en todos los machos ($\sim 2 \text{ nmol}/10^8 \text{ cél}$ $p > 0.05$). Al descongelado, el glutatión espermático mostró una tendencia a disminuir en muestras de carneros con problemas de congelabilidad en el diluyente isotónico. Se determinó una importante cantidad de glutatión liberado al medio, estableciéndose diferencias significativas entre ambos grupos (20 vs. 25 $\text{nmol}/10^8 \text{ cél}$ $p < 0.05$). Las muestras congeladas en el medio hipertónico presentaron un contenido de glutatión ligeramente mayor. Los resultados indicarían una relación estrecha entre la presencia de tioles reductores en el semen ovino y una buena congelabilidad, al igual que las mejoras observadas en muestras congeladas con el diluyente hipertónico.

12 - DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTI-OXIDANTE DE CRIOPROTECTORES DE SEMEN OVINO (Determination of the antioxidant capacity in ram semen extenders). Quintana*, M.M.; Medina, V.; Aisen, E.; Morello*, H. y Venturino, A. Facultad de Ciencias Agrarias y Carrera de Medicina*, Universidad Nacional del Comahue. mquinta@uncoma.edu.ar

Los espermatozoides de mamíferos son altamente sensibles al daño peroxidativo, afectando al acrosoma y produciendo una elevada pérdida de la motilidad celular. Las técnicas de congelación y descongelación de semen pueden aumentar la presencia de especies reactivas de oxígeno, afectando el proceso de maduración espermática. En nuestro laboratorio hemos desarrollado diluyentes crioprotectores hipertónicos en base a trealosa, mejorando la calidad al descongelado del semen ovino. Evaluamos comparativamente la capacidad antioxidante de tres diluyentes (base isotónico de Salamon (B1), hipertónico 110 mOsm trealosa (B2) y trealosa + EDTA 2.5 mM (B3)), a través de la determinación de peróxidos lipídicos. Adaptamos la técnica de TBARS a la presencia de pigmentos de la yema de huevo presente en los diluyentes. Hallamos diferencias significativas en la protección antioxidante de los diluyentes *per se*, siendo la producción de peróxidos en lípidos de yema en B2 un 25% menor que en B1 y 20% menor que B3. El tratamiento con ácido ascórbico como pro-oxidante, o mediante la reacción de Fenton (Fe^{2+} y H_2O_2) mantuvo las diferencias absolutas entre los diluyentes. La evaluación de la capacidad antioxidante de los tres diluyentes en semen de Merino australiano indicó una tendencia de menor producción de peróxidos en B2 al postdescongelado con respecto a B1 (0.40 vs 0.46 $\text{nmol}/10^8 \text{ cél}$). Mayores diferencias a favor de B2 se obtuvieron a 3 hs postdescongelado en la raza Pampinta. La mayor capacidad crioprotectora de B2, determinada por la evaluación microscópica del semen ovino, estaría relacionada con una mejor acción antioxidante.

13 - EXPRESION DIFERENCIAL DE UNA GLICOPROTEINA DE OVIDUCTO DE BUFO ARENARUM (Differential expression of an oviductal glycoprotein from *Bufo arenarum*) Martelotto, L., Cabrera, R., Arranz, S. y Cabada, M. - División Biología del Desarrollo, IBR-CONICET. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

L-HGP es una glicoproteína de cubierta gelatinosa de ovocitos de *Bufo arenarum* que se sintetiza y es secretada a la luz del oviducto a medida que éstos recorren este conducto antes de ser fecundados. Ensayos *in-vitro* demostraron que L-HGP previene la ruptura del acrosoma de espermatozoides homólogos permitiendo que reaccionen en las cercanías de la cubierta vitelina. Hemos determinado, por western blot, que L-HGP está presente tanto en extractos como en secreciones de distintas porciones del oviducto y no en otros órganos o tejidos. Por otra parte, L-HGP sintetizada en la primera porción del oviducto posee una diferencia en su peso molecular con respecto al resto sugiriendo que la proteína que está en contacto con la cubierta vitelina posee dominios distintos. La deglicosilación de L-HGP purificada a partir de secreciones de las distintas porciones mostró en todos los casos una doble banda en SDS-PAGE pero de movilidades diferentes en la primera porción. Estudios de inmunohistoquímica convalidaron los estudios realizados por western-blot y mostraron que aún en oviductos no estimulados L-HGP está presente en la región apical de las células secretoras. La secuenciación de dos péptidos internos permitió realizar una búsqueda por homología en bancos de datos. La homología mayor encontrada es con una fosfoinositol polifosfato fosfatasa putativa de *Schizosaccharomyces pombe*.

14 - LA REGULACION DEL $[Ca^{2+}]_i$ EN ENTEROCITOS POR 17 β -ESTRADIOL IMPLICA VIAS DE INFLUJO DIFERENTES A LAS DEL 1,25(OH) $_2$ D $_3$ Y LA PARTICIPACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA RELACIONADAS CON EL ER (Regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in enterocytes by 17 β -estradiol involves influx pathways different than 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and the participation of ER-related membrane proteins). Picotto, G., Rossi A., Russo de Boland, A. y Boland, R. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, Bahía Blanca 8000, Argentina.

Previamente demostramos que el 17 β -estradiol, análogamente al 1,25(OH) $_2$ D $_3$, incrementa rápidamente la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en enterocitos de rata, estimulando según un perfil bifásico las vías de liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares y de influjo del catión del medio extracelular. En el presente estudio el análisis espectrofluorimétrico de los cambios en $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por ambos esteroides en presencia de inhibidores selectivos (neomicina, U-73122, nitrindipina, EGTA, La^{3+} , Ni^{2+}) y en el quenching de fluorescencia de Fura 2 por ingreso de Mn^{2+} , reveló que el 17 β -estradiol, a diferencia del 1,25(OH) $_2$ D $_3$, además de activar canales sensibles a dihidropiridinas, aumenta el influjo de Ca^{2+} via canales SOC (acoplados a la depleción de los reservorios intracelulares). De acuerdo con estas observaciones, la adición simultánea o secuencial de las dos hormonas a los enterocitos mostró acciones aditivas (+60%) sobre la fase de influjo. El análisis por Western blot utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor clásico de estradiol (ER) demostró la presencia de proteínas inmunoreactivas en membranas microsomales con peso molecular correspondientes al ER (67 kDa) y otras de menor tamaño (57-11 kDa). El uso de derivados de 17 β -estradiol ligados covalentemente a BSA indujo un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ similar al de la hormona libre, lo que sugiere la participación de una o más de estas macromoléculas en los efectos no genómicos inducidos por el estrógeno en enterocitos de rata.

15 - INCORPORACION DE UN POLIMERO AUTO-CLIVABLE EN RESPUESTA A LA ACIDEZA A UN TRANSPORTADOR LIPOSOMAL DE DROGAS. (Incorporation of a self-cleavable polymer-responsive acidity- to a liposomal drug carrier). Venier, M.C., Morilla M.J., Montanari A. y Romero E.. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Saenz Peña 180, Bernal 1876, Buenos Aires, Argentina. elromero@unq.edu.ar

Describiremos parte de la optimización de la estructura de un transportador liposomal de drogas destinado a fusionarse con células tumorales, gatillado por el descenso de pH propio del interior de los tumores sólidos. La estrategia comprende la derivatización de un extremo no reductor del ácido (2(8) polisialico (APS), para unirlo covalentemente a fosfatidiletanolamina por medio de una técnica modificada para evitar la autodegradación del APS, en el medio ácido de las aminaciones reductivas tradicionales. Los pasos de derivatización y conjugación fueron los siguientes: 1) APS + IO $_4$ Na (generación de un aldehído en el extremo terminal del APS=AL-APS, 2) + NaAsO $_2$ (eliminación del exceso de IO $_4$ Na, 3) ALP-APS + DPPE + (CH $_3$ O) $_3$ NaBH (conjugación por aminación reductiva a pH 7.4: APS-PDDE, 4) aislamiento y detección del conjugado por elución en columna C18 y corrida en geles de tricina 16 $^{\circ}$ T3 $^{\circ}$ C, 5) cosolubilización de APS-DPPE, eggPC y colesterol para generar liposomas derivatizados, 6) comparación de la relación proteínas plasmáticas adsorbidas/lípidos de membrana entre liposomas derivatizados y sin derivatizar. Los resultados indicaron que: a) es posible derivatizar APS por aminación reductiva modificada sin reducir sustancialmente su longitud ((10 KD) y b) los liposomas derivatizados poseen una relación proteína plasmáticas adsorbidas/lípidos tan baja como la de los peguilados (Stealth $^{\circ}$):(10 g/mol, lo que hace a estas vesículas aptas para extravasar hacia masas tumorales sólidas.

16 - EL 1,25(OH) $_2$ D $_3$ INDUCE LA TRANSLOCACION A MEMBRANA DEL VDR EN CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS (1,25(OH) $_2$ D $_3$ induces translocation to the membrane of the VDR in skeletal muscle cells). D.A. Capiati *1 , M.T. Tellez Iñón 1 y R. Boland *2 . *Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina. 1 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, CONICET. Buenos Aires, Argentina.

El 1,25(OH) $_2$ -vitamina D [1,25(OH) $_2$ D $_3$] ejerce su acción a través de un mecanismo nuclear mediado por receptor (VDR), similar al de otras hormonas esteroideas, y un modo de acción rápido, no-genómico, que conduce a la activación de vías de transducción de señales al igual que hormonas peptídicas. Esto último sugiere la existencia de un receptor para el 1,25(OH) $_2$ D $_3$ en la membrana plasmática, que aun no ha sido identificado. El músculo esquelético es blanco de las acciones genómicas y no genómicas del 1,25(OH) $_2$ D $_3$. En el presente trabajo, se trataron cultivos de células musculares esqueléticas de embrión de pollo con 1 nM 1,25(OH) $_2$ D $_3$ durante tiempos cortos (1-10 min), seguido de fraccionamiento subcelular. Cada una de las fracciones obtenidas se analizó por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el VDR. Se observó que la hormona induce la translocación del VDR desde el núcleo a la fracción de membranas. Esta relocalización es bloqueada por genisteína (100 μ M), herbimicina (5 μ M) y colchicina (1-50 μ M), implicando la participación de quinasas de tirosina y el transporte a través de microtúbulos en el mecanismo de translocación del receptor. Por otra parte, el tratamiento con 1,25(OH) $_2$ D $_3$ aumenta la fracción de VDR fosforilado en residuos tirosina en la fracción nuclear, sugiriendo la activación de una quinasa de tirosina nuclear. Estos resultados constituyen la primera evidencia de la presencia del VDR en membrana y son importantes para comprender el mecanismo de acción no-genómico del 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (v.g. interacción VDR-TRP en la regulación del influjo SOC por la hormona; Santillán et al., SAIBBM, 2000).

17- EVIDENCIAS INMUNOQUIMICAS Y MOLECULARES DE UNA PROTEINA LIGADORA DE $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -VITAMINA D_3 EN *SOLANUM GLAUCOPHYLLUM*. (Molecular and immunochemical evidence on the existence of a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ binding protein in *Solanum glaucophyllum*). Milanesi, L., Monje, P. y Boland, R. Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. (8000) Bahía Blanca, Argentina.

Se han detectado derivados de vitamina D_3 en varias plantas superiores, entre las cuales la especie *Solanum glaucophyllum* (S.g.) tiene la capacidad de sintetizar cantidades apreciables de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Se desconoce la función que cumple el metabolito en los sistemas vegetales. En las células blanco de los vertebrados el $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se liga a su receptor intracelular específico (VDR), el complejo se transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas del ADN regulando la expresión génica. Con el objeto de investigar la presencia en S.g. de una proteína con características semejantes al VDR se realizaron ensayos de ligado competitivo en suspensiones celulares utilizando $[\text{H}^3]1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ como radioligando; el ligado no específico se determinó en presencia de un exceso de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, detectándose un 43% de desplazamiento que correspondió al ligado específico. Estudios de inmunoblot empleando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio de unión al ADN del VDR y un anticuerpo policlonal dirigido contra el extremo C-terminal del VDR revelaron tres bandas inmunoreactivas de 72 kDa, 58 kDa y 43 kDa en extractos proteicos totales de los distintos órganos y cultivos de callos de S.g. Cuando se utilizó un buffer de alta fuerza iónica para la extracción proteica se logró aumentar notablemente las señales obtenidas con ambos anticuerpos lo que sugiere que dichas proteínas están asociadas a una estructura celular. Estos resultados también se observaron en otras tres solanáceas (*L. esculentum*, *N. glauca* y *N. tabacum*). Se diseñaron primers para amplificar la región de ligado al ADN; los mismos fueron usados en ensayos de PCR a partir de cDNA de callos obteniéndose dos bandas del tamaño esperado.

18 - $1,25(\text{OH})_2$ -VITAMINA D_3 ESTIMULA EN OSTEOBLASTOS EL INFLUJO SOC MEDIADO POR PROTEINAS TRP3 ($1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 stimulates in osteoblasts SOC influx mediated by TRP3 proteins). Baldi C., Vazquez G. y Boland R. Laboratorio de Química Biológica, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670 (8000) Bahía Blanca, Argentina.

En osteoblastos $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina- D_3 ($1,25\text{-D}_3$) induce una respuesta rápida y bifásica en Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que implica activación de PLC, liberación de Ca^{2+} de depósitos IP_3 -sensibles e influjo del catión desde el medio externo a través de canales voltaje-dependientes. En varios tipos celulares la depleción de Ca^{2+} de depósitos internos resulta en la activación de canales de Ca^{2+} de membrana denominados SOC, constituidos, a menos en parte, por proteínas TRP. En este trabajo se presentan estudios funcionales y moleculares realizados a fin de establecer si canales SOC contribuyen al influjo de Ca^{2+} dependiente de $1,25\text{-D}_3$ en osteoblastos. El tratamiento de células osteoblásticas de rata (ROS 17/2.8) con $1,25\text{-D}_3$ en medio libre de Ca^{2+} indujo un aumento rápido y transiente en $[\text{Ca}^{2+}]_i$, correspondiente a la fase IP_3 -dependiente de la respuesta al esteroide; la readición de Ca^{2+} al medio resultó en un incremento rápido de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, evidenciando la existencia de influjo tipo SOC; dicho influjo fue permeable a Mn^{2+} (SOC_{Mn}), insensible a nifedipina y verapamil y bloqueado por Gd^{3+} . Mediante RT-PCR se amplificaron fragmentos de 220 bp y 440 bp con una homología superior al 90% respecto a la proteína TRP3 humana. En células microinyectadas con un pool de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el RNAm de TRP3 humano, se redujo significativamente (60%) el influjo SOC_{Mn} dependiente de $1,25\text{-D}_3$ respecto a células control. En vertebrados TRP forma complejos multiproteicos interactuando con la proteína adaptadora INAD. Por RT-PCR se obtuvo un fragmento homólogo a INAD humana. Estos resultados indican la existencia de una proteína TRP3 involucrada en influjo SOC modulado por $1,25\text{-D}_3$ en osteoblastos y sugieren que la misma podría encontrarse asociada a un homólogo de INAD formando estructuras supramoleculares de señalización.

19 - PROTEINAS TRP QUE FORMAN COMPLEJOS CON EL RECEPTOR DE VITAMINA D MEDIAN EL INFLUJO SOC INDUCIDO POR $1,25(\text{OH})_2$ -VITAMINA D_3 EN CELULAS MUSCULARES (TRP proteins which associate with the vitamin D receptor mediate SOC influx induced by $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 in muscle cells). Santillán G., Vazquez G. y Boland R. Laboratorio de Química Biológica, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670 (8000) Bahía Blanca, Argentina.

En células musculares esqueléticas de ave (*Gallus gallus*) el $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina- D_3 ($1,25\text{-D}_3$) estimula la entrada de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje y canales operados por movilización de Ca^{2+} de depósitos internos (canales SOC). Existen evidencias indicando que los canales SOC de mamíferos están constituidos, al menos en parte, por proteínas de la familia TRP. Su regulación involucra complejos supramoleculares de señalización. Se investigó la participación de proteínas TRP y su asociación al VDR (Vitamin D Receptor) en la modulación del influjo SOC por $1,25\text{-D}_3$ en cultivos de células musculares de pollo. El inmunoblotting de proteínas de lisados celulares empleando un anticuerpo específico contra una secuencia peptídica altamente conservada en la familia TRP, mostró una única banda de 76 kDa, la cual coimmunoprecipitó con el VDR bajo condiciones no denaturalizantes, sugiriendo una asociación entre ambas proteínas. Paralelamente, la microinyección de células con un oligonucleótido antisentido dirigido contra una región altamente conservada del mRNA de TRP de mamíferos cuyo producto de traducción contiene la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítopo del anticuerpo empleado en el inmunoblotting, redujo significativamente (60%) el influjo SOC dependiente de $1,25\text{-D}_3$ respecto a células microinyectadas con oligonucleótidos "sense" y "scrambled". Mediante RT-PCR utilizando primers con ambigüedades diseñados sobre la base de secuencias de nucleótidos altamente conservadas en TRP de mamíferos, se amplificaron fragmentos de 220 bp y 450 bp, cuya secuenciación mostró una alta homología (>95%) con proteínas TRP. Estos resultados no sólo demuestran la participación funcional de proteínas TRP en el influjo SOC inducido por $1,25\text{-D}_3$ en células musculares de ave, sino que constituyen además la primera evidencia molecular sugiriendo la existencia de estas proteínas en músculo esquelético y su asociación al VDR.

20 - INHIBICION DE LA PROLIFERACION CELULAR MEDIANTE LA MODULACION DE LOS NIVELES DE PEROXIDO DE HIDROGENO (Inhibition of cell proliferation by modulating hydrogen peroxide levels). Policastro, L., Molinari, B., Larcher, F., Durán, H. Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina y *Centro de Investigaciones Energéticas y Medioambientales, Madrid, España.

En trabajos previos hemos demostrado un desbalance en el sistema antioxidante en función del grado de malignidad en líneas celulares tumorales de ratón y la inhibición de la proliferación compensando este desbalance mediante la disminución exógena de los niveles de H_2O_2 . El objetivo de este trabajo es estudiar la regulación de la proliferación por H_2O_2 en células normales y tumorales de diferentes orígenes tisulares y de diferentes especies y evaluar si la modulación de los niveles de H_2O_2 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en modelos experimentales. Se determinó la producción de H_2O_2 mediante el ensayo de escopoletina y se demostró un aumento significativo de los niveles de H_2O_2 en función de la malignidad, siendo la producción 4 veces mayor en las células tumorales humanas con respecto a su contraparte normal. Se evaluó la proliferación en células tratadas con catalasa y se demostró una significativa inhibición dependiente de la dosis. En los animales con tumores experimentales tratados durante un mes con catalasa se demostró una inhibición total del crecimiento de los tumores. Se puede concluir que el H_2O_2 participa de un mecanismo general que controla la actividad proliferativa de las células. Por otro lado, estos resultados abren la posibilidad de evaluar la utilización de compuestos capaces de disminuir los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno, como terapias antioxidantes.

21 - DEFICIENCIA DE VITAMINA A Y PROTEINAS EXTRACELULARES EN HIGADO Y RIÑON DE RATA (Vitamin A deficiency and extracellular proteins in liver and kidney of rat) Pérez Aguilar R., Anzulovich* A.C., Oliveros* L., Giménez* M.S., Sánchez S. Departamento de Biología del Desarrollo - INSIBIO - UNT. *Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas - UNSL.

La deficiencia de vitamina A afecta procesos fisiológicos en las células interfiriendo con la proliferación y la diferenciación. Ratas deficientes en vitamina A presentan desorganización de la histoarquitectura hepática. La matriz extracelular, estructura molecular dinámica y compleja, participa en el mantenimiento de la arquitectura tisular, en el funcionamiento de los tejidos y en la regulación de procesos celulares.

Se analiza la expresión de Fibronectina (FN) y Laminina (LM), proteínas de matriz extracelular en hígado y riñón de ratas Wistar hembras adultas separadas en dos grupos, uno con dieta control, con vitamina A (+) y otro sin vitamina A (-). Western immunoblot de extractos de hígado y riñón revelan una mayor expresión de FN y LM en animales vitamina A (-). Esto coincide con los estudios inmunohistoquímicos. En hígado de animales A (-) se observó una mayor expresión de FN en los espacios perisinusoidales, estroma del área portal y alrededor de la vena central, comparado con animales A (+). La inmunodetección de LM evidenció un incremento de expresión en el espacio perisinusoidal, sin diferencias en las membranas basales vasculares y ductales.

En riñones de animales A (-) se observó un incremento en la expresión de FN y LM en membranas basales.

Los resultados sugieren que la deficiencia de vitamina A modifica la expresión de las proteínas Fibronectina y Laminina en hígado y riñón.

22 - CAMBIOS EN LA BIRREFRINGENCIA Y ULTRAESTRUCTURA DEL OVULO DE ERIZO DE MAR CENTRIFUGADO Y FERTILIZADO. (Changes in birefringence and fine structure of the sea urchin egg centrifuged and fertilized). Burgos, M.H., Goda, M. y Inoue, S. IHEM-CONICET. Fac. Ciencias Médicas, U.N.Cuyo, Mendoza, Argentina y MBL. Woods Hole, Ma. USA

Ovulos del erizo de mar (*Arbacia punctulata*) suspendidos en agua de mar y sometidos a centrifugación por varios minutos de 4000 a 6000 RPM se estratifican en varias capas. Del polo centrípeto (al tope) al polo centrífugo (al fondo) se reconocen una capa de grasa, una zona clara que contiene el núcleo, una capa de mitocondrias, una capa abundante de gránulos citoplásmicos y en el fondo los gránulos con pigmento.

Cuando estos óvulos estratificados por la centrifugación son observados en el microscopio centrífugo polarizador una cortina de material birrefringente se observa por debajo de la capa de grasa en la parte alta de la zona clara rodeando al núcleo. Esta birrefringencia aumenta con la velocidad de centrifugación y el tiempo.

Cuando los óvulos estratificados por la centrifugación son fertilizados la birrefringencia desaparece en segundos.

Para evaluar la causa de este cambio se estudiaron los óvulos con el microscopio electrónico.

Las secciones finas de los óvulos estratificados y no fertilizados fijados en glutaraldehído con sucrosa revelaron que la zona birrefringente estaba ocupada por bandas de retículo endoplásmico alineadas paralelas al eje de la centrifugación.

En los óvulos estratificados y fijados 5 min después de la fertilización y desaparición de la birrefringencia el retículo endoplásmico aparece fragmentado en pequeñas vesículas colapsadas.

Estas observaciones sugieren que la birrefringencia se debería al estado y distribución del retículo endoplásmico.

23 - INTERACCIONES CELULA FOLICULAR - OVOCITO MEDIADAS POR GAP-JUNCTIONS DURANTE LA OVOGENESIS DE ANFIBIOS (Follicular cell-oocyte interactions via gap junctions during amphibian oogenesis) Villecco E., Genta S., Sánchez Riera A., Sánchez S. Departamento de Biología del Desarrollo. INSIBIO. Conicet - UNT

La comunicación celular via gap-junctions juega roles importantes en variados procesos celulares (homeostasia, morfogénesis, diferenciación, crecimiento) a través del pasaje de iones, segundos mensajeros, metabolitos.

En el presente trabajo se analizan las interacciones mediadas por gap-junctions en folículos ováricos del anfibio *Bufo arenarum*, durante la previtelogénesis, vitelogénesis y maduración. En estas etapas tienen lugar procesos claves para el crecimiento y la diferenciación de los ovocitos, en los cuales se requiere una acción coordinada de los componentes del folículo ovárico. Se observó por MET la presencia de uniones gap heterologas en todos los períodos de la ovogénesis. Mediante pruebas funcionales con el colorante Lucifer Yellow, se determinó que la funcionalidad de las uniones varía durante el ciclo sexual anual, siendo funcionantes durante el período reproductor (primavera-verano) a diferencia del período invernal. Se determinó la presencia de conexinas Cx43 y Cx32 en los diferentes tipos de folículos. Ensayos "in vitro" e "in vivo" muestran que FSH y 17β estradiol inducen la funcionalidad de las gap junctions, postulándose su participación en la vitelogénesis.

El bloqueo de dichas uniones por anticuerpos anti-Cx43 y anti-Cx32 producen maduración del ovocito, efecto contrarrestado por la inyección de cAMP. Se propone a este segundo mensajero como la molécula reguladora del arresto de la meiosis en los anfibios.

24 - CONSTRUCCION DEL scFV-5.01 REACTIVO CON LA TETRASPANINA CD63 (Production of scFv-5.01, reactive with Tetraspanin CD63) Mantegazza, A.*, Barrio, M.*; Bover, L.*; Moutel, S.*; Gruel, N.*; Teillaud, J.L.*; Mordoh, J.* * Institut Leloir, IIB-BA, Fundación Campomar; *Laboratoire de Biotechnologie des Anticorps, Unité INSERM 255, Institut Curie'.

El AMC FC-5.01 reconoce al Ag CD63, Tetraspanina presente en lisosomas, endosomas y en la superficie de células de melanoma, plaquetas activadas, monocitos y células dendríticas (CD). El complejo de superficie FC-5.01-CD63, es rápidamente internalizado hacia vesículas intracelulares. Debido a la mayor penetración intratumoral, menor inmunogenicidad y gran versatilidad para la construcción de moléculas quiméricas, se construyó una molécula recombinante scFv-5.01. Para ello se clonaron y ensamblaron las porciones variables de la cadena pesada (VH) y la cadena liviana (VL) del anticuerpo parental, separadas por un péptido espaciador (GGGGG)₃, en el plásmido de expresión bacteriana pSW1. Esta construcción incluye también dos secuencias marcadoras (c-myc y his₆) en el extremo 3' de VL, que facilitan su reconocimiento en los ensayos in vitro y su purificación (IMAC).

Se seleccionó un clon productor y tras la inducción con IPTG se obtuvo scFv-5.01 en la fracción periplásmica. La reactividad con CD63 se ensayó mediante Western blots sobre plaquetas e inmunofluorescencia (FACS) y microscopía confocal sobre células de melanoma y CD. scFv-5.01 reconoce al Ag CD63 tanto en membrana plasmática como en endosomas perinucleares y lisosomas, observándose un patrón de reconocimiento semejante al del AMC FC-5.01.

Agradecemos a la Dra. Pastorino y al Lic. Michele Bianchini.

25 - INCORPORACION DEL EPITOPE OPSONIZABLE α -GAL A MEMBRANAS DE CELULAS TUMORALES. (Incorporation of opsonizable epitope α -gal to tumor cell membranes). Barrio, M.M.¹; Goldszmid, S.R.^{1,2}; Wainstok, R.²; Mordoh, J.¹ Ambos autores contribuyeron igualmente. Instituto Leloir IIB-BA Fundación Campomar,²Dpto. Qca. Biológica FCEyN,UBA

Las vacunas antitumorales autólogas son usualmente poco eficaces por la baja inmunogenicidad de los antígenos asociados a tumor e insuficiente captación de las células tumorales (CT) por células presentadoras de antígeno (APC). Para incrementar dicha captación se podrían opsonizar las CT con IgG específicas para permitir la unión a receptores FC en APC. En el hombre el 1% de las IgGs circulantes lo constituyen anticuerpos (Ac) anti-Gal. Dichos Ac reconocen el epítopo gal α 1-3gal β 1-4GlcNAc-R (α -gal) presente en mamíferos no primates y otros organismos, pero ausente en el hombre (falta de α 1-3galactosiltransferasa). Para incorporar α -gal a CT, opsonizarlas con Ac anti-Gal y cargar APC *in vitro*, se fusionaron glóbulos rojos de conejo (GRc) (fuente de α -gal), con células IIB-MEL-J, B16F1 y MCF-7. Se analizó la incorporación de α -gal a las membranas con lectina BSI-FITC, y la opsonización con suero humano (FACS). La relación CT:GRc 1:20-1:30 resultó óptima, con >50% de células con α -gal en "parches" de membrana o GRc fusionados enteros (microscopía confocal). Los híbridos fueron eficientemente opsonizados con suero humano, hecho que favoreció la captación de los mismos en cocultivos con APC. Estas evidencias indicarían que la incorporación del epítopo α -gal podría ser explotado para la generación de vacunas antitumorales. Agradecemos a F. Fraga y M. Bianchini

26 - EL CONTENIDO Y LA ACTIVIDAD DE CATALASA DE HIGADO DE RATON DISMINUYEN DURANTE LA PRIVACION DIETARIA DE PROTEINAS. (Both activity and content of mouse liver catalase decrease during dietary protein depletion). Ronchi V.P., Conde R.D., Sanlloranti P.M. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEN, UNMDP. CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. ronchi@mdp.edu.ar. Patrocinios: UNMDP y CONICET.

Anteriormente hemos examinado la regulación del contenido de proteínas hepáticas relacionadas con el estrés oxidativo durante el suministro de dietas apteicas o suplementadas con aminoácidos. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la privación dietaria de proteínas y aminoácidos sobre el contenido y la actividad de la enzima catalasa (CAT). Para ello, grupos de ratones (cepa balb-c), fueron alimentados durante cinco días con dietas: normal (23% caseína), sin proteínas o dietas suplementadas con diferentes aminoácidos. Luego se determinó la actividad y el contenido (mediante "western-blot") de CAT en el citosol hepático. El suministro de una dieta apteica causó una disminución del 90% en el contenido y actividad de CAT, en ambos sexos. Este efecto fue atenuado parcialmente al administrar dietas sin proteínas suplementadas con aminoácidos esenciales, metionina, treonina o cisteína. Con el objeto de incluir a la CAT dentro del mapa bidimensional de proteínas afectadas por la dieta sin proteínas, se realizaron "western-blots" de geles 2D correspondientes a citosoles de animales normales y alimentados con la dieta sin proteínas. Se detectaron cuatro "spots" de CAT cuyos Mr abarcaron el rango 56.200-56.400 y sus pI resultaron ligeramente superiores a los descriptos (7.0, 7.1, 7.3, 7.7). Si bien la catalasa integraría el conjunto de proteínas vinculadas con el estrés oxidativo cuyo contenido es regulado por la dieta apteica, el efecto causado sobre ella por los aminoácidos esenciales, metionina, treonina y cisteína es diferente al que provocan sobre las glutatión transferasas y la anhidrasa carbónica III.

27 - EXPRESION DE LA RECOMBINASA CRE EN NEURONAS CATECOLAMINERGICAS DE RATONES TRANSGENICOS (Expression of Cre Recombinase in Catecholaminergic Neurons of Transgenic Mice) Gelman D.M., Noain D., Falzone T.L., Avale M.E., Cerdán M.G. y Rubinstein M. INGEBI, CONICET - Depto. Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas y Nat., Universidad de Buenos Aires.

La dopamina y la noradrenalina son dos neurotransmisores que participan en el control central de funciones tan variadas como la actividad locomotora, la ingesta, el ciclo sueño/vigilia, la atención, la motivación y el desarrollo de procesos cognitivos. Ambas catecolaminas son sintetizadas a partir de la conversión inicial de tirosina a L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Para caracterizar la función específica de proteínas presentes en neuronas catecolaminérgicas como los transportadores de dopamina y de noradrenalina, el transportador vesicular de monaminas, la monoaminooxidasa A y B y la propia TH se han generado distintos ratones mutantes portadores de alelos nulos. Otras proteínas que se expresan ubicuamente, como el Nurr1 y la parkina, y que parecen cumplir un papel clave en el desarrollo y la diferenciación de neuronas catecolaminérgicas sólo pueden ser estudiadas en ratones donde las mutaciones nulas están restringidas espacialmente a estas neuronas y no al resto de las células del organismo. Con este objetivo generamos ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de TH. El análisis inmunohistológico realizado en secciones sagitales y coronales de ratones transgénicos reveló la presencia de un alto número de células con núcleos positivos para Cre en la sustancia nigra, área tegmental ventral, locus coeruleus y diversos núcleos hipotalámicos donde se expresa normalmente TH. La utilización de dos cromógenos diferentes permitió corroborar la colocalización de inmunoreactividad de Cre y TH en estos núcleos. Para determinar si los ratones TH-Cre expresan una recombinasa funcional los cruzamos con otra cepa de ratones transgénicos portadores un gen lacZ floxeado seguido de un gen bacteriano de fosfatasa alcalina (AP) bajo el control transcripcional del promotor de CMV. Los ratones doble transgénicos deberían expresar lacZ en todas sus células excepto en donde se expresa Cre que deberían ser positivas para AP. El análisis de estos animales está en progreso y los resultados serán presentados.

28 - OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE EN CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO DE HIPERTENSION. (Inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells during the development of hypertension). Cruzado, M.; Castro C.; Risler N.; Rüttler M.; Miatello R.. Laboratorio de Cultivo Celular, F.C.Médicas, U.N.Cuyo, Mendoza, Argentina. Proyecto 06/J114 SECYT UN Cuyo.

El objetivo fue evaluar el nivel de actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células cultivadas de músculo liso vascular (cMLV) aórticas de ratas espontáneamente hipertensas en el estadio precoz del ascenso de la presión arterial (pSHR) (4 semanas; PA:137±3mmHg) y en estadio de hipertensión establecida (SHR) (12 semanas; PA:183±3mmHg), y sus respectivos controles normotensos (pW; PA:116±3mmHg; p<0.01 y W; PA:114±3 mmHg; p<0.001), n=6 todos los grupos. En cultivos de cMLV obtenidas de aorta torácica por digestión enzimática, entre pasajes 4 a 8, se indujo la expresión de iNOS con LPS 10 µg/mL al medio de cultivo, MEM F-12 con suero fetal bovino (SFB) al 0.1% por 24h. Se determinó la concentración de nitritos (Griess - mol/gprot) en el medio de cultivo y la actividad de iNOS (Bredt) en el lisado de células por conversión de [³H]-L-arginina en [³H]-citrulina (dpm/gprot/min) Los datos (media±SEM) se contrastaron por ANOVA y post-test de Bonferroni (* p<0.01, ** p<0.001 vs pW o W, n=6 en todos los grupos).

Resultados	pW	pSHR	W	SHR
Nitritos	440±59	197±17*	627±56	174±10**
INOS	510±54	109±31**	537±37	357±60*

Los cambios en la generación de óxido nítrico por la iNOS de cMLV aparecen desde la etapa precoz del desarrollo de la hipertensión y podrían participar en la génesis de la alteración vascular asociada a esta patología.

29 - LOS RECEPTORES A MANOSA-6-FOSFATO EN HIGADO DE RATA VARIAN DURANTE EL DESARROLLO PERINATAL (Mannose 6-phosphate receptors in rat liver change during perinatal development). Romano, P., López, A., Belmonte, S., Sosa, M.A. IHEM-CONICET, Fac. Cs. Médicas. UNCuyo. Mendoza. Argentina.

Los receptores a manosa-6-fosfato (MPRs) participan en el transporte de hidrolasas ácidas a lisosomas y en la recaptura de enzimas secretadas. Dos tipos de receptores han sido descritos: el catión independiente (CI-MPR) y el catión dependiente, (CD-MPR). Aunque la expresión de los MPRs varía espacial y temporalmente durante la embriogénesis no se conoce si las relaciones de éstos para un mismo órgano varían durante el desarrollo. Nos propusimos cuantificar los MPRs en hígado de rata a distintas edades (fetos de 18 días, recién nacidos, 5, 10 y 20 días de edad y adultos) por inmunoblotting y por ensayos "binding", usando un ligando que contiene manosa-6-fosfato (M6P) (β -glucuronidasa, β -GLU, prepucial de rata). Proteínas de membranas de hígado fueron analizadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las bandas del CI o CD-MPR fueron detectadas con los correspondientes anticuerpos. Para los ensayos "binding" se incubaron cantidades crecientes de β -GLU con membranas, en presencia o ausencia de iones bivalentes y de M6P. Por "Western blot" se observó que el CI-MPR decrece progresivamente en hígado desde fetos hasta valores no detectables a los 22 días y animales adultos. El CD-MPR fue detectable en fetos pero disminuye drásticamente al nacer. Luego este receptor aumenta significativamente a los 11 días, y desde allí decrece progresivamente hacia la edad adulta. La relación de % de CI-MPR/CD-MPR varía entre 40/60 (5 días), 20/80 (10-20 días) y 65/35 (adultos) según la cuantificación por ensayos "binding".

Concluimos que ambos receptores varían diferencialmente durante el desarrollo perinatal. Esto podría estar asociado a funciones específicas de cada receptor en las etapas del desarrollo.

30 - SENSIBILIZACION A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TNF- α VIA ESTRES OSMOTICO. (Sensibilization of TNF- α -induced apoptosis via osmotic stress). Franco L., Coso O., Costas M.. Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina.

El factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) es una citoquina inflamatoria que dispara una señal doble, activando una cascada pro-apoptótica y el factor de transcripción NF- κ B, que controla la expresión de genes anti-apoptóticos. En la mayoría de los tipos celulares, esta inducción de la apoptosis requiere de una sensibilización de la célula blanco, mediante el uso de inhibidores de la transcripción o traducción. Con el objeto de determinar los mecanismos involucrados en la acción apoptótica mediada por TNF- α , se estudió: a) efecto del estrés producido por NaCl y su posible rol sensibilizador a la acción de TNF- α ; b) quinasas involucradas en la cascada apoptótica; c) rol de NF- κ B en este mecanismo. Células Hela preincubadas con NaCl (100 mM) mostraron una respuesta apoptótica sensible a TNF- α (50-0 ng/ml) respecto de células tratadas sólo con TNF- α (naturalmente insensibles al mismo). Esta dosis de NaCl estimuló la actividad de p-38 quinasa. El rol de NF- κ B en esta cascada se determinó midiendo su actividad transcripcional en células Hela. Se observó que el TNF- α aumentó la actividad κ B-Luc, mientras que la dexametasona la inhibió, sin observarse efectos sobre la supervivencia en ambas condiciones. Estos resultados sugieren que la sensibilización a la muerte por TNF- α , no implica sólo el bloqueo de la síntesis de novo de proteínas blanco de NF- κ B sino que además, la activación de quinasas que responden a estrés.

31 - ESTUDIO DE MARCADORES CARACTERISTICOS Y SENSIBILIDAD A SHIGATOXINA EN LA LINEA MURINA DE ENDOTELIO RENAL, RECA-4. (Characteristic markers determination and Shigatoxin sensitivity in the murine renal endothelial line, RECA-4). Gazzaniga S., González L., Wainstok de Calmanovici R. Dpto. Química Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA

Las células endoteliales (CE) presentan gran heterogeneidad funcional y morfológica según el tejido al que pertenecen. Hemos reportado previamente (SAIB, 1999) el establecimiento de una línea de CE, RECA-4, aislada a partir de riñón murino con morfología típicamente "cobblestone". Conserva la expresión de las moléculas de adhesión CD31, presenta altos niveles de ICAM y VCAM (siendo éste último inducible).

Continuando con su caracterización, se determinó que son capaces de captar LDL acetilado, son positivas para el factor de von Willebrand y negativas para la presencia de α -actina de músculo liso, descartándose así su posible origen mesangial. Existen referencias en cuanto a que la Shigatoxina (Stx) estaría asociada al progreso del Síndrome Urémico-Hemolítico. Estas y otras semejanzas junto a la presencia de endotoxinas circulantes podrían empeorar el cuadro, dañando las CE glomerulares. RECA-4 confluentes fueron sensibles a Stx-1 en presencia de LPS. Ultraestructuralmente presentan una característica morfología endotelial con pocas mitocondrias perinucleares, REG y REL hiperactivos y gran tráfico vesicular pero con ausencia de cuerpos de Weibel Pallade. Se observan superficies de contacto célula-célula en cantidad y con gran proximidad entre las membranas (< a 30 nm).

Agradecemos a los Dres. Bolondi (microscopía) e Isturiz (Stx-1). Este trabajo fue subsidiado por Universidad de Bs.As. (UBACYT).

32 - PATRONES DIFERENTES DE POLIPEPTIDOS SALIVALES INDUCIDOS EN DOS CEPAS CONGENICAS (COMPLEJO H-2) DE RATONES (Different patterns of induced salivary polypeptides in two congenic (H-2 complex) mouse strains). Kemmerling U.* y López Solís R.O. ICBM-Facultad de Medicina, U. de Chile y Fac. Ciencias de la Salud, U. de Talca

La inducción de hipertrofia de las glándulas salivales por estimulación crónica con isoproterenol (IPR) se acompaña de una reprogramación de la expresión génica tejido-específica. Esta se relaciona preferentemente con la expresión *de novo* de un grupo de polipéptidos que pertenecerían a la familia de proteínas salivales ricas en prolina. Los polipéptidos han sido detectados tanto en homogenizados glandulares como en la saliva de ratones individuales pertenecientes a una sola cepa (A/Sn). No se ha definido si tales polipéptidos son de carácter variante o invariante en la especie ratón. Dos cepas de ratones congénicas para el complejo H-2 (A/Sn y A.SW) presentaron patrones distintos de polipéptidos salivales inducidos por IPR (IISP). El carácter puro para el fenotipo IISP que presentaron las cepas estudiadas y la detección de los polipéptidos en la saliva permitieron efectuar estudios genéticos. En cruzamientos dirigidos entre las cepas A/Sn y A.SW se observó coexpresión de los IISP de las cepas parentales en la generación F1. Los retrocruzamientos de ratones F1 con ambas cepas parentales generaron descendencia de los fenotipos F1 y parental respectivo en una relación aproximada 1:1. En la generación F2 se observó tres fenotipos IISP, correspondientes a las cepas A/Sn y A.SW y al híbrido F1 con un claro predominio de este último. No se han detectado recombinantes. Estos resultados indicarían para el locus IISP variabilidad genética, expresión codominante y sea, un muy estrecho ligamiento génico entre varios genes o la presencia en cada cepa de un solo gen que codifica el grupo de polipéptidos IISP.

*Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, U. de Chile

33 - LA PLACA DEL PISO DE BOVINO SINTETIZA (Y LIBERA?) UN PRECURSOR GLICOPROTEICO SIMILAR AL PRECURSOR DE RF-Gly I SECRETADO POR EL ORGANO SUBCOMISURAL. (The bovine floor plate synthesizes (and release?) a precursor glycoprotein similar to the precursor of RF-Gly I secreted by the subcommissural organ.) Muñoz RI, Yulis CR, Rodríguez EM. Instituto de Histología y Patología. Universidad Austral de Chile.

En bovinos las células de la placa del piso (pp) del tronco cerebral secretan un material que reacciona con anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas secretorias del órgano subcomisural (osc), una diferenciación del extremo cefálico de la placa del techo. En este trabajo, se estudio mediante inmunoblot los productos secretorios de la pp que reaccionan con estos anticuerpos (AFRU) y se comparó su patrón de inmunorreactividad con el presentado por la secreción del osc adulto y fetal. Se obtuvieron evidencias que en ambas estructuras esta presente un compuesto de alto peso molecular (540 kDa), que es reactivo al AFRU. Sin embargo RF-Gly I (450 kDa) como producto procesado, no ha sido detectado en la pp. En cambio se detecta un compuesto inmunoreactivo de 200 kDa. Esto sugiere que el procesamiento del precursor de 540 kDa es diferente en el osc y en la pp. Estudios de unión de lectinas están en marcha para clarificar este punto. El estudio ultraestructural de la pp sugiere una alta actividad secretoria para proteínas de exportación. A nivel de procesos basales y en los polos apicales, lugares en donde estas células estarían liberando su secreción, se observaron formaciones tubulares y vesículas secretorias que parecen originarse directamente del RER. Esta relación RER-gránulos secretorios y la ausencia del producto procesado de 450 kDa sugieren la posibilidad que el precursor de 540 kDa sea secretado. Otras evidencias obtenidas en el laboratorio apoyan esta posibilidad.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1000435.

34 - INTERACCION DE CELULAS NK HUMANAS CON SALMONELLA TYPHI. (Interaction of human NK cells with *Salmonella typhi*). Maldonado, C., Navarro, P., Contreras, I., Blanco, L.P., Miranda, D. & Puente, J. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Tanto bacterias como productos bacterianos pueden modular la funcionalidad de las células NK (CNK) humanas. En el presente trabajo se estudió la interacción de *S. typhi* Ty2 WT y de mutantes en el Ag O del LPS, sobre la activación de células NK purificadas. Las CNK se purificaron desde sangre periférica mediante métodos inmunomagnéticos. Las bacterias utilizadas fueron *S. typhi* (cepa silvestre), MEI028 (rugosa profunda) y MEI126 (rugosa parcial) fijadas en glutaraldehído. La etapa de activación se analizó por fosforilación de proteínas en tirosina de las CNK post-contacto bacteriano mediante "Western blot" en presencia y ausencia de inhibidores de proteína quinasas: genisteína, inhibidor de proteínas tirosina quinasas y bisindolil-maleimida I, inhibidor de proteína quinasas C. La citotoxicidad se determinó por la liberación de ⁵¹Cr utilizando células K-562 como células blanco y las citoquinas por ELISA. De acuerdo a nuestros resultados, las CNK responden frente a todas las bacterias analizadas con un masivo aumento de las proteínas fosforiladas, especialmente de MM entre 50 y 60 kDa, el cual es parcialmente inhibido por los dos inhibidores utilizados, inhibidores también de la citotoxicidad, pero sin cambios en la secreción de IFN-γ y TNF-α. Si bien los resultados de fosforilación de proteínas apoyan una interacción directa bacteria:célula NK, no es claro aún este efecto sobre la funcionalidad celular.

Proyecto Fondecyt 197-0226 y ENL-2000/16 DID-U.Chile.

35 - INHIBICION POR PENTOXIFILINA DEL SISTEMA T DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS AROMATICOS (Pentoxifylline inhibition of the aromatic amino acid transporter system T). Sandoval M., Ortega, M., Pincheira, M., Castro, M.A. Vera, J.C.¹ y Reyes, A.M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y ²Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. email: areyes@uach.cl

El sistema T de eritrocitos humanos muestra especificidad absoluta para el transporte de aminoácidos aromáticos (Rosenberg *et al. Biochim. Biophys. Acta* 598, 375-384, 1980). Sin embargo, sus propiedades cinéticas y regulatorias no se han estudiado en detalle porque no se conocen inhibidores específicos que permitan diferenciarlo funcionalmente de otros sistemas con la capacidad para transportar aminoácidos aromáticos.

Nosotros estudiamos el efecto de metilxantinas sobre el sistema T de eritrocitos humanos. Pentoxifilina y cafeína inhibieron la entrada de L-triptófano a las células, con valores de *K_i* aparentes de 0,3 y 30 mM respectivamente, mientras que teofilina no inhibió. En ensayos de intercambio en equilibrio y en condiciones cero-trans, pentoxifilina inhibió de forma no competitiva la entrada y salida de L-triptófano, sugiriendo que el sistema T une pentoxifilina en un sitio diferente al sitio de unión del sustrato. Pentoxifilina fue al menos 30 veces menos eficiente para inhibir la entrada de L-leucina a través del sistema L de transporte de aminoácidos. Así, nuestros datos indican que pentoxifilina puede ser utilizado como un inhibidor específico y eficiente del sistema T de transporte de aminoácidos aromáticos.

(Financiado por proyectos FONDECYT 1981018 y 1990333).

36 - LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA NO PERMITEN EL TRANSPORTE DE NICOTINAMIDA (Glucose transporters do not mediate nicotinamide transport). Bustamante, E., Ortega, M., Vera, J.C.¹ y Reyes, A.M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y ²Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción. Email: areyes@uach.cl

Sofue *et al. (Biochem. J.* 288: 669-674, 1992) describieron que, en vesículas reconstituidas y en eritrocitos humanos intactos, el transporte de D-glucosa es inhibido competitivamente por nicotinamida. Dado que nicotinamida es estructuralmente muy diferente a los monosacáridos, ellos sugieren que el transportador GLUT1 es probablemente multifuncional y juega un papel directo en el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos.

Nosotros estudiamos el transporte de nicotinamida en eritrocitos humanos intactos, en células HL-60, y en vesículas selladas de membranas de eritrocitos humanos, de orientación normal e invertida. En estos sistemas, el transporte de nicotinamida es saturable, con un *K_i* (entrada) cercano a 6 mM, y no es afectado por sustratos (D-glucosa, 2-desoxiglucosa, 3-O-metilglucosa) o inhibidores (citocalasina B, floretina, genisteína, miricetina) de GLUT1. Por otra parte, aunque nicotinamida desplazó de manera competitiva la citocalasina B unida a GLUT1 en membranas de eritrocitos humanos, fue incapaz de prevenir la inhibición producida por citocalasina B en ensayos de transporte de hexosas en células intactas.

Nuestros datos confirman que nicotinamida se une *in vitro* al transportador de glucosa GLUT1, pero no apoyan el concepto que GLUT1 mediaría el transporte facilitado de nicotinamida *in vivo*. (Financiado por proyectos FONDECYT 1981018 y 1990333).

37 - EFECTO NO GENOMICO DE ALDOSTERONA EN LA Na^+/K^+ -ATPASA DE TEJIDO VASCULAR. (non genomic effect of aldosterone on Na^+/K^+ -ATPase in vascular tissue). Hitschfeld, C.; Alzamora, R. y Marusic E. T.. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. (Patrocinio: A. Morello)

Es conocido que aldosterona tiene un efecto genómico en el transporte de sodio y potasio en tejidos epiteliales que involucra diversos canales iónicos y enzimas. De éstas la que presenta un rol regulatorio primordial en la homeostasis es la Na^+/K^+ -ATPasa. Recientemente se han descrito efectos rápidos de aldosterona sobre el calcio citosólico y el intercambiador Na^+/H^+ . El objetivo del presente trabajo fue investigar si la aldosterona ejercía efectos no genómicos sobre la Na^+/K^+ -ATPasa del tejido vascular. La actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa se midió por captación de $^{86}\text{Rb}^+/\text{K}^+$ sensible a ouabaina en anillos aórticos de rata.

Los resultados indican que aldosterona (10 nM) disminuye la actividad de la enzima con un efecto máximo a los 20 min, controles: 143.8 ± 5.4 aldosterona: 88.2 ± 2.8 nmol $\text{K}^+/\text{min/g}$ de tejido ($p < 0.001$, $n=20$); retornando la actividad ATPásica a los valores controles a los 120 min. El efecto inhibitorio fue bloqueado por espironolactona (10 μM), antagonista clásico del receptor mineralocorticoide. Actinomicina D (5 μM) y Cicloheximida (100 μM) no modificaron el efecto observado a los 20 min. Rapamicina (15 μM), un estabilizador del complejo ligando-receptor suprimió el efecto de aldosterona, lo mismo ocurre con Colchicina (100 μM), la que impide el transporte de vesículas en el citoesqueleto.

Estos resultados indican que aldosterona, en una primera etapa, inhibe actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en vasos sanguíneos a través de un mecanismo no genómico en el que estaría involucrado algún componente del receptor citosólico. Probablemente aldosterona induce la internalización de alguna isoforma de la enzima. (MED 007/2000 UANDES)

38 - Na^+/K^+ -ATPASA EN TEJIDO VASCULAR HUMANO: IDENTIFICACION DE LAS ISOFORMAS Y EFECTO DE ALDOSTERONA EN LA ACTIVIDAD (Na^+/K^+ -ATPase isoforms identification in vascular human tissue and regulation by aldosterone) Cabello, C.; Gonzalez, M.; Marusic E. T. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. (Patrocinio: J. Puente).

La Na^+/K^+ -ATPasa es una proteína integral de membrana constituida principalmente por la subunidad catalítica alfa (α) y la subunidad de anclaje beta (β), encontrándose en algunos tejidos una tercera subunidad denominada gamma (γ) cuya función no está clara. Se han identificado tres isoformas α y tres isoformas β , cuyo patrón de expresión es dependiente de especie, tejido y etapa de desarrollo del individuo.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue identificar las isoformas de la bomba de sodio existentes en arterias humanas adulta y fetal. Además se investigó el efecto de aldosterona en la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa.

Mediante TR-PCR se logró identificar la presencia de los mRNA específicos de las isoformas α_1 , α_2 , α_3 , β_1 y β_3 en arteria uterina. En arteria coriónica no se encontró α_3 . Las isoformas β_2 y γ están ausentes en ambos tejidos.

El efecto de aldosterona en la actividad de la bomba de Na se midió por captación de $^{86}\text{Rb}^+/\text{K}^+$ sensible a ouabaina. Los resultados muestran que aldosterona (10 nM) aumenta la actividad de la bomba de Na en $74.7 \pm 3.8\%$ ($n=13$, $P < 0.0001$) respecto al grupo control a las 18 hrs en explantes de anillos arteriales. Además, mediante Northern blot se observó que aldosterona afectó la expresión de α_1 .

Los resultados indican que la expresión de isoformas de Na^+/K^+ -ATPasa es dependiente de la etapa de desarrollo en el músculo liso vascular humano, y que el efecto de aldosterona sobre la bomba de Na es similar a lo descrito en tejidos epiteliales, en los cuales la acción de la hormona conlleva un aumento en la expresión de la isoforma α_1 .

FARMACOLOGIA

39 - PERFIL INFLAMATORIO EN MACROFAGOS EXPUUESTOS AL CADMIO BAJO CONDICIONES NO CITOTOXICAS. (Inflammatory pattern of exposed macrophages to cadmium on non-cytotoxic conditions.) Ramirez, DC. & Gimenez, MS. Laboratorio de Bioquímica Molecular-Proyecto 8104 - CONICET. Universidad Nacional de San Luis. 5700 - San Luis - Argentina. E-mail: dramirez@unsl.edu.ar/mgimenez@unsl.edu.ar.

Cadmio es un metal pesado que afecta la fisiología y metabolismo de los seres vivos mediante su capacidad para inducir estrés oxidativo. Su relación con el proceso inflamatorio, observado en pacientes crónicamente expuestos, y su significado biológico son escasamente conocidos. Se estudió el efecto de la exposición al cadmio (*in vitro*) bajo condiciones no citotóxicas (CNC, dosis $< 20 \mu\text{M}$ Cd^{+2} , durante 18 hs de cultivo) sobre el perfil inflamatorio de los macrófagos peritoneales residentes de ratón (MPR). Se observó una disminución en la captación de ácido araquidónico (AA) la cual es restaurada en células pre-incubadas durante 6 hs con glutatión reducido. La exposición al cadmio bajo CNC induce liberación de AA y la síntesis de las principales especies reactivas del oxígeno (ERO, anión superóxido y peróxido de hidrógeno). Además la exposición al cadmio produjo efectos diferenciales sobre estos parámetros inducidos por agonistas de la liberación de AA en MPR: a) antagoniza el efecto de lipopolisacárido bacteriano y b) sinergiza el efecto de ácido okadaico y zimosan opsonizado. Además, bajo CNC se demuestra la relación dosis-respuesta y el paralelismo entre el nivel de lipoperoxidación (TBARS), liberación de AA, inducción de la expresión de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa tipo -2 y síntesis de PGE₂. La exposición al cadmio bajo CNC incrementa la biodisponibilidad celular de AA mediados por cambios redox e induce un perfil inflamatorio en MPR.

40 - EFECTOS DE CADMIO SOBRE EL BALANCE REDOX EN MACROFAGOS. ESTUDIOS *IN VITRO* (Cadmium effects on redox balance in macrophages. *In vitro* studies). Ramirez, DC. & Gimenez, MS. Laboratorio de Bioquímica Molecular-Proyecto 8104 - CONICET. Universidad Nacional de San Luis. 5700 - San Luis - Argentina. E-mail: dramirez@unsl.edu.ar/mgimenez@unsl.edu.ar.

En el presente trabajo se evalúa el efecto de exposiciones al cadmio bajo condiciones no citotóxicas (CNC) y citotóxicas (CC) sobre el balance redox y sus principales consecuencias sobre los macrófagos peritoneales residentes (MPR) de ratón. Bajo CNC ($< 20 \mu\text{M}$ Cd^{+2} , 18 hs de incubación) se observó: a) un incremento ($P < 0.05$) dosis dependiente en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo); b) un incremento en el contenido de glutatión (GSH) y metalotioneínas (MT); c) la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, manganeso-superóxido dismutasa y selenio-glutatión peroxidasa incrementó mientras que el resto de las enzimas antioxidantes no fueron modificadas; d) incrementó el nivel de lipoperoxidación (TBARS); e) inducción del daño apoptótico dosis dependiente del DNA (TUNEL); f) no afectó el sistema de reparación del DNA (Ensayo cometa); g) inhibió la actividad ATPasa; h) incrementó la intensidad del estallido respiratorio inducido por zimosan opsonizado en MPR. Bajo CC cadmio inhibe el metabolismo oxidativo de los MPR, inhibe toda actividad de los sistemas de defensa antioxidante celular, depleciona GSH, incrementa MT, inhibe los mecanismos de reparación del DNA e incrementa la muerte celular por necrosis en los MPR. Los resultados sugieren que cadmio altera la homeostasis redox celular de forma diferencial según las condiciones de exposición, manifestado por daño en componentes de membrana y del material genético. Además, el proceso de apoptosis ocurre solo en exposiciones bajo CNC.

41 - CITOTOXICIDAD E INDUCCION DE APOPTOSIS POR TOXINAS EXTRACELULARES DE *CLOSTRIDIUM SEPTICUM* EN LINFOCITOS Y MACROFAGOS DE RATON. (Cytotoxicity and apoptosis induction for extracellular toxins of *Clostridium septicum* in mouse lymphocyte and macrophage) **Salinas, C.;** Gutierrez, M.; Ramírez, D.; Mattar, A.; Cortiñas, T y Stefanini de Guzmán A. Area Microbiología Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera 5700 San Luis, ARGENTINA. ticor@unsl.edu.ar

Clostridium septicum es agente causal de la gangrena no traumática que afecta tanto al hombre como a diversos animales, con un alto índice de mortalidad. Produce una exotoxina con actividad hemolítica, formadora de poro. Evidencias recientes demuestran que estas toxinas son capaces de producir alteraciones morfológicas y bioquímicas en células blancas consistentes con apoptosis. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto citotóxico en linfocitos y macrófagos de ratón y la presencia de mecanismo apoptótico en sobrenadantes de *C. septicum* ATCC 3606. Los sobrenadantes fueron obtenidos en sistema batch, en condiciones anaeróbicas, en fase logarítmica tardía. La viabilidad celular fue cuantificada mediante reducción del reactivo MTT. Se determinó apoptosis por electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % previa extracción de DNA. El efecto de la concentración se estudió empleando sobrenadantes concentrados y diluidos (1:1 hasta dilución 1:500). Los sobrenadantes de *C. septicum* resultaron cinco veces más tóxicos para macrófagos que para linfocitos. El nivel de apoptosis estuvo relacionada a la concentración del sobrenadante, que se evidenció por un incremento directamente proporcional a la concentración del mismo. Además los resultados obtenidos muestran un aumento sostenido de la apoptosis en función del tiempo.

42 - ESTUDIO DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE SOBRENADANTES DE *CLOSTRIDIUM CHAUVOEI*. (Study of proteolytic activity of *Clostridium chauvoei* supernatants) **Gutierrez, M.** Salinas, C. Mattar, M. Cortiñas, T y Stefanini de Guzmán A. Area Microbiología. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera San Luis 5700 ARGENTINA. maxgut@unsl.edu.ar

Clostridium chauvoei es el agente causal de la mancha enfermedad mortal que afecta al ganado bovino y ovino. Este microorganismo posee un mecanismo invasivo asistido por varias exotoxinas que además presentan una alta capacidad inmunoprotectora. Se ha informado que diversas proteasas pueden participar en la patogénesis de microorganismos que presentan un modelo invasivo. Con el objeto de determinar actividad proteolítica extracelular de *C. chauvoei* se realizaron estudios empleando sobrenadantes del cultivo de la cepa *C. chauvoei* ATCC 10092, obtenidos en sistema batch bajo condiciones anaeróbicas, en fase logarítmica tardía. La actividad caseinolítica fue determinada a diferentes pH y concentraciones de CaCl_2 , empleando azocaseína como sustrato. La máxima actividad enzimática (8.000 U l^{-1}) fue obtenida a pH 7.4, a una concentración de 8 mM de CaCl_2 . Se analizaron los perfiles de proteasas extracelulares en minigeles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, visualizando la actividad mediante zonas claras. Se identificaron cinco bandas en condiciones desnaturalizantes, en un rango de PM aparente de 200 a 70 kDa, siendo las de menor peso molecular la de mayor intensidad y en condiciones desnaturalizantes y reductoras (β -mercaptoetanol) conservaron su actividad las de mayor peso molecular. Este es el primer informe donde se determina la presencia de proteasas extracelulares en sobrenadantes de *C. chauvoei*.

43 - FLAVONOIDES Y EL SNC. ESTUDIOS DE MODE-LADO MOLECULAR Y ANALISIS QSAR. (Flavonoids and the CNS. Molecular modeling studies and QSAR analysis). **Marder, M.;^a Estiú, G.;^b Bruno Blanch, L.;^c Viola, H.;^d Wasowski, C.;^a Medina, J. H.;^d Paladini, A. C.^a** ^aInstituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina; ^bCEQUINOR-Departamento de Química y ^cQuímica Medicinal, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina; ^dInstituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Argentina.

Compuestos con diferentes estructuras, muchos de ellos del tipo benzodiazepínico, son activos en mamíferos en la modulación de la ansiedad, la sedación, la convulsión, la hipnosis y los estados amnésicos. Estos compuestos poseen alta afinidad por los sitios de unión de benzodiazepinas (su-BDZ) del complejo receptor GABA_A . Resultados obtenidos en nuestros laboratorios han señalado la existencia de un grupo de compuestos naturales y/o sintéticos, los flavonoides, con propiedades de ligandos para los su-BDZs. El modelo de farmacóforo/receptor del su-BDZs más aceptado (*Drug Des. Dev.* 1995, 12, 193) describe los requerimientos estructurales que debe poseer un ligando para interactuar con dicho receptor. En este trabajo presentamos un nuevo modelo de farmacóforo que define las características que debe poseer un ligando para unirse al sitio de las flavonas, relacionado con el su-BDZs. Este modelo se basa en estudios de superposición de 120 flavonoides, naturales o sintéticos, con el diazepam (una benzodiazepina clásica). Análisis QSAR de los parámetros que describen la interacción para las flavonas 6,3'-disustituídas (los ligandos más afines) señalan efectos estéricos asociados con la posición 6 junto con efectos electrónicos para la sustitución en 3'. Además, un grupo aceptor de hidrógeno en el sitio carbonílico de las flavonas parece ser un requerimiento necesario para la capacidad de unión.

44 - BASES BIOQUIMICAS DE LA DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD DE ESPECIES ACUATICAS A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS. (Biochemical basis of the different susceptibility of aquatic species to organophosphate and carbamate pesticides). **Anguiano, O.;** Ferrari, A.; Soleño, J.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. LIBIQUIMA. Universidad Nacional del Comahue. Neuquén. Argentina. Financiado por Universidad Nacional del Comahue-FONCYT. liang@uncoma.edu.ar

Si bien existen diferencias en la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de plaguicidas organofosforados y carbamatos entre las especies, estos factores no son los determinantes de la diferente susceptibilidad observada, postulándose que la misma estaría más vinculada con fenómenos farmacodinámicos a nivel de la enzima acetilcolinesterasa. Nosotros estudiamos la toxicidad de paratión, metil azinfos y carbaril en peces (*Carassius auratus*) y larvas de sapo (*Bufo arenarum* Hensel). Las CL_{50} 96 horas para ambas especies indican una respuesta similar para metil azinfos, mientras que las larvas de anfibios fueron 1.5 veces más susceptibles a paratión y evidenciaron una mayor tolerancia para carbaril (CL_{50} : 24.6 vs 13.8 mg/L). La asociación de estos plaguicidas con la acetilcolinesterasa de ambas especies reveló una mayor preferencia de los organofosforados por la enzima de cerebro de pez; lo cual es consistente con el menor tamaño postulado para el sitio estérico de la acetilcolinesterasa de anfibios que dificultaría el acceso del inhibidor al sitio activo. A su vez la enzima de *C. auratus* posee una recuperación más lenta en medios no contaminados para paratión y metilazinfos, sin que se logre una recuperación total en el término de 30 días. En cambio, la recuperación de la actividad enzimática en larvas de sapo es más rápida, lográndose en un plazo no mayor de 7 días una recuperación del 80-100%. La inhibición y recuperación de la acetilcolinesterasa por carbaril fue similar en ambas especies.

45 - CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPONENTES DIETARIOS DE ORIGEN VEGETAL (Antioxidant capacity of plant-derived dietary components) Actis-Goretta, L.; Lotito, S. B.; Renart, M. L. y Fraga C. G. Fisiocquímica, Facultad Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antioxidante (AA) de diferentes alimentos [mate (MT), té (TE), vino (VN) y chocolate (CH)] y evaluar la biodisponibilidad de catequinas. La AA se evaluó por: i) inhibición de la quimioluminiscencia del luminol (TRAP); ii) inhibición de la generación de malondialdehído (MDA) a partir de la oxidación de liposomas. El contenido de polifenoles se estimó por un método espectrofotométrico y los niveles de catequinas por HPLC con detección electroquímica. En el ensayo del TRAP una AA equivalente se logró con 42 ± 3 ; 210 ± 20 ; 745 ± 20 y 1820 ± 200 nI para MT, VN, CH y TE respectivamente. El 50% de inhibición de la oxidación de los liposomas se logró con 21 ± 5 nI de MT, 203 ± 15 nI de VN y con >1000 nI para CH y TE. El contenido de polifenoles y de catequinas correlacionó con esta AA. Cuando se administraron 80 g de CH a individuos, se encontró que 2h luego de la ingesta los niveles plasmáticos de (-)-epicatequina alcanzaban valores de 355 ± 49 nM. Este aumento se correlacionó ($p < 0,05$) con un incremento en la AA del plasma y una disminución de la formación de TBARS. Estos resultados indican que alimentos ricos en catequinas tienen AA tanto in vitro como in vivo. Trabajo financiado con subsidios de UBA (TB030) y CONICET (PIP 0738/98).

46 - EFECTO DE CATEQUINAS SOBRE LA OXIDACION DEL ADN MEDIADA POR UV-C (Effect of catechins on UV-C mediated DNA oxidation) Ottaviani, J. I.; Carrasquedo, F. y Fraga, C. G. Fisiocquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Un grupo de polifenoles, las catequinas, han despertado un notable interés científico por sus propiedades antioxidantes en sistemas biológicos. Este trabajo evaluó in vitro, los efectos de catequina (C), epicatequina (EC), y polímeros de EC en concentraciones de 0,1, 1 y 10 μ M, sobre la oxidación del ADN mediada por radiación UV-C. Las soluciones de ADN fueron expuestas a una lámpara germicida (~ 240 nm), en ausencia y presencia de las sustancias antioxidantes durante 15 y 30 min. La oxidación del ADN se evaluó por HPLC como la formación de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (oxo⁸dG). En ausencia de catequinas, los niveles de oxo⁸dG aumentaron desde 0.13 ± 0.03 a 0.59 ± 0.05 y 1.40 ± 0.89 fmol oxo⁸dG/pmol dG ($p < 0.05$) luego de 15 y 30 minutos de irradiación, respectivamente. La oxidación del ADN disminuyó significativamente luego de 30 min de irradiación en presencia de tetrámero y hexámero en concentraciones de 0,1, 1 y 10 μ M mientras que C, EC y dímero protegieron en concentraciones de 1 y 10 μ M. Otras sustancias antioxidantes evaluadas (α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión y trolox) ofrecieron una protección similar a los polifenoles ensayados. Las catequinas y sus oligómeros protegieron al ADN de la oxidación, sugiriendo un efecto antioxidante in vivo, que podría relacionarse con la prevención del cáncer. Subsidado por UBA (TB030), y CONICET (PIP 0738/98).

47 - ANEUGENESIS POR SALES DE CADMIO Y CROMO. (Aneuploidy by cadmium and chromium salts). Güerci, A., Seoane, A. y Dulout, F.N. CIGIBA. Fac. de Cs. Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Entre las alteraciones que puede sufrir el complemento cromosómico de una especie, la importancia de la aneuploidía se manifiesta en su relación etiológica con abortos espontáneos, malformaciones congénitas y procesos neoplásicos. Así, la identificación de agentes aneugénicos y la determinación de los mecanismos que conducen a este fenómeno revisten un interés particular.

En el presente estudio, se evaluó el efecto genotóxico de compuestos de cadmio y cromo. Se emplearon las técnicas de conteo cromosómico y análisis de micronúcleos cinetocoro-positivos (teñidos con anticuerpos anti-cinetocoro). Para ambos ensayos se utilizaron fibroblastos humanos de la línea MRC-5 que se cultivaron durante 2 ciclos celulares (60-62 hs.). Los tratamientos con soluciones de los compuestos a ensayar fueron realizados durante el primer ciclo celular para conteo cromosómico y durante el segundo ciclo para micronúcleos. Durante el análisis se observaron, respectivamente, la metafase y la interfase inmediata posterior al momento en que ocurrió el daño. Los agentes químicos estudiados aumentaron significativamente la frecuencia de metafases aneuploides (sólo las hipodiploides) y de micronúcleos cinetocoro-positivos y negativos.

Dado que uno de los posibles mecanismos de inducción de aneuploidía es la pérdida de cromosomas por fallas en la migración anafásica, y que cuando esto ocurre, es factible la formación de micronúcleos conteniendo cromosomas enteros (cinetocoro-positivos) los resultados aquí expuestos representarían una evidencia de que el mecanismo subyacente en la inducción de aneuploidía por metales pesados es frecuentemente la pérdida de cromosomas y no la distribución desigual de los mismos en anafase (no disyunción).

48 - EFECTO DEL HEXACLOROBENCENO SOBRE EL METABOLISMO PERIFÉRICO DE HORMONAS TIROIDEAS (Hexachlorobenzene effect on thyroid hormones peripheral metabolism). Alvarez, L.⁽¹⁾, Hernández, S.⁽¹⁾, Martínez R.⁽²⁾, Randi, A.⁽¹⁾, Kölliker-Frers R.⁽¹⁾, Obregón, M.J.⁽²⁾, Kleiman, D.⁽¹⁾, (1) Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; (2) Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental que produce disfunciones endocrinas. Previamente demostramos que el tratamiento crónico de ratas con HCB inducía hipotiroxinemia sin alteraciones en los niveles de T_3 . Las principales rutas de metabolismo de T_3 son la deiodinación periférica y la conjugación hepática con ácido glucurónico. Los tejidos que producen el mayor aporte de T_3 circulante son hígado, riñón, tiroides y el tejido adiposo marrón (TAM) en hipotiroxinemia. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del HCB (1g/100g/p.c. durante 4 semanas) en ratas Wistar machos sobre: a) el metabolismo periférico de T_4 y T_3 , b) la expresión de la proteína desacoplante (UCP-1) del TAM. Resultados: 1) La actividad de la 5' deiodasa (5'DI) no se modificó en hígado, disminuyó 53% en riñón ($C: 55.6 \pm 1.1$ pmol/min/mg prot, $p < 0.02$), y 50% en TAM (5'DII) ($C: 25.3 \pm 3.4$ pmol/min/mg prot; $p < 0.05$) y aumentó 14% ($C: 174.5 \pm 3.6$; $p < 0.05$) en tiroides por efecto del HCB. 2) la concentración tisular de T_3 disminuyó levemente en TAM y riñón sin modificaciones en hígado. La T_4 no se modificó en ninguno de los tejidos. El contenido de mRNA de UCP-1 y de noradrenalina no cambiaron. 3) la actividad de UDP-glucuronil transferasa (UDPGT) de T_4 aumentó 100% ($C: 5.5 \pm 0.6$ pmol/min/mg; $p < 0.05$) sin alterar la UDPGT de T_3 . Conclusión: la hipotiroxinemia inducida por HCB no se debía a un aumento en la actividad deiodinante del hígado, riñón o TAM sino al aumento de la actividad glucuronidante hepática. La T_3 sérica normal se debía en parte al aumento de peso del hígado y en menor medida al aumento de la actividad de 5'DI tiroidea.

49 - OXIDO NITRICO EN HIGADO SOBRECARGADO CON HIERRO: LIMITACIONES DE LA DETECCION POR EPR. (Nitric oxide in iron overloaded livers: limitations of EPR detection) *Aimó, L.; Galleano, M.; Borroni, M.V.; Svartz, A.; Guerschberg, L. y Puntarulo, S.* Físicoquímica-PRALIB (CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Se estudiaron los niveles de óxido nítrico (NO) en hígado de rata sometidas a sobrecarga de hierro (200 mg/kg) con y sin administración simultánea de LPS (lipopolisacárido de *E. coli*). NO fue detectado por EPR, utilizando dietilditiocarbamato como atrapador. El tratamiento con LPS durante 5 h incrementó los niveles de NO detectado con respecto a los valores controles (5.1 ± 0.6 UA y 0.5 ± 0.2 UA respectivamente) y la administración previa de L-NAME previno dicha respuesta (0.8 ± 0.4 UA). En animales tratados con LPS y simultáneamente con hierro dextrán (Fe) se observó un significativo incremento (122%) en los niveles de NO detectados en hígado con respecto al grupo tratado sólo LPS, que no fue reflejado por los niveles de NO_2^- y NO_3^- en plasma. La actividad de NOSintasa en homogeneizado de hígados controles y tratados con Fe (sin LPS) no mostró diferencias significativas (285 ± 40 y 283 ± 17 pmol/min/mg tejido, respectivamente), sugiriendo que la suplementación con Fe no modificó la actividad de la enzima. La incubación de hígados provenientes de animales controles y sobrecargados con Fe con una fuente generadora constante de NO (1mM SNAP) generó una velocidad de producción del complejo DETC-Fe-NO significativamente distinta. Estos resultados sugieren que los niveles de Fe endógeno afectan la cinética de detección de NO por EPR utilizando DETC como atrapador. Esta interferencia limita la utilidad de la metodología a situaciones en las cuales los niveles de hierro de las muestras permanecen constantes. Financiado por TWAS, ANPCyT y Universidad de Bs. As.

50- ALTERACIONES EN LA FOSFORILACION DE PROTEINAS DE TEJIDO ADIPOSO MARRON INDUCIDAS POR HEXACLOROBENCENO. (Hexachlorobenzene-induced changes in brown adipose tissue proteins phosphorylation). *Demarco, J.; Randi A.; Alvarez, L.; Kleiman D.* Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA. Patrocinante: Universidad de Buenos Aires.

El hexaclorobenceno (HCB) es un persistente contaminante ambiental lipofílico, que produce disfunciones endocrinas, porfiria y cáncer en animales de experimentación. Previamente demostramos sus efectos sobre la función y fosforilación de proteínas hepáticas, así como alteraciones en la lipogénesis en tejido adiposo marrón (TAM). Nuestro objetivo fue investigar efectos dependientes del tiempo (4, 7, 15 y 30 días) y de la dosis del HCB, administrado *in vivo* a ratas hembras Wistar, sobre la fosforilación de proteínas de sobrenadante de 8500xg de TAM, en presencia y ausencia de ortovanadato. Las fosfoproteínas se analizaron por SDS-PAGE y autoradiografía. Resultados: Se observó un efecto bifásico del HCB en la fosforilación de proteínas con aumento en las bandas de 53, 47 y 70 kD a los 7 días, disminuyendo hasta los 30 días. El ortovanadato estimuló la fosforilación de la banda de 47 kD. La curva de dosis (25, 50 y 100 g/100g p.c.) a 7 días, mostró aumento en la fosforilación de proteínas de 93 y 53 kD, y disminución de 43 kD, a la dosis máxima. En la curva de dosis (1, 10 y 100 mg/100g p.c.) en intoxicación aguda (1 día), disminuyó la fosforilación de 43 y 33 kD. Las alteraciones observadas por HCB, en la fosforilación de proteínas, en tratamientos agudos y crónicos, sugieren que proteínas quinasas y fosfatasa estarían involucradas en el mecanismo de acción del HCB en el TAM.

51 - LA INTOXICACION CRONICA CON CADMIO INDUCE LA EXPRESION DE TELOMERASA EN PROSTATAS DE RATAS (Chronic intoxication of Cadmium induce expression of telomerase in rat prostate). *Alvarez SM, Giménez MS.* Bioquímica Molecular. Universidad Nacional de San Luis. Chacabuco y Pedernera. 5700 - San Luis - Argentina. salvarez@unsl.edu.ar

La telomerasa es una enzima responsable de la extensión de repeticiones teloméricas por lo que es muy importante en la protección y replicación de los cromosomas. Es una transcriptasa reversa que en células somáticas normales tiene una baja o indetectable expresión pero que está aumentada en la mayoría de la células con procesos neoplásicos. Por otro lado, es conocida la citotoxicidad del Cadmio aunque no se sabe con certeza los mecanismos de la misma.

El objetivo de este trabajo fue verificar si la intoxicación con cadmio produce variaciones en la expresión de telomerasa en las próstatas de ratas.

Ratas macho de la cepa Wistar recién destetadas fueron separadas en dos grupos: Control (Co) y Cadmio (Cd). Las ratas Cd fueron sometidas a una intoxicación crónica con Cadmio bajo la forma de CdCl_2 en el agua de bebida durante 3 meses, a las Co se les administró agua sin Cadmio. Fueron sacrificadas por decapitación, se extrajo inmediatamente las próstatas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras fueron homogeneizadas y el extracto de proteínas obtenido fue sometido a la técnica de TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) para detectar la expresión de la enzima. Se observó una mayor expresión de la telomerasa en las muestras de próstatas sometidas a la intoxicación con Cadmio. El cadmio estimula la expresión de la telomerasa, lo que podría proporcionar un nuevo mecanismo para explicar la citotoxicidad de este elemento en la próstata de rata.

52 - EFECTO DE HEPTACLORO Y o,p' DDT SOBRE EL METABOLISMO DE FOSFOINOSITIDOS Y LA TRANSDUCCION DE SEÑALES EN PLAQUETAS Y PLACENTA HUMANA. (Heptachlor and o,p' DDT effects on phosphoinositides metabolism and signal transduction in human platelets and placenta). *Souza, M.S.¹ Moya G^{1,2}, Magnarelli G^{1,2} y D'Angelo A.M.¹* 1: LIBIQUIMA. Neuquén. 2: Carrera de Medicina. Cipolletti. U.N. Comahue, Argentina, e-mail: libiquima@uncoma.edu.ar. Subsidiado por U.N.Co y FONCYT.

Existen referencias de efectos deletéreos de plaguicidas en las funciones reproductivas y endocrinas en animales de experimentación y vida silvestre; sin embargo, la información sobre efectos en humanos es escasa. Dado la alta vulnerabilidad que caracteriza al desarrollo fetal, el objetivo de este trabajo es conocer efectos de plaguicidas organoclorados que interfieran con eventos de señalización relacionados con fosfoinosítidos. Para ello se utilizaron dos sistemas involucrados en la viabilidad y el desarrollo fetal: placenta a término y plaquetas.

En homogenato de placentas se observó un aumento significativo respecto al control en la incorporación de PIP_2 , PIP y PI para el tratamiento con concentraciones de 10^{-5} M de Heptacloro y o,p' DDT (95, 145 y 106 % ; 71, 117 y 92% respectivamente), resultados que sugieren efecto sobre el metabolismo de un precursor común.

La incubación de plaquetas con 10^{-5} M de Heptacloro resultó en un aumento significativo respecto al control del 35% en la incorporación basal de PIP_2 , sin afectar el de PIP y PI , probablemente por alteración del recambio del grupo fosfomonoéster. En cambio, la duplicación de la marca en PIP_2 después de la activación por Trombina, indicaría efecto sobre la actividad de $\text{PLC}_{\beta 2}$ y alteración de la reactividad plaquetaria.

53 - ASOCIACION DE PSD95 CON LA DENSIDAD POSTSINAPTICA (DPS) Y SU EFECTO SOBRE LAS CORRIENTES ACTIVADAS POR NMDA (Association of PSD95 with the PSD and its effect on NMDA gated currents). Sandoval, R., Soto, D., Orrego, F. y Wyneken, U. Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. (Patrocinio: Miranda, D.)

En la DPS glutamatérgica, la proteína de anclaje PSD95 interactúa con numerosas proteínas de las cascadas de transducción que generan la respuesta excitadora. El dominio PDZ2 de PSD95 interactúa, entre otros blancos, con el receptor tipo NMDA (RGLu_N). El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la PSD95 participa en los cambios plásticos en la DPS inducidos por actividad.

Encontramos que: • En DPS aisladas de ratas sometidas a estimulación sináptica intensa (convulsiones), la cantidad relativa de PSD95 disminuye a un $70,3 \pm 7,6\%$ ($n=4$, $p<0.01$). • La interacción de PDZ2 recombinante con la DPS es calcio dependiente. La unión es máxima a pCa9 mientras que disminuye a pCa 7, 5 y 3 a $86 \pm 12,2\%$, $49 \pm 28,8\%$ y $36 \pm 23,3\%$, respectivamente ($n=4$ para cada pCa). • En ensayos de overlay con I²⁵-PDZ2, las DPS fosforiladas muestran desaparición de marca en dos bandas (180 y 80kDa). • Al medir las corrientes iónicas mediadas por RGLu_N en DPSs aisladas, el bloqueo por magnesio del receptor disminuye significativamente en presencia 250 nM PDZ2 ($n=5$).

Estos resultados sugieren que PSD95, a través de su dominio PDZ2, afecta las propiedades electrofisiológicas de RGLu_N y que participa en la reorganización estructural de la DPS frente a estimulación sináptica. (Fundacion Volkswagen, Fondecyt 1980063)

54 - EFECTO DEL VINO TINTO SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE ACIDO LAURICO Y P-NITROFENOL. (Effect of red wine on the hepatic metabolism of lauric acid and p-nitrophenol). Varela, N., Orellana, M., Viviana Guajardo y Rodrigo R. ICBM, Programa de Farmacología, Fac de Medicina, U. de Chile.

Parte del efecto nocivo del etanol es debido a la inducción de ciertas especies de citocromo P450, particularmente al CYP 2E1, isoenzima que en su mecanismo de catálisis es capaz de producir anión superóxido, contribuyendo de esta forma a la generación de estrés oxidativo. Se postula que el vino tinto contiene gran cantidad de flavonoides, compuestos antioxidantes que disminuirían parte de este efecto nocivo del etanol. La isoenzima P450 2E1, además de participar en el metabolismo de numerosos xenobióticos como el p-nitrofenol, participa en el metabolismo de algunos endobióticos, como los ácidos grasos.

En este trabajo se determinó el efecto del consumo prolongado del etanol al 12%, vino tinto y vino tinto desalcoholizado en el metabolismo microsomal de ácido láurico y p-nitrofenol. En el hígado, el vino desalcoholizado disminuyó el contenido total de citocromo P450 y el metabolismo de ácido láurico. El metabolismo microsomal de p-nitrofenol se encontró aumentado en el grupo tratado con vino y con etanol. Se concluye que los antioxidantes presentes en el vino tinto, al disminuir el contenido total de citocromo P450 hepático reduciría parte del efecto nocivo del etanol. En cuanto al metabolismo microsomal de ácido láurico, ambos tejidos responden de diferente manera al tratamiento.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1990-784

55 - CONTRIBUCION DE ANTIOXIDANTES INDIVIDUALES A LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA HUMANO (Contribution of individual antioxidants to the antioxidant capacity of human plasma.) Pérez, D.D., Strobel, P., Guasch, V., Marshall, G., San Martín, A., Leighton, F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas y *Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

En el plasma existen numerosos antioxidantes, sólo algunos bien caracterizados. Su concentración depende de la dieta y/o su producción endógena. Para evaluar la importancia relativa de los que podemos detectar, se estudió voluntarios con dieta occidental (rica en grasas y pobre en frutas y verduras) o dieta mediterránea, con y sin consumo moderado de vino tinto y se midió, en 168 muestras, la capacidad antioxidante total del plasma (CATP) y la concentración de antioxidantes individuales. Se midió CATP como TRAP (capacidad total) y como TAR (reactividad) por apagamiento de quimioluminiscencia inducida por radicales libres. La contribución relativa de antioxidantes individuales fue estimada por tres métodos: factores empírico de equivalencia, correlación lineal (Pearson), y regresión lineal múltiple paso a paso. Se observó que la CATP está dada principalmente por ácido úrico (TRAP) y por ácido ascórbico y ácido úrico (TAR). Los polifenoles antioxidantes con mayor contribución fueron ácidos cafeico y protocatequico, rutina y quercetina. Las mediciones ponen en evidencia que la CATP es el resultado de la presencia de numerosos antioxidantes cuya contribución relativa es variable, dependiente de la dieta y el consumo de vino tinto. (PUC PBMEC 98)

56 - BIODISPONIBILIDAD DE POLIFENOLES DEL VINO EN HUMANOS. (Bioavailability of wine polyphenols in humans.) Mansilla, S., Díez, M., Pérez, D.D., Vázquez, L., Leighton, F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Los polifenoles antioxidantes del vino contribuyen a la reducción del riesgo de enfermedad coronaria en bebedores moderados, pero su biodisponibilidad y metabolismo están poco caracterizados. En este trabajo, se hicieron estudios de biodisponibilidad de polifenoles midiéndolos en plasma y orina en ocho voluntarios. Por cuatro días consumieron una dieta pobre en polifenoles, y al quinto día recibieron 375ml de vino tinto (Cabernet Sauvignon (CS) (1934 mg/L polifenoles)), o vino blanco (Chardonnay (Ch) (309.9 mg/L polifenoles)) o agua (control). Se midió la capacidad antioxidante total del plasma con los métodos TRAP y TAR y se correlacionó con polifenoles totales ($r=0.513$, $p=0.018$). Polifenoles individuales se midieron por HPLC con detector DAD-EC. En orinas se midió polifenoles totales.

Ambos vinos producen en plasma un aumento de TRAP ($5.9 \pm 2.5\%$ Ch, $8.8 \pm 8.6\%$ CS) y TAR ($17.8 \pm 11.8\%$ Ch, $12.3 \pm 14.4\%$ CS) una hora después de la ingesta. También aumentaron los polifenoles en el mismo periodo (4.0 ± 0.8 mg/L Ch, 10.5 ± 1.8 mg/L CS). Se detectó además aumento de catequina, metilcatequina y metilepicatequina. En orina, los polifenoles aumentaron a las 6-13 h post ingesta con CS en 0.69 ± 0.057 mg polifenoles/mg creatinina. Los resultados muestran que el vino induce aumento de la capacidad antioxidante del plasma, el que correlaciona con polifenoles plasmáticos, y en particular con catequina. (PUC-PBMEC2000)

57 - DISTRIBUCION DE CALICREINA GLANDULAR E INTERACCION CON PROLACTINA EN EL PEZ *CYPRINUS CARPIO*. (Distribution of glandular kallikrein and interaction with prolactin in the fish *Cyprinus carpio*). Figueroa, J., Fernández, K., y Kausel, G. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral, de Chile, Valdivia. (E-mail: jfigueroa@uach.cl)

Calicreina glandular (CG) es una serina-proteasa caracterizada por generar péptidos bioactivos desde precursores inactivos. En mamíferos, CG es inducida por estrógenos y está involucrada en el procesamiento de Prolactina (PRL). Sin embargo, el conocimiento acerca de CG en organismos no mamíferos es escaso. Por ello, se estudió esta proteasa mediante inmunocitoquímica (ICQ) y Western-blot y su inter-relación con PRL en carpa.

Western-blot con un anticuerpo anti-CG heterólogo, mostró CG en músculo (39kDa), riñón (52Kda), branquias (52kDa) y pituitaria (72 y 46kDa). La ICQ, detectó en músculo fuerte inmunotinción entre las células musculares, en riñón se inmunotizó la región apical de los túbulos colectores y ductos mesonéfricos y en branquias se inmunodetectaron algunas células epiteliales. En pituitaria, se evidenciaron células de la *rostral pars distalis* (RPD), que en cortes paralelos, mostraron correlación con las células lactotropas (PRL). Inmunoprecipitación con anti-PRL a partir de suero, seguida de Western-blot, mostró dos bandas de PRL (23 y 20kDa) que corresponderían a la forma intacta y uno de los productos de procesamiento de PRL.

Por otra parte, detectamos estimulación por 17 β -Estradiol tanto de PRL como de CG, especialmente en riñón. Por tanto, concluimos que se observó una correlación en las células lactotropas y CG, probablemente con coexpresión de ambas proteínas y que la distribución de CG en otros órganos como riñón y branquias implicaría un rol osmorregulatorio.

Fondecyt 1990710

TRANSDUCCION DE SEÑALES

58 - REDUCCION DE LA DESENSIBILIZACION DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA POR SUPRESION DE GRK 2 INDUCIDA POR SECUENCIAS ANTISENtido. (Reduction in H2 receptor desensitization following antisense-induced suppression of GRK 2). Fernández, N.^{1*}, Monczor, F.¹, Lemos, B.¹, Baldi, A.², Davio C.¹ y Shayo, C.^{2*}. IByME, CONICET²; Lab. de Radioisótopos, FFyB, UBA¹. FCEyN UBA².

Demostremos previamente que la línea celular U937 expresa receptores a histamina H2 induciendo una importante respuesta de AMPc. Sin embargo, debido a su rápida desensibilización, dependiente de GRKs, las células U937 resultan incapaces de diferenciarse. Por otro lado, describimos en células COS-7, una correlación entre la desensibilización y la fosforilación del receptor mediada por GRK 2 y GRK 3. El objetivo de este trabajo fue determinar en células U937, el efecto de la reducción de la expresión de GRK 2 sobre la desensibilización del receptor H2. Para ello, transfectamos por electroporación células U937 con ADNc antisentido correspondiente a GRK 2. Las células establemente transfectadas fueron seleccionadas por inclusión de genética en el medio de cultivo, obteniéndose clones estables. El clon D5 demostró una significativa reducción en la expresión de GRK 2. Por acción del agonista, la producción de AMPc fue mayor en un 60% en células que expresan el antisentido. La cinética de desensibilización del receptor indicó un t1/2 de 11.7 $\pm$ 2.2 min y 66.9 $\pm$ 12.8 min para U937 y D5, respectivamente. Estos datos, demuestran una correlación directa entre la expresión de GRK 2 y la desensibilización del receptor H2 en células U937, sugiriendo que GRK 2 cumple un papel fundamental en la regulación de dichos receptores.

59 - ASOCIACION DEL RECEPTOR AT₂ DE ANGIOTENSINA II CON LA FOSFATASA SHP-1. (Association of the AT₂ angiotensin II receptor with SHP-1 phosphatase). Alvarez¹, S.E., Nahmias², C., Ciuffo¹, G. M. ¹Cátedra de Bioquímica Avanzada. Universidad Nacional de San Luis. Ejército de los Andes 950. San Luis (5700). Argentina. ²Institut Cochin de Génétique Moléculaire, CNRS UPH 0415, 22, rue Méchain, 75014 Paris. e-mail: gciuffo@unsl.edu.ar.

Tyrosine phosphorylation, controlled by both, protein tyrosine phosphatases (PTPs) and kinases (PTKs), is a critical mechanism for physiological processes like growth and differentiation. Many of the intracellular signals mediated by the angiotensin II (Ang II) type 2 receptor (AT₂) involved the activation of PTPs. AT₂ receptors mediate tyrosine dephosphorylation of a number of proteins, suggesting its coupling to PTPs.

Both AT₁ and AT₂ Ang II subtypes are present in rat fetal membranes (E20). Previous studies of immunoprecipitation on this preparation with anti-SHP-1 antibody showed that Ang II (10⁻⁶M) mediates a rapid and transient tyrosine phosphorylation of the phosphatase SHP-1, a negative growth regulator. SHP-1 phosphorylation is blocked by the AT₂ antagonist, PD123319. Thus, the effect is mediated by AT₂ receptors.

We performed binding of [¹²⁵I]Ang II (10⁻⁸ M) to membranes solubilized with CHAPS (1.2%) before immunoprecipitation with anti SHP-1 antibody, in order to investigate the association of AT₂ receptors and SHP-1. Binding was fully displaced by Ang II (10⁻⁶ M) or PD123319 (10⁻⁶ M), indicating that only AT₂ receptors were present on the immunocomplexes. These data strongly supports an association of AT₂ to SHP-1 and thus a physiological role.

60 - ROL DE LOS RECEPTORES AT₂ DE ANGIOTENSINA II EN EL DESARROLLO DEL RIÑÓN. (Role of AT₂ Angiotensin II receptors on kidney development) Sánchez¹, S.I., Fuentes¹, L.B., Seltzer², A.M., Ciuffo¹, G.M. ¹Bioquímica Avanzada. Área de Biología Molecular. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. ²Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Ambos subtipos de receptores de Angiotensina II (Ang II), AT₁ y AT₂, se expresan en edad temprana en el feto. Sin embargo, receptores del subtipo AT₂ presentan un patrón especial, con niveles altos de expresión en feto y pronta desaparición después del nacimiento, sugiriendo un rol de los mismos en la organogénesis. Los receptores del subtipo AT₂ inducen la defosforilación de proteínas en residuos tirosina, mediada por SHP-1. Con el fin de caracterizar el papel de éstos receptores durante la organogénesis, desarrollamos un modelo de tratamiento de ratas preñadas durante la última semana de gestación con diferentes agonistas y antagonistas de receptores de Ang II. Estudios de autoradiografía permitieron identificar la localización de receptores en cortes de riñón de ratas recién nacidas y de ocho días provenientes de madres tratadas. Es de destacar que el tratamiento de la madre con el antagonista AT₂, PD123319 previene la expresión de receptores del subtipo AT₁ y la progresión de los glomerulos a estadios III y IV en la región juxtamedular. Estos estudios indican que las sustancias atraviesan la barrera placentaria y sugieren un papel importante de los receptores del subtipo AT₂ en el desarrollo ontogénico del riñón.

61 - UN SEGUNDO GEN PARA LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA PKA SE EXPRESA NORMALMENTE EN CANDIDA ALBICANS. (A second gene for the PKA catalytic subunit is normally expressed in *Candida albicans*). Castilla¹, R., Zelada, A., Passeron, S., Giasson, L. y Cantore M. L., Facultad de Agronomía, Cátedra de Microbiología, IBYF (CONICET), Universidad Laval, Quebec, Canadá. Subencionado por: UBA, CONICET, ANPCyT, Fundación Antorchas.

Hemos demostrado con anterioridad que la presencia de la PKA activa es esencial en el proceso de diferenciación del hongo *C. albicans*. Una cepa mutante obtenida por knock out del gen TPK2 (codifica para la subunidad catalítica de la PKA) es viable y presenta una germinación que aunque disminuida es estimulada por AMPc, dbAMPc, glucagon y hCG y es bloqueada por inhibidores de la PKA (PKI y H89); estos resultados indican que una actividad de PKA sigue jugando un rol decisivo en el proceso de diferenciación del hongo. El proyecto genoma de *C. albicans* reveló un gen para otra putativa isoforma de PKA designada TPK1. La expresión de esta isoforma en la mutante tpk2 podría explicar los resultados indicados mas arriba. Se investigó entonces la existencia de esta segunda actividad PKA y la expresión del gen TPK1 en ambas cepas, salvaje y mutante. Se encontró que la actividad de la Tpk1, en la cepa mutante, presenta el 8% de la actividad total medida en la salvaje tanto en extractos crudos de células levaduriformes como en los eluidos de columnas de DEAE. Se investigó por RT-PCR la expresión de este segundo gen. Se encontró que en la cepa salvaje se expresan ambos ARNm mientras que en la mutante solo el esperado para TPK1. Estos resultados confirman el rol crucial de la PKA en la diferenciación de *C. albicans* y la existencia de al menos dos genes diferentes para la subunidad catalítica de la PKA. Estos resultados parecen indicar que ambos están involucrados en los eventos bioquímicos relacionados con la diferenciación de *C. albicans*.

62 - INTERACCION IN VIVO E IN VITRO ENTRE PKA Y PROTEINAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE (in vivo and in vitro interaction between PKA and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.) Portela P., Moreno S., Rossi S. Departamento de Química Biológica. FCEyN. Ciudad Universitaria, 4° piso. pportela@qb.fcen.uba.ar

PKA contiene dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La fosforilación de sustratos es controlada, en parte, por la localización de quinasas en compartimientos subcelulares. Nuestro objetivo es estudiar el mecanismo de PKA in vivo, en particular encontrar proteínas de anclaje para PKA en *Saccharomyces cerevisiae*. Las R (I y II) de eucariotas superiores interaccionan con proteínas AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins) algunas de las cuales son sustratos de PKA. Las RII contienen en el amino-terminal una estructura lámina-β-α-hélice-α-hélice responsable de la interacción con AKAPs. En *S. cerevisiae* la región amino-terminal de la R (Bcy1p) es suficiente para su localización y no posee homología de secuencia con RI o RII. Aún no se describieron AKAPs para eucariotas inferiores. Se realizó una predicción de estructura secundaria del amino-terminal de Bcy1p (aminoácidos 1-50) que reveló una estructura con dos α-hélice similar a la que posee RII. Para encontrar proteínas de anclaje en *S. cerevisiae* se realizaron dos abordajes experimentales:

A) Identificación de proteínas que interaccionan in vivo con Bcy1p utilizando co-inmunoprecipitación.

B) Cromatografía de afinidad Bcy1p-cAMP-agarosa de extracto crudo de levaduras (pull-down).

Se identificaron 18 proteínas (3 coinciden por ambos métodos) que interaccionaron con Bcy1p y fueron sustratos de PKA. La identificación de AKAPs permitiría estudiar la relación entre la localización subcelular y selección de sustratos.

63 - TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE PTH EN ENTEROCITOS DE RATA: EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO. (PTH signal transduction in rat enterocytes: Effects of aging). Gentili C., Morelli, S., Boland R y Russo de Boland A. Dto. De Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la hormona paratiroidea (PTH) estimula el influjo de calcio en enterocitos de rata mediante la activación de las vías mensajeras adenilil ciclasa/cAMP/PKA y PLC/IP₃/DAG/PKC y que estos mecanismos dependientes de la hormona están alterados con el envejecimiento celular. En este trabajo examinamos el efecto de PTH en la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en enterocitos de rata jóvenes (3 meses) y seniles (24 meses). En los animales jóvenes, la hormona induce un rápido incremento en la fosforilación de MAPKs (ERK1 y ERK2), siendo máximo al minuto de tratamiento (300%), mientras que en enterocitos de ratas seniles es significativamente menor (60%). La respuesta es dependiente de la dosis (10^{-11} - 10^{-7} M) con máxima estimulación a 10^{-9} - 10^{-8} M. Tanto en animales seniles como en jóvenes la fosforilación de MAPK inducida por PTH no fue afectada por los inhibidores de PKC, calphostin (100nM), bisindoleylmaleimida (30nM) y Ro 31820 (200nM). El tratamiento con ésteres de forbol sólo o en simultáneo con PTH no modificó la fosforilación dependiente de la hormona. Similarmente a PTH, el agonista de adenilil ciclasa, forskolina (5-15µM) y de PKA, SpcAMP (50-100µM), estimulan la fosforilación de MAPK, mientras que los inhibidores de adenilil ciclasa y PKA, SQ 22536 (0.5 mM) y Rp-cAMP (0.2 mM), suprimen los efectos de la hormona. El inhibidor específico de la tirosina quinasa citosólica c-Src, PPI (10-20µM), y el inhibidor de PI3K, Wortmannina (100nM), suprimieron en un 60% y 90 %, respectivamente, la fosforilación de MAPK inducida por PTH. Estos resultados sugieren que PTH activa la vía MAPK en enterocitos a través de un mecanismo independiente de PKC, que involucra a c-Src, PKA y PI3K y que este mecanismo está afectado por el envejecimiento celular.

64 - SEÑALIZACION DEL 1,25(OH)₂-VITAMINA D₃ DE LA MEMBRANA AL NUCLEO: ROL DE c-Src EN CELULAS MUSCULARES (1,25(OH)₂-Vitamin D₃ signalling from the membrane to the nucleus: Role of c-Src in muscle cells). Buitrago C. and Russo de Boland A., Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. San Juan 670, Bahía Blanca 8000, Argentina.-

Recientemente hemos demostrado que, en células de músculo esquelético, la forma hormonalmente activa de la vitamina D₃, el 1,25 (OH)₂-vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃], estimula la actividad enzimática de la tirosina quinasa no-receptora c-Src. En este trabajo obtuvimos evidencia demostrando que la quelación del calcio intracelular con BAPTA bloquea la activación de c-Src inducida por la hormona, indicando que el Ca²⁺ es un activador "upstream" de c-Src. La estimulación de c-Src por el 1,25(OH)₂D₃ desencadena la fosforilación en tirosina y activación de la proteína quinasa de acción mitogénica (MAP quinasa, 42/44 kDa). Más aún, en células transfectadas con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el RNAm de c-Src, la fosforilación de MAP quinasa inducida por la hormona disminuyó en un 90%. MAP quinasa es luego trasladada al núcleo celular en su forma fosforilada activa e induce la expresión de la oncoproteína c-myc, ya que PD 98059, un inhibidor específico de MAPKquinasa (MEK), suprime la estimulación de la síntesis de la proteína c-myc inducida por el 1,25(OH)₂D₃. La hormona, además induce rápidamente la fosforilación en tirosina de c-myc. En células pretratadas con PPI, un inhibidor específico de c-Src, la fosforilación en tirosina de c-myc se suprime totalmente.

Estos resultados demuestran que la hormona esteroidea 1,25(OH)₂D₃ estimula vías de señalización asociadas a la proliferación en células musculares e implica que la tirosina quinasa c-Src desempeña un rol central en este proceso.

65 - REGULACION DE LA PROTEINA QUE UNE GH (GHBP) ASOCIADA A MEMBRANAS Y EL RECEPTOR DE GH (GHR) POR HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) Y ESTRADIOL. (Growth hormone and estradiol regulation of membrane-associated GHBP and GHR). González, L., Sotelo, A.I., Turyn, D. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

El receptor de GH (GHR) y la proteína que une GH (GHBP) se originan por procesamiento alternativo del mismo ARNm. Los estudios de la regulación de GHR y de GHBP se realizaron usando métodos de unión específica de hormonas marcadas. En el presente estudio se utilizaron ratones transgénicos que sobreexpresan al factor liberador de GH y producen altos niveles de hormona de crecimiento (GH) homóloga para examinar su influencia sobre los niveles de GHR y de GHBP asociada a membranas (MA-GHBP), medidas por radioinmunoensayos específicos. Se observó que la unión específica somatogénica es 10 veces superior que la de los respectivos controles normales y se corresponde con el aumento de 9 veces de los niveles de MA-GHBP, mientras que el GHR sólo aumenta 3 veces en iguales condiciones.

El peso molecular aparente de la MA-GHBP, de 42 y 37 kDa, es menor al de la GHBP sérica, de 49 y 43 kDa, probablemente debido a distinto grado de glicosilación.

También se estudió el efecto *in vivo* del estradiol en la regulación de GHR y MA-GHBP, observándose una inesperada disminución de los niveles de GHR y MA-GHBP en los ratones transgénicos.

66 - EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) SOBRE LA REGULACION DEL RECEPTOR DE GH Y LA PROTEINA QUE UNE GH ASOCIADA A LA MEMBRANA. (Growth hormone (GH) regulation of GH receptor and membrane associated - GH binding protein). Curto, L., González, L., Sotelo, A., Turyn, D. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB), UBA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, E-mail: dturyn@qb.ffyba.uba.ar

La regulación del receptor de la hormona de crecimiento (GHR) se estudió usando métodos de unión específica de GH marcada. Recientemente se demostró que gran parte de esa unión específica se debe a la proteína que une GH asociada a membranas (MA-GHBP). En este estudio se utilizan modelos de ratones que no expresan a la GH o que la sobreexpresan en diferentes concentraciones, para evaluar el efecto de esta hormona sobre la concentración de GHR y de MA-GHBP, determinadas por radioinmuno-ensayos específicos.

En ausencia de GH, ambas proteínas se expresan en valores apenas inferiores a los obtenidos para ratones normales. Para aumentos moderados de GH, el receptor y la GHBP aumentan de manera similar. Pero a concentraciones elevadas de GH, el aumento de la concentración de MA-GHBP es notablemente superior al de GHR. Se concluye que al inducir un mayor aumento de la MA-GHBP que de GHR, la GH produciría una regulación negativa (*down-regulation*) de su actividad, dado que se inhibiría la formación del complejo ternario entre dos moléculas de receptor y una de hormona ((GHR)₂-GH), necesario para producir la acción biológica.

67 - COMPARTIMENTALIZACION DE EVENTOS DE FOSFO-DEFOSFORILACION EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES A TRAVES DE SER/TRE KINASAS. (Compartmentalization of phospho-dephosphorylation events in signal transduction mediated by Ser/Tre kinases). Poderoso C., Gorostizaga A., Cornejo Maciel F., Paz C., Podesta E.J. Dpto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

En los sistemas esteroideogénicos están bien demostradas la participación obligatoria de Ser/Tre quinases y la compartimentalización de la producción de cAMP necesarias para el estímulo hormonal. Recientemente, describimos que en estos sistemas es indispensable la participación de Tirosina fosfatasas activadas hormonalmente vía PKA. El estudio de la participación de Ser/Tre fosfatasas (PPs) demostró que también la actividad de estas enzimas representa un paso obligatorio para la regulación de la esteroideogénesis. Caliculina A (CA), un inhibidor permeable de PPs, disminuye de manera dosis dependiente (1-100 nM) la estimulación por hCG y 8Br-cAMP sobre la producción de testosterona (T) por células de Leydig (ng T/10⁶ células: control 4.7±0.2, hCG 16.1±1.5, 8Br-cAMP 19.4±1.5, 100 nM CA 4.0±0.2, CA+hCG 4.6±0.5, CA+8Br-cAMP 4.5±0.8), no observándose efecto al utilizar un derivado del colesterol cuyo transporte no está regulado hormonalmente. El efecto inhibitorio se observa también usando cantaridina (otro inhibidor de PPs). La inhibición de PPs produce una inhibición similar de la esteroideogénesis en células de zona fasciculada de glándula adrenal estimuladas por ACTH. Dado que quinases y fosfatasas no tienen alta especificidad por sus sustratos, que conjuntamente deben activarse proteínas intermedias obligatorias en la acción hormonal por fosfo y defosforilación y que PKA regula ambos procesos, se sugiere que la acción de PKA se ejerce sobre sustratos en compartimentos separados como una forma de regular la cascada de eventos estimulada hormonalmente.

68 - REGULACION DE PROTEINQUINASA C (PKC) POR ACIDO FOSFATIDICO FOSFOHIDROLASA (PAP), EN MIELINA PERIFERICA DE RATAS CONTROLES Y DIABETICAS. (PKC regulation by phosphatidic acid phosphohydrolase in peripheral myelin from control and diabetic rats). Goedelman C., Pasquini J.M., Soto E. y Setton-Avruj C.P. Depto Química Biológica, F.F. y B., IQUIFIB-UBA CONICET.

La mielina de nervio periférico facilita la conducción saltatoria, regula niveles de neurotransmisores y ayuda al mantenimiento de canales iónicos neuronales. Posee una maquinaria involucrada en la transducción de señales biológicas que participarían en el funcionamiento normal del nervio (Eichberg y col, Neurochem. Res. 21(4)527, 1996). La enzima PAP al convertir ácid. fosfatídico (PA) en diacilglicerol (DG) regularía la actividad de la PKC. Esta enzima está ampliamente involucrada en la fosforilación de las proteínas mayoritarias de mielina periférica P₀ y MBP.

Nos proponemos estudiar la actividad de PAP, su regulación por esfingosina (sph) y la expresión de PKC en mielina periférica de ratas controles y diabéticas. Se determinó la actividad de PAP midiendo la transformación de ¹⁴C-PA en ¹⁴C-DG por TLC y radioautografía. La presencia de las distintas isoformas de PKC se realizó por Western blot utilizando anticuerpos específicos para sus isoformas.

La sph produce un efecto dual sobre la actividad de PAP, en ratas controles y diabéticas, inhibiendo su actividad entre 10-30 µM y estimulándola entre 40-60 µM.

Se detectó la presencia de PKCα, βI, βII, PKCδ y PKCε. En mielina de ratas diabéticas se encuentran niveles aumentados de PKCα y ε, y disminuidos de PKCβI y PKCβII.

Estos resultados demostrarían por primera vez la presencia de PKC y PAP en mielina periférica, y la estrecha regulación que la sph ejerce sobre las distintas isoformas de PKC y por su intermedio en la fosforilación de P₀ y MBP.

69 - METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE INSULINA EN HIGADO Y MUSCULO DE RATONES ENANOS DE LA CEPA AMES (Glucose metabolism and insulin signal transduction in Ames dwarf mice). Arostegui Díaz G., Dominici F., y Turyn D., IQUIFIB (UBA-CONICET), Capital, Argentina.

En el presente estudio, se investigaron los mecanismos por los que el defecto de GH origina hipersensibilidad a la insulina. Se utilizaron como modelo ratones enanos de la cepa Ames (*df/df*), que carecen de GH y PRL. Estos animales presentan hipoglucemia, hipoinsulinemia e hipersensibilidad a la insulina (demostrada mediante un test de tolerancia a la insulina), concomitante con intolerancia a la glucosa, posiblemente debido a una menor síntesis o liberación de insulina. Se analizó la fosforilación en residuos de tirosina inducida por insulina *in vivo* del receptor de insulina (IR) y de sus principales sustratos (IRS-1 e IRS-2), la asociación de los IRSs con la subunidad reguladora de la enzima fosfatidilinositol 3' quinasa (p85) junto con la abundancia de IR, IRS-1, IRS-2 y p85 en el hígado de los ratones *df/df*. Se halló inalterada la cantidad y la fosforilación del IR, mientras que se detectaron aumentos del 74% y 88% en la cantidad y en la fosforilación del IRS-1 y del 86% y 33% en la cantidad y en la fosforilación del IRS-2. Se detectó un aumento similar en la cantidad de p85 asociada al IRS-1 y al IRS-2 en respuesta a insulina. Estas alteraciones podrían explicar la hipersensibilidad a la insulina que presentan los ratones *df/df*.

70 - LAS VIAS DE FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASA Y RAS/MAPK SON NECESARIAS PARA LA INHIBICION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA 5-AMINOLEVULINATO SINTETASA (ALAS) POR INSULINA (Phosphatidylinositol-3-kinase and Ras/MAPK pathways are required for insulin inhibition of 5-aminolevulinate synthase transcription). Scassa M.E., Guberman A.S. y Cánepa, E.T. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina.

La transducción de señales mediada por insulina implica una compleja red de proteínas que incluyen aquellas intermediarias de las vías de Ras/MAPK y PI3K. Sin embargo, aún no han sido completamente determinados los caminos activados por la hormona para regular la expresión de determinados genes. La insulina inhibe la expresión de la 5-aminolevulinato sintetasa, primera enzima y reguladora de la biosíntesis del hemo, a nivel transcripcional. Nuestro objetivo es caracterizar el mecanismo por el cual se transduce la señal de la insulina conduciendo a la represión de la expresión de ALAS, mediante experimentos de transfección con mutantes de ciertos efectores de las cascadas de PI3K y Ras/MAPK. Empleando un plásmido que contiene la región -833/+42 del promotor de ALA-S, dirigiendo la expresión del gen reportero CAT, ensayamos la actividad transcripcional del mismo mediante transfecciones transientes en células HepG2. Este fragmento de 870 pb fue capaz de conferir respuesta a la hormona. Cotransfecciones con mutantes dominantes negativos intervinientes en las vías de Ras/MAPK como SOS, Ras, Raf, MEK y MAPK bloquearon la inhibición por insulina, mientras que mutantes constitutivamente activos de Ras y MEK mimetizaron el efecto de la hormona independientemente de la activación del receptor. Por otro lado, mutantes que expresan PI3K y PKB sin actividad quinasa disminuyeron significativamente el efecto inhibitorio de la insulina sobre la actividad transcripcional del promotor de ALAS. Finalmente, demostramos que la activación de una de las vías no es suficiente para transducir la señal de insulina si la otra se encuentra bloqueada. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la transcripción de la ALAS mediada por insulina requiere la activación de las vías de Ras/MAPK y de PI3K.

Trabajo subsidiado por UBA, CONICET y ANPCYT, Argentina.

71 - EXPRESION DE RECEPTORES H₁ Y H₂ A HISTAMINA EN RATONES KNOCKOUT PARA HISTIDINA DECARBOXILASA. (H₁ and H₂ histamine receptors expression in histidine decarboxylase knockout mice). Fitzsimons C¹, Lazar E², Hegyesi H², Tömösközi Z, Bergoc R¹, Darvas Z², Rivera E¹, Falus A². ¹Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ²Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University of Medicine, Hungary.

Se ha propuesto previamente un mecanismo autócrino de regulación de la expresión de los receptores a histamina (Hi). La histidina decarboxilasa (HDC) es la enzima de síntesis de histamina presente en la mayoría de los tejidos de los mamíferos, por lo que la cepa de ratones knockout para HDC, recientemente establecida, provee un modelo adecuado para investigar dicha hipótesis. Se decidió estudiar los niveles de expresión de los receptores H₁ y H₂ en ratones knockout para HDC y compararlos con los niveles de expresión en ratones normales de la cepa Balb/C. Se establecieron cuatro grupos experimentales 1) ratones *wild type* de la cepa Balb/c 2) ratones knockout para HDC 3) ratones *wt* con dieta libre de Hi y 4) ratones knockout con dieta libre en Hi. Se extrajo RNA total de los tejidos de ratones de los cuatro grupos experimentales y se estudió la expresión de los receptores H₁ y H₂ por RT-PCR en cerebro, estómago, corazón, íleon, piel y testículos. Complementariamente, se realizaron experimentos de unión con radioligandos histaminérgicos específicos. Los resultados indican que la regulación de la expresión de los receptores a histamina es tejido-específica y que, en general, la ausencia prolongada de Hi induce una regulación negativa de la expresión de los receptores H₂, mientras que parece afectar en menor grado la expresión de los receptores H₁.

72 - PERFIL DE ISOFORMAS DEL RECEPTOR A ESTROGENO Y SU RELACION CON LA EXPRESION DE C-FOS Y PCNA EN UN TUMOR MAMARIO EXPERIMENTAL. (Relationship between profile of estrogen receptor isoforms, c-FOS and PCNA expression in an experimental mammary tumor). Gutiérrez, A., Actis, A., Rilo, C., Cocca, C., Croci, M., Rivera, E., Bergoc, R. Laboratorio de Radioisótopos. Fac. de Farm. y Bioq., Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de isoformas del receptor a estrógeno (RE) en tumores mamarios inducidos en rata mediante inyección ip de N-Nitroso-N-metilurea y correlacionarlo con el grado de diferenciación tumoral y la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación como c-FOS y PCNA. Las isoformas de RE se determinaron por HPLC utilizando columnas de exclusión molecular y midiendo la radiactividad de las fracciones recogidas en un espectrómetro de centelleo líquido. Muestras de los mismos tumores se conservaron en formalina, cortaron y colorearon con hematoxilina-eosina para su observación microscópica y clasificación histopatológica; sobre los mismos cortes la expresión de c-FOS y PCNA se determinó por inmunohistoquímica. Los resultados indicaron que: los tumores con alto grado de diferenciación (cribiformes) presentaron numerosas mitosis por campo, significativa expresión de c-FOS y PCNA y la isoforma oligomérica de RE, el monómero y fragmentos de proteólisis. Los tumores más indiferenciados (papilar y comedocarcinoma) mostraron expresión de c-Fos y PCNA variable, presencia del monómero de RE y fragmentos de proteólisis; baja proporción de esos tumores no expresaron RE y mostraron áreas de necrosis. En conclusión, el perfil de isoformas de RE mostró que el oligómero está presente sólo en los tumores más diferenciados, que son también los que expresan mayor grado de proliferación.

REGULACION DE LA EXPRESION GENICA

73 - ESPECIFICIDAD DE UNION A ADN DE PROTEINAS CON HOMEODOMINIO ASOCIADO A UN CIERRE DE LEUCINAS (DNA-binding specificity of homeodomain-leucine zipper proteins) Tron, A., Bertoncini, C., Palena, C., Chan, R., González, D. Cát. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Bioq. y Cs. Biol., Univ. Nac. del Litoral, Santa Fe, Argentina.

El homeodominio es un motivo proteico de 61 aminoácidos que se halla presente en factores de transcripción generalmente involucrados en procesos de desarrollo. En plantas, existe una familia de proteínas con homeodominios en las que este motivo se halla asociado a un cierre de leucinas (Hd-Zip). Estas proteínas unen ADN en forma de dímeros. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la proteína Hd-Zip Hahb-4 de girasol une preferentemente la secuencia pseudopalindrómica 5'-CAAT(A/T)ATTG-3'. En el presente trabajo, hemos aplicado el modelo derivado de estos estudios para analizar la interacción con el ADN de otra proteína, denominada Hahr-1, perteneciente a otra familia, que posee un dominio de dimerización ligeramente distinto. Con este objetivo, se midió la unión de Hahr-1 a distintos oligonucleótidos que contenían variaciones puntuales de la secuencia mencionada, encontrándose unión preferencial a la secuencia 5'-CATT(A/T)AATG-3'. Dado que entre los homeodominios de ambas proteínas estudiadas existe una diferencia en la posición 47, se construyeron mutantes en las cuales el aminoácido de dicha posición fue intercambiado por el presente en la otra proteína. Las proteínas mutantes mostraron un cambio de especificidad, indicando que el aminoácido 47 interactúa con los nucleótidos de las posiciones -2 y +2 de la secuencia de unión. De esta manera, Ile y Phe generan preferencia por las hemisecuencias CAAT y CATT, respectivamente. La construcción de proteínas quiméricas entre las dos estudiadas indicó, además, que otras regiones del homeodominio son también importantes para determinar tanto la selectividad como la afinidad de unión a estas dos secuencias.

74 - ANALISIS DE MARCADORES POLIMORFICOS NUCLEARES EN LA POBLACION DE LA PROVINCIA DE CHUBUT. (Nuclear polymorphic markers in Chubut province population). Zamit, A., Penacino G., Sala, A., Corach, D. Servicio de Huellas Digitales Genéticas-Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Los microsatélites son polimorfismos presentes en el ADN que están constituidos por una unidad de repetición de 2 a 5 pares de bases, que puede estar repetida en un número variable de veces, generando variabilidad individuo específico.

El presente trabajo expone los resultados de la investigación de 8 sistemas de microsatélites, 7 autosómicos y uno sexual, en la población de Comodoro Rivadavia, Chubut. Se analizaron un total de 230 muestras de sangre de individuos no relacionados, que fueron divididos en dos grupos: argentinos y chilenos (estos últimos nacidos en Chile o hijos de ambos padres de origen chileno).

Se determinó que los grupos investigados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y los parámetros poblacionales y frecuencias alélicas fueron comparadas con las previamente publicadas en la población metropolitana de Buenos Aires. El presente trabajo permitió establecer las distancias genéticas entre los grupos investigados, grupos aborígenes de Argentina y población metropolitana de Buenos Aires como así también generar un banco de datos genéticos de utilidad en la investigación forense.

75 - POBLACION ABORIGEN DE MISIONES: ANALISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GENOMA MITOCONDRIAL. (Aboriginal population of Misiones province: mitochondrial DNA polymorphism analysis). Sala, A., Argüelles, C.*, Zamit, A.*, Fenochio, A*., Marino, M., Filgueira Risso, L., Penacino, G., y Corach, D.. Servicio de Huellas Digitales Genéticas-Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. *Laboratorio de Citogenética Humana- UNAM-Misiones

La secuencia del D-Loop y la inserción/delección de 9 pb de la Región V mitocondrial constituyen herramientas de la antropología molecular que junto con la antropología física, cultural e información de polimorfismos serológicos y nucleares, permiten investigar el posible origen de las poblaciones, corrientes migratorias y la interacción entre poblaciones. En la población aborigen americana han sido detectados 4 haplogrupos (Hg) mitocondriales, uno de ellos asociado a la delección. Se exponen los resultados obtenidos en la investigación de estos polimorfismos en tres comunidades Guaraníes: Jeji, Kaapay Poty y Tabay de Misiones. Se utilizaron métodos automatizados de análisis. Los resultados se compararon con los de la población caucasoide y mapuche de Argentina. Mientras que en Mapuches el Hg más frecuente es el B, en las comunidades investigadas el Hg A exhibe la mayor frecuencia, en tanto la delección de 9 pb estuvo asociada al Hg B al igual que en Mapuches. La diversidad encontrada es marcadamente menor que en la población caucasoide Argentina. La información de polimorfismos mitocondriales y la de polimorfismos nucleares permitirá determinar el grado de correlación existente entre nuestras comunidades aborígenes y la población caucasoide Argentina.

76 - REPLICACION DEL ADN / SPLICING DEL TRANSCRITO : ¿NUEVO TIPO DE ACOPLAMIENTO ? (DNA replication / RNA splicing: a new type of coupling.) Kadener S., Werbach S., Cramer P., Cazalla D. y Kornblihtt A.R. LFBM, FCEyN, UBA. 2do piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. Mail: sekin@bg.fcen.uba.ar.

Nuestro laboratorio demostró que el tipo de promotor de un gen modifica el "splicing" alternativo del transcrito generado por el gen. El sistema usado consiste en la transfección y expresión transitoria de plásmidos que llevan un minigén portador del exón alternativo EDI de la fibronectina, bajo el control de diversos promotores. Estas construcciones tienen además el origen de replicación del virus SV40, el cual sólo funciona en presencia de la proteína antígeno T de dicho virus. Si un plásmido transfectado en una célula eucariota pasa por un proceso de replicación, su cromatinización ocurre de manera tal que se produce un ordenamiento regular de nucleosomas, por oposición a la cromatinización irregular del plásmido en ausencia de replicación. En este contexto hemos obtenido los siguientes resultados: 1) La inclusión del exón EDI en el mRNA maduro aumenta 10 veces si los minigenes transfectados son replicados. 2) La disrupción del "splicing enhancer" del exón EDI de los minigenes anula el efecto de la replicación. 3) El efecto del antígeno T no se debe a su capacidad transformante provocada por su unión a la proteína Rb. 4) Al comparar por microscopía confocal el número de "focos" de transcripción nucleares para nuestro transcrito comprobamos que la replicación sólo aumenta en 1,5 veces el número de plásmidos transcribibles. Esto indica que los dramáticos efectos de la replicación sobre el splicing alternativo no son consecuencia de un aumento en el número de copias del molde sino en un cambio cualitativo del molde replicado respecto del no replicado.

77 - GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN TUMORES TROFOBlasticOS GESTACIONALES. (Differential gene expression in gestational trophoblastic tumors). Durand S., Abadie P., Flury A y Genti-Raimondi S. Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Los tumores trofoblásticos gestacionales comprenden un grupo de lesiones proliferativas del epitelio trofoblástico con características fenotípicas benignas (mola hidatiforme parcial y mola hidatiforme completa -CHM-) y malignas (mola invasiva y coriocarcinoma). Con el fin de establecer una asociación entre fenotipo y genotipo específicos de estas alteraciones se analizó mediante differential display la expresión de genes en CHM, enfermedad trofoblástica persistente y la línea celular de coriocarcinoma humano JEG-3 respecto a placenta normal de primer trimestre. Esta estrategia permitió detectar un aumento significativo de decorin en CHM. Este aumento a nivel del transcrito se correlacionó con sus niveles proteicos determinado por análisis inmunohistoquímico. Por el contrario, ensayos de Northern blot realizados con RNA total de los mismos tejidos demostraron una marcada disminución del transcrito de matriz extracelular SPARC en CHM. Análisis similar realizado para los transcritos byglican y tenascin no permitió detectar ninguna señal. Finalmente, se aisló un fragmento de cDNA que hibridó con un transcrito de 3.4 kb preferentemente expresado en JEG-3, con homología de secuencia con EST aisladas de librerías de expresión de diferentes tumores. El rastreo del gen completo en una librería de expresión de Hela permitió identificar un clon con inserto de 3.3 kb. El análisis de secuencia de nucleótidos demuestra que posee un ORF de 885 nt. La secuencia aminoacídica deducida de su secuencia de nucleótidos revela un 30% de aminoácidos idénticos y 50% de aminoácidos similares con la proteína de transferencia de fosfatidil colina bovina. Se discute su participación en el fenotipo de los tumores trofoblásticos.

78 - IDENTIFICACION DE UN NUEVO GEN INDUCIBLE POR ESTEROIDES ASOCIADO AL LOCUS β hsd DE COMAMONAS TESTOSTERONI (Identification of a Novel Steroid Inducible Gene Associated with β hsd Locus of *Comamonas Testosteroni*) Pruneda Paz JL., Cabrera JE, Angeletti S y Genti-Raimondi S. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Comamonas testosteroni es una bacteria del suelo, que puede usar esteroides como única fuente de carbono y energía. La presencia de esteroides en el medio de cultivo induce la expresión de un eficiente y específico sistema de transporte así como las enzimas degradativas de esteroides. No se conoce cual es la organización estructural de los genes que codifican a dichas proteínas. Previamente se reportó el clonado y análisis de secuencia de dos genes inducibles por esteroides, β hsd y stdC, localizados en ambos extremos de un fragmento HindIII de 3,2 kb. En la presente comunicación se muestra el clonado y la caracterización de otro gen inducible por esteroides, denominado sip48 (steroid inducible protein), ubicado entre los dos genes arriba mencionados. La secuencia de aminoácidos deducida de su secuencia de nucleótidos predice una proteína de 438 aminoácidos con un peso molecular de 48,500 Da. Esta proteína comparte alta homología con el producto del gen orf2 de función desconocida descrito en *Pseudomonas fluorescens* y *Thauera aromatica*. La proteína putativa Sip48 posee en su amino-terminal una estructura típica de aquellas asignadas para los péptidos señales. Ensayos de transcripción-traducción *in vitro* realizados a partir de un plásmido recombinante que contiene el gen en estudio permitió detectar un péptido de 48,5 kDa. Análisis de expresión mediante ensayos de Northern blot demuestra que Sip48 está fuertemente controlada a nivel transcripcional por testosterona indicando que se transcribe junto con β hsd como parte de un mensaje policistónico.

79 - IDENTIFICACION DE SECUENCIAS DE DNA DE ALTA AFINIDAD QUE INTERACTUAN CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCION cBPB. (Identification of High Affinity Sequences that Interact with the Transcription Factor CPBP). Prieto, C.C.; Bocco J.L.; Koritschoner N. P. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Cs. Qcas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. Subsidado por: FOMEC, CONICET, ANTORCHAS, FONCYT

El factor de transcripción *Core Promoter Binding Protein* (CPBP) perteneciente a la familia de proteínas Krüppel-like contiene en su región C-terminal tres dominios "Zinc-finger" del tipo Cys 2-His 2. Este dominio posee la capacidad de unirse a secuencias de DNA ricas en bases GC de diversos promotores. CPBP se expresa preferencialmente en la placenta regulando genes específicos como los genes *Pregnancy Specific Glycoprotein* (PSG) y en el hígado en procesos de regeneración tisular luego de injuria. Por otra parte se ha demostrado su participación en la regulación de la transcripción de los genes *Urokinase Plasminogen Activator* (uPA), el *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1), de los receptores TGF-β I y II y de la queratina humana 4.

El objetivo del presente trabajo fue identificar las secuencias de bases capaces de ser reconocidas con mayor afinidad por CPBP. Para estos análisis se usó una librería de oligonucleótidos "random" y la proteína CPBP expresada en bacterias. Las secuencias reconocidas por CPBP fueron clonadas y analizadas por secuenciamiento luego de cinco series de ensayos de selección por medio de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), purificación de los complejos DNA-proteínas y amplificación del conjunto de oligos por PCR. Estos resultados permiten conocer los requerimientos mínimos de CPBP para el reconocimiento de un promotor natural y de otros promotores de genes claves para el desarrollo y/o diferenciación celular.

80 - LA TRANSCRIPCION DEL GEN PSG5 ESTA REGULADA POR LOS RECEPTORES DE RETINOIDES. (PSG5 gene transcription is regulated by retinoid receptors). López Díaz, E.; Koritschoner, N. y Bocco, J. L. Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Univ. Nac. Córdoba. Argentina.

Los receptores de Ácido Retinoico (RA) denominados RARs y RXRs actúan generalmente como factores de transcripción inducibles por ligando, que se unen a secuencias de DNA llamadas "RA Responsive Elements" (RAREs) localizadas en la región promotora de numerosos genes.

La familia de genes que codifican a las Glicoproteínas específicas del embarazo (PSGs) es activada primordialmente durante la gestación desde estadios muy tempranos en las células del sinciotrofoblasto humano. Los 11 genes PSG poseen en su promotor un motivo RARE yuxtapuesto a un motivo "GC-rich" esencial para la actividad del promotor e interacción con proteínas nucleares.

En este trabajo exploramos si el motivo RARE es funcionalmente activo. La sobre-expresión de RXR y de RAR en células Cos-7 fue capaz de incrementar la transcripción dirigida por el promotor PSG5. El efecto de activación ligando-dependiente sólo se produjo con niveles elevados de RXR, observándose una inducción independiente de ligando a bajas dosis. Estudios de retención en geles muestran que la sobre-expresión de RXR no modifica el perfil de proteínas que se unen al sitio GC-rich aunque incrementa la intensidad de los complejos. La mutación de este sitio disminuye la actividad basal del promotor y permite una fuerte estimulación mediada por RXR. Estos datos demuestran la funcionalidad del motivo RARE presentes en el promotor del gen PSG5, y sugieren un mecanismo de regulación de la transcripción dependiente de los Receptores de Retinoides en coordinación con otros factores de transcripción.

81 - LA REGION 5' REGULADORA DEL GEN PSG5 POSEE SECUENCIAS REPRESORAS ESPECIFICAS DE PROMOTOR PERO NO PARTICIPA EN SU EXPRESION TEJIDO ESPECIFICA (PSG5 gene 5' regulatory region bears promoter specific negative regulatory elements but does not contribute to its tissue specific expression) Norez R., Patrito L. y Panzetta-Dutari G. Dpto. Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas. U.N.C. Córdoba, Argentina.

El gen humano PSG5 (glicoproteína específica de embarazo) pertenece a una familia de 11 genes que incrementan su transcripción significativamente durante el transcurso de la gestación. Sus promotores carecen de secuencias TATA box o iniciador y dependen en gran medida de la secuencia CPE (CCCCACCC), reconocida *in vitro* por el factor de transcripción CPBP. Con el propósito de profundizar en el estudio de los elementos que controlan la expresión del gen y determinar si ellos contribuyen a la transcripción tejido específica del mismo, se realizó un análisis comparativo de la actividad de varias quimeras 5' PSG-CAT en líneas celulares de diversos orígenes que difieren en los niveles endógenos de síntesis de transcritos y proteínas PSG y CPBP. En todos los casos se observó aproximadamente la misma actividad del promotor PSG5 (-43 a -254) comparado con la del promotor del gen de timidina kinasa. La región 5' reguladora (-254/-3204) mostró un claro efecto represor independiente del contexto celular. El efecto represor sólo se observó sobre el promotor PSG5 y no sobre un promotor heterólogo tipo TATA-box. La secuencia FP1 (-433/-455) fue reconocida por extractos proteicos de todas las líneas celulares formando complejos de igual movilidad y especificidad de unión. El análisis detallado de la región -254/-605 indicó que la actividad represora de este módulo se debe al efecto cooperativo entre el elemento *cis* FP3 (-505/-512) y la secuencia -524/-605. La disrupción de estas secuencias condujo a un incremento en la actividad promotora aún en células donde el gen PSG5 no se expresa. Estos resultados indican que la secuencia 5' de 3000 pb no contribuye significativamente a la expresión tejido específica del gen y que la transcripción del mismo está reprimida por elementos negativos específicos de promotor. Estos datos junto a evidencias previas nos permiten postular que la activación específica de los genes PSG durante la gestación ocurre por un mecanismo de desrepresión.

82 - LA ONCOPROTEINA c-JUN INTERACCIONA IN VIVO CON EL FACTOR CPBP (CORE PROMOTER BINDING PROTEIN) PARA ACTIVAR LA TRANSCRIPCION. (c-Jun oncoprotein interacts in vivo with the CPBP Krüppel-like factor to activate transcription.). Slavin D., Koritschoner N. and Bocco J.L. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. e-mail: dslavin@fcq.unc.edu.ar. (Financiado por: CONICET, FONCYT y SECyT)

El factor de transcripción CPBP ha sido clonado a partir de tejidos con alta tasa de proliferación y diferenciación como son la placenta y el hígado en proceso de regeneración. Por tal motivo se considera de interés biológico establecer su función como gen de respuesta temprana. Entre los genes regulados por CPBP se encuentran los que codifican a TGFβ (Transforming Growth Factor β) y sus correspondientes receptores, proteínas que ejercen un amplio espectro de funciones en el control de la proliferación y diferenciación celular. Por otro parte, los factores de transcripción que componen la familia AP-1, entre ellos la oncoproteína c-Jun, regulan la transcripción de genes en respuesta a estímulos de crecimiento y diferenciación. En trabajos previos hemos demostrado que la oncoproteína c-Jun estimula la función del factor CPBP para regular la transcripción. Experimentos realizados en la presente investigación demuestran que esa interacción funcional implica un contacto físico entre ambas moléculas ya que el complejo c-Jun/CPBP fue detectado luego de la inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal específico anti c-Jun. Además, los resultados sugieren que la interacción entre c-Jun/CPBP es dependiente de estímulos extracelulares como radiación UV. Estos resultados permiten inferir que la proteína CPBP es un nuevo factor de transcripción de respuesta temprana que en coordinación con la oncoproteína c-Jun modula la expresión de genes de relevancia funcional para la respuesta nuclear frente a estímulos extracelulares.

83 - CARACTERIZACION DEL "CLUSTER" DE ADN RIBOSOMAL NUCLEAR EN POBLACIONES DE MOSCAS DE LA FRUTA, *CERATITIS CAPITATA* Y *ANASTREPHA FRATERCULUS*. (Characteristics of the nuclear ribosomal DNA cluster in the fruit flies *C. capitata* and *A. fraterculus*). Sonvico¹, A.; Benseñor¹, L.; Basso², A. y Quesada-Allue¹, L. A. ¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Fundación Campomar, FCEyN-UBA) Bs. As. Argentina. ²Instituto de Genética INTA, Argentina. E-mail: lualque@iib.uba.ar

Los genes de ADNr en eucariotas se organizan en "clusters" dispuestos en unidades repetidas en tandem. Estos clusters están formados por genes y por regiones espaciadoras internas (ITS1 e ITS2) y externas (ETS); están separados por una región espaciadora intergénica (IGS). En *Drosophila* los genes 18S y 28S están separados por el ITS1, mientras que el ITS2 separa los genes 5.8S y 28S conteniendo al 2S. Las regiones espaciadoras permiten evaluar variabilidad y distancias filogenéticas entre especies.

Hemos aislado y caracterizado los genes 18S, 5.8S, 2S y las regiones ITS1 e ITS2 (GeneBank: AF096450, AF096451, AF187101, AF187102, AF210891) para *C. capitata* y *A. fraterculus*. Los respectivos tamaños para los ITS1 son de 985 pb y 580 pb, resultando de gran utilidad para distinguir las dos especies en estadios inmaduros. En el ITS2 de *C. capitata* existen polimorfismos, mientras que en de *A. fraterculus* se detectó una sola banda. A nivel intrapoblacional, no encontramos diferencias en los ITS1 e ITS2. Con una sonda de 18S de *Ceratitis* se localizó la posición del cluster en los dos cromosomas sexuales de las dos especies.

84 - UTILIZACION DE LAS RESERVAS ENERGETICAS DURANTE LA METAMORFOSIS DE LA MOSCA DEL MEDITERRANEO, *CERATITIS CAPITATA*. (Utilization of energetic resources during the metamorphosis of *C. capitata*) Nestel¹, D.; Tolmasky², D. S.; Rabossi², A. y Quesada-Allue², L. A. ¹The Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan 50250, Israel. ²Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Fundación Campomar, FCEyN-UBA) Bs. As. Argentina. E-mail: dtolma.fc@iib.uba.ar

Se estudió la utilización de las fuentes energéticas en la mosca Mediterránea durante el período que abarca la transición de larva saltante (-8 hs) hasta la formación del adulto farado (+144 hs). Los resultados indican que: a) desde -8 hs hasta la transición de pre-pupa a pupa (+40 hs) la principal fuente de energía fue el glucógeno; b) de +40 hs a +100 hs es notoria la degradación de proteínas y c) a partir de las +100 hs comienzan a ser utilizados los lípidos. Se estudiaron, en paralelo, la fosforilasa y la amilasa del glucógeno y las peptidasas ácidas lisosomales. Se comprobó que las actividades correlacionan con los cambios en los niveles de sus respectivos sustratos.

Es la primera vez que se ha podido analizar la utilización de las diferentes fuentes de energía durante la metamorfosis holometábola de insectos. Los resultados indican que durante ésta se utilizan el glucógeno larval, el neoglucógeno pupal y, quizás, aminoácidos, además de triglicéridos.

85 - REGULACION TRANSCRIPCIONAL DE GLICOSIL-TRANSFERASAS CLAVES EN LA SINTESIS DE GANGLIOSIDOS. (Transcriptional regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis). Raimondi LP, Daniotti JL y -Maccioni HJF Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias. Químicas. CIQUIBIC-CONICET Universidad Nacional de Córdoba

La composición de gangliósidos es regulada en forma específica de tipo celular durante los procesos de diferenciación y desarrollo. Los gangliósidos simples tales como GD3 son abundantemente expresados en estadios tempranos del desarrollo en SN y a medida que la diferenciación procede son progresivamente reemplazados por gangliósidos complejos (GM1 GD1a GD1b GT1b). Estudios de Northern blot e hibridación in situ revelaron que al menos en parte la modulación por desarrollo de la calidad de los gangliósidos se debe a la regulación transcripcional de glicosiltransferasas claves. Entre éstas podemos mencionar a la UDP-Gal:GA2/GM2/GD2 galactosiltransferasa (GM1 sintasa). Usando la secuencia codificante de GM1 sintasa de rata clonada en el laboratorio se identificó un clon EST homólogo de ratón. Este clon fue secuenciado y el análisis de los datos de secuencia reveló que la misma se encuentra en el cromosoma 17, en el locus del complejo mayor de histocompatibilidad y que contenía múltiples secuencias consenso para diversos factores reguladores de la transcripción. Por PCR se amplificaron fragmentos de la putativa región promotora, los cuales se fusionaron al gen reportero CAT. Los clones recombinantes se usaron para realizar ensayos de transcripción en células CHO-K1. Los resultados revelan que un fragmento de 1500 pb hacia el 5' del ATG (-1500) es capaz de estimular la expresión del gen reportero. La delección de -150 pb no afectó mayormente la actividad promotora a diferencia de la delección de -250 pb que resultó en pérdida de dicha actividad

86 - MECANISMO DE INTERACCION CON ADN DEL DOMINIO C-TERMINAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION E2 DE CEPAS DE PAPILOMAVIRUS MODELO. (DNA equilibrium binding mechanism of the E2 transcription factor C-terminal domain from prototype papillomaviruses). Ferreiro D.U., Nadra A.D., Centeno J.M., Lapéña A., Alonso L.G. y de Prat Gay, G. IIB-Fundación Campomar, FCEyN. Av. Patricias Argentinas 435 (1405) Buenos Aires, Argentina. e-mail: ferreiro@iib.uba.ar

La interacción del factor de transcripción E2 con ADN juega un papel determinante en la regulación de la transcripción de todos los genes del papilomavirus, y participa en funciones relacionadas tales como replicación, regulación del número de copias de episomas, y ensamblado de la partícula viral. Estamos interesados en la disección molecular del mecanismo de reconocimiento y unión al ADN del dominio C-terminal de E2 (E2c). Utilizando técnicas espectroscópicas en solución, determinamos que dos moléculas diméricas de HPV-16 E2c pueden unirse a un sitio canónico de E2, contrastando con el dominio homólogo de BPV-1 para el cual sólo un dímero es unido. Los dos modos de unión de HPV16-E2c son no equivalentes, uno de alta afinidad ($K_D=0.2$ nM) y otro de "baja" afinidad ($K_D=2$ nM), mientras que el dominio bovino se une al mismo sitio con una afinidad 350 veces menor. La capacidad de discriminar entre sitios propios o no-propios, y sitios específicos o no específicos es diferente para ambos dominios. Espectros de dicroísmo circular en el UV-cercano muestran que el ADN sufre un cambio conformacional significativo al unirse E2c. No obstante, el dominio de BPV-1 provoca un cambio conformacional diferente al mismo oligonucleótido, atribuible a una curvatura más pronunciada del ADN. Las diferencias y similitudes bioquímicas presentadas son relacionadas con las estructuras cristalográficas resueltas para ambos dominios, que podrían explicar diferencias en la regulación de la transcripción de ambos virus.

87 - CARACTERIZACION DE LA ONCOPROTEINA E7 DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO DE ALTO RIESGO (HPV-16). (Characterization of the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16). Alonso L.G., Lapeña A.N., Centeno A.N., Nadra A. y de Prat Gay G. IIB, Fundación Campomar, FCEyN, UBA, Argentina.

Los papilomavirus denominados de "alto riesgo" están asociados al desarrollo de lesiones cancerosas en epitelios y mucosas, en particular el papilomavirus humano cepa 16 se encuentra en más del 80 % de las biopsias de carcinoma invasor de cuello de útero. En este trabajo describimos la expresión, purificación y caracterización de la principal proteína transformante del HPV 16, E7 en *E.coli*. El proceso de purificación consta de cuatro pasos: columna de afinidad, intercambio aniónico en presencia de urea, filtración en tamiz molecular en presencia de urea y filtración en tamiz molecular en condiciones nativas. La presencia de conforméromos podría ser el motivo de la dificultad en estudios estructurales a la fecha. E7 presenta una serie de características inusuales para otras proteínas globulares: tiene un comportamiento electroforético en SDS-PAGE correspondiente a una proteína globular de 18kDa cuando su peso molecular es de 11kDa. Presenta además propiedades hidrodinámicas inusuales en una filtración molecular, comportándose como especies de 40 y 60kDa. Es extremadamente termorresistente; y su conformación sensible al pH. Entre pH 2.5 y 3.5 presenta un alto contenido de hélice determinado por dicroísmo circular y a pH 7.0 posee un mínimo a 205 posiblemente indicativo de hélices tipo 3_{10} . Además, posee una fuerte tendencia a formar fibras en solución. Integrando nuestros análisis proponemos un nuevo modelo descriptivo de E7 y avanzamos a condiciones mejores para determinaciones estructurales por cristalografía y RMN.

88 - PAPEL DE UN RESIDUO DE CYS ALTAMENTE CONSERVADO EN LA UNION DEL DOMINIO C-TERMINAL DE LA PROTEINA E2 DEL BPV-1 A ADN: RECONOCIMIENTO BASE ESPECIFICO Y REGULACION REDOX. (Role of the highly conserved cysteine residue in DNA binding activity of the C-terminal domain of BPV-1: base-specific recognition and redox regulation). Lapeña A., Alonso L.G., Ferreiro D.U. y de Prat Gay G. I.I.B, Fundación Campomar y FCEyN, UBA, Argentina.

La proteína E2 (BPV-1) regula la transcripción y la replicación virales. La unión a su ADN específico está mediada por el dominio C-terminal dimerico, un homodímero de 101 residuos por monómero (23kDa), con una estructura particular de barril β -dimerico que interactúa con ADN a través de una hélice α , que posee un residuo de cisteína altamente conservado (Cys 340). La participación de esta cys es única entre proteínas que unen ADN en cuanto a que al formar uniones de hidrógeno con bases, es determinante del reconocimiento molecular. Purificamos E2 DBD y las mutantes (C340-A; -G; -S; -V; -N; -T y -Q). El alto grado de desestabilización de la mutante C340S (3.5 kcal/mol) muestra que además de puentes de hidrógeno, existe un papel importante de la cys ligado al del azufre. Estudios anteriores de otros laboratorios hipotetizaron acerca de la participación de C340 en regulación redox de la expresión génica. La proteína salvaje y las mutantes se sometieron a oxidación suave y se observó una especie correspondiente a una dimerización mediada por Cys 340. Esta especie daría lugar a una supraestructura que está siendo caracterizada por filtración molecular y análisis de sus propiedades de unión. Nuestros resultados se discutirán en relación a la estructura fina en torno del residuo de cys y de la tendencia a oxidación que sustentaría un mecanismo de regulación redox de la transcripción viral.

89 - DISCRIMINACION DE SITIOS ESPECIFICOS DE LA PROTEINA E2 REGULADORA DE LA TRANSCRIPCION EN EL GENOMA DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO, CEPA 16. (Specific DNA site discrimination of the E2 transcriptional regulator E2 from human papillomavirus strain-16). Nadra A.D., Ferreiro D.U., y de Prat Gay G. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, FCEyN-UBA, Argentina. Av. Patricias Argentinas 435 (1405) Buenos Aires. e-mail: anadra@iib.uba.ar.

Los papilomavirus son pequeños virus a ADN que carecen de envoltura y producen lesiones epiteliales en animales superiores que frecuentemente degeneran en transformaciones malignas. La proteína E2 regula la expresión de todos los genes virales, en particular la de los productos de los oncogenes E6 y E7. El genoma del HPV cuenta con cuatro sitios específicos de unión para E2, cuya secuencia consenso es ACCGN₁CGGT. Determinamos las afinidades del dominio de unión a ADN de E2 (E2C) para cada sitio, utilizando espectroscopía de fluorescencia en solución. Asimismo, determinamos las estequiometría, la tendencia a agregación de cada complejo y las conformaciones del ADN unido a dicho dominio. Correlacionamos los datos de afinidad con los cambios conformacionales producidos en el ADN unido, determinando que los cuatro nucleótidos no conservados son de gran importancia en el reconocimiento molecular y por lo tanto, en el ajuste fino de unión a cada sitio. Finalmente, intentamos describir el mecanismo de reconocimiento de E2C hacia diferentes oligonucleótidos de ADN correspondiendo a uno de los sitios, variando el largo del duplex, afinidad por cadena simple de ADN y hairpins, así como ADN no específico. Existe una graduación de afinidades que, junto con las posiciones en el genoma, podrían ser determinantes del patrón de expresión génica en cada etapa del virus.

90 - RAC-3: UN NUEVO COACTIVADOR DE NFkB (RAC-3: a novel NFkB coactivator) Nojek I., Werbach S., Costas M. Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA, Buenos Aires. Mail: inojek@bg.fcen.uba.ar

Citoquinas proinflamatorias y glucocorticoides antagonizan mutuamente. Se ha descrito una interacción física entre el receptor de glucocorticoides (GR) activado, con el factor nuclear κ B (NFkB), así como la inducción del factor inhibitorio de NFkB (Ikb) por glucocorticoides. La transactivación del GR está modulada por numerosos coactivadores. Con el objetivo de determinar si RAC-3, un coactivador de GR, puede ser también considerado un coactivador de NFkB se analizó: 1) la actividad transcripcional de NFkB activado por TNF- α (10 ng/ml) por transfección de células HeLa con un vector de expresión de RAC-3, obteniéndose un aumento en la transcripción en forma dosis-dependiente (hasta 24 veces); 2) la interacción física de RAC-3 con Rel-A (un componente de NFkB) por coimmunoprecipitación, obteniéndose análisis positivos en ensayos de western blot luego de activar a NFkB con TNF- α ; 3) la posible reversión del antagonismo entre GR y NFkB en su actividad transcripcional por transfección con dosis crecientes del vector RAC-3 en células estimuladas con TNF- α y dexametasona, obteniéndose una clara reversión en forma dosis de RAC-3-dependiente (ejemplo: con vector RAC-3 2 μ g, dexametasona 50 nM y TNF- α 10 ng/ml, la actividad GRE-LUC aumenta 10 veces respecto del valor obtenido sin RAC-3). Estos resultados demuestran que RAC-3 es un coactivador de NFkB y que podría constituir un factor de competencia entre GR y NFkB explicando, en parte, su antagonismo mutuo.

91 - EFECTO DE LA PROTEINA E1a SOBRE EL SPLICING ALTERNATIVO (Effect of the protein E1a on alternative splicing). Werbajh S., Kadener S. y Kornblihtt A.R., LFBM, FCEyN, UBA. 2do piso, Pabellón II, Ciudad Universitaria (1428), Buenos Aires, Argentina. Mail: swerba@bg.fcen.uba.ar.

E1a es una oncoproteína de adenovirus esencial para la infección y transformación celulares. Existen dos variantes de esta proteína (denominadas 12S y 13S) debido a la presencia o no de un exón alternativo. Ambas formas interactúan con distintos factores de transcripción y coactivadores. E1a no tiene dominio de unión al DNA pero es reclutada a promotores a través del factor ATF-2 que reconoce la secuencia CRE. En nuestro laboratorio demostramos que la estructura del promotor que dirige la síntesis de un determinado mRNA influye sobre el patrón de splicing alternativo del transcripto. En este contexto probamos el efecto de E1a sobre el splicing alternativo del exón EDI de la fibronectina (FN) bajo diferentes promotores y encontramos: 1) que E1a estimula notoriamente (7-8 veces) la inclusión del exón EDI cuando su transcripción está dirigida por el promotor de CMV o el de FN; no así cuando el promotor es el de alfa globina. 2) este efecto no depende del dominio CR3 de la proteína de E1a ni del sitio CRE del promotor de la FN, pero sí del "splicing enhancer" del exón EDI, 3) experimentos realizados con el antígeno T de SV40, otra oncoproteína que, como E1a, produce transformación celular al unirse a las proteínas p53 y RB, indicarían que la titulación de estas proteínas no sería responsable del efecto de E1a sobre el splicing alternativo.

92 - EFECTO DEL COACTIVADOR CBP SOBRE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LA REGION PROMOTORA DEL GEN DE LA 5-AMINOLEVULINATO SINTETASA. (CBP effect on the transcriptional activity of 5-aminolevulinate synthase promoter). Ceruti, J.M., Varone, C.L. y Cánepa, E.T. Laboratorio de Biología Molecular-Depto. de Química Biológica-FCEN-UBA, Buenos Aires, Argentina.

En trabajos anteriores hemos demostrado que el cAMP posee un efecto inductor del gen de ALA-S a nivel transcripcional y que es mediado por la activación de la PKA. Por delecciones seriadas de la zona promotora, en experimentos de transfección transiente, se mapeó la zona responsable de dicho efecto a la región entre -156 y -38 pb. Analizando esta zona se identificaron dos sitios con alta homología a CRE ubicados en -152 y -45. Estos sitios tienen actividad funcional en respuesta a cAMP. Por otro lado hemos determinado que la sobreexpresión de CREB posee un efecto inductor o represor de la transcripción de ALA-S dependiendo de su estado de fosforilación. Estos efectos son específicos dado que no se observan al cotransfectar con mutantes CREB de unión al DNA y de fosforilación. Analizamos estructural y funcionalmente los elementos con alta homología a CRE. Mutaciones de los sitios CRE analizadas en ensayos de retardo en gel y en experimentos de transfección transiente demostraron ser responsables de la acción inductora ejercida por el cAMP, uniendo específicamente al factor CREB. En el presente trabajo por experimentos de transfección transiente mostramos evidencias de que el coactivador CBP media la respuesta dependiente de cAMP, aumentando la actividad inductora de CREB en presencia de PKA cerca de dos veces. Por otro lado demostramos que revierte el efecto represor de CREB. Estos efectos son dependientes de la actividad de PKA, dado que la cotransfección con una mutante dominante negativa de la kinasa anula la acción de CBP. Además es importante la ubicación relativa al inicio de la transcripción de los sitios CRE para que se evidencie el efecto de CBP. Los resultados muestran una función inductora de CBP sobre la expresión de ALA-S y postulamos que este efecto podría deberse al reclutamiento de factores o a su actividad acetiltransferasa de proteínas.

93 - PROTEINAS FOS/JUN REGULAN LA EXPRESION DEL GEN DE LA 5-AMINOLEVULINATO SINTETASA A TRAVES DE SU UNION A UN SITIO AP-1. (Fos/Jun proteins regulate the 5-aminolevulinate synthase gene expression by interaction with an AP-1 site). Guberman, A.S. y Cánepa, E.T. Laboratorio de Biología Molecular-Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina.

La proteína AP-1, consistente en un complejo formado por proteínas de las familias Fos y Jun, se une a elementos denominados TRE regulando la expresión de genes inducibles por ésteres de forbol como el TPA. Hemos demostrado que la expresión del gen de 5-aminolevulinato sintetasa (ALAS), contrariamente a lo reportado para la mayoría de los genes sensibles a ésteres de forbol, es inhibida por TPA siendo necesario el fragmento -354 a -156 pb de la región 5'-regulatoria para manifestar dicho efecto. El objetivo del presente trabajo es identificar los elementos en el promotor y los factores proteicos que median este efecto. Para ello, se han realizado ensayos de *band-shift* con extractos nucleares de HepG2 y un oligonucleótido (ON) que comprende la región entre -252 a -272 pb del promotor conteniendo un sitio con alta homología TRE (TRE-ALAS). Los extractos nucleares forman con TRE-ALAS, pero no con éste mutado, un complejo de retardo que aumenta cuando las células son previamente tratadas con TPA 1 µM. No hay competencia con exceso de ON-TRE-ALAS mutado sugiriendo una unión específica. El complejo es desplazado con exceso de 10 veces de un ON-TRE consenso y no con exceso de 100 veces con ON-CRE consenso y otros. Por otro lado, se realizaron experimentos de transfección y expresión del gen reportero CAT, fusionado a la región -354 pb proximal del promotor de ALAS, cotransfectando con vectores que expresan proteínas de la familia fos/jun. Sólo heterodímeros c-fos/c-jun y c-fos/junD inhiben la actividad transcripcional del promotor de ALAS de un modo similar al TPA. Por último, la sobreexpresión de un vector que expresa CBP bloquea el efecto inhibitorio mediado por TPA. Estos resultados demuestran que los ésteres de forbol regulan la expresión del gen de ALAS a través de proteínas fos/jun que interactúan sobre un elemento TRE. El efecto inhibitorio se debería al secuestro del coactivador CBP por proteínas jun, impidiendo la formación del complejo CREB-CBP necesario para la activación transcripcional de éste gen. Trabajo subsidiado por UBA, CONICET y ANPCYT, Argentina.

94 - DESARROLLO DE UN MODELO *IN VIVO* PARA EXPRESAR GENES EN CELULAS Y REGIONES ESPECIFICAS Y A UN TIEMPO DETERMINADO EN EL CEREBRO DE RATONES ADULTOS. (Development of an *in-vivo* model for temporal-, cell- and region-specific gene expression in the brain of adult mice). Di Paolo, N.*, Schöneberg, A.[†], Depino A.^{*}, Kirchherr, B.[†], Pfinzenmaier, K.[†], Podhajcer, O.^{*}, Eisel, U.[†], y Pitossi, F.*. * Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Argentina. Institut für Zellbiologie und Immunologie, Stuttgart, Germany. Este trabajo fue realizado con aportes del CONICET, la DAAD y la Fundación René Barón.

El objetivo del trabajo es lograr la expresión de transgenes en una región del cerebro de ratón y a un tiempo determinado, combinando animales knock-in, adenovectores recombinantes y el sistema CRE/loxP. Hemos generado ratones knock-in en los cuales la expresión del factor de necrosis tumoral-α (TNF) bajo el control del promotor endógeno *enrailed* se halla impedida por una secuencia flanqueada por sitios lox-P ("floxeada"). Células totipotentes y ratones knock-in fueron transducidos con adenovectores expresando la recombinasa CRE (AdCRE) que reconoce y deletorea la secuencia floxeada que impide la expresión del TNF. Tanto *in vitro* como *in vivo* hemos observado la recombinación mediada por AdCRE. Asimismo, resultados preliminares indicarían la expresión específica del TNF en la sustancia nigra en ratones inoculados con AdCRE, pero no en ratones inyectados con adenovectores controles o en animales controles inyectados con AdCRE. Esta combinación de técnicas permitiría lograr la expresión génica en células, región y tiempo específicos en el cerebro del ratón adulto.

95 - CARACTERIZACION DE MARCADORES MOLECULARES DEL CROMOSOMA Y EN UNA POBLACION DE LA ISLA DE PASCUA. (Characterization of Y chromosome molecular markers in a population from Easter Island). Rivera, F.; Miquel, J.F.; Nervi, F.; Carvallo, P. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, y Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile. Santiago.

Los avances del proyecto del genoma humano han permitido la caracterización de diversos loci polimórficos, que son de gran utilidad para estudios de genética poblacional. Este trabajo se centra en la población de la Isla de Pascua que debido a su aislamiento, enfermedades e inmigraciones diversas, ha sufrido cambios en la estructura de su población. Esto hace muy interesante el estudio de la composición y la estructura de esta población, porque nos podría revelar en que proporción se conserva el origen polinésico en la Isla. Para esto se seleccionaron 20 individuos de sexo masculino con dos apellidos de origen Maorí. En éstos se analizaron diferentes marcadores polimórficos del cromosoma Y, tanto bialélicos como multialélicos. Dentro de los primeros estudiamos la inserción de una secuencia Alu en el locus DYS287(YAP), que es característica de poblaciones de África, Asia y Europa; la transición C-T en los loci 92R7, DYS199 y RPS4Y que permiten distinguir poblaciones Europeas, Amerindias, Melanésicas y de una parte de Asia; y por último la transición A-Gen en el locus DYS271 que es característica de poblaciones del Sub-Sahara en África. Los marcadores multialélicos utilizados fueron: el DYS19 (5 alelos) y el sistema Alfoide (mas de 20 haplotipos). Los resultados muestran que la población escogida de la Isla de Pascua tiene el siguiente haplotipo mayoritario (85 %): YAP-/DYS199C/DYS271A/92R7C/RPS4YT/DYS19D6E/ Alfoide V. La presencia de este haplotipo mayoritario demuestra una estrecha relación de estos individuos con poblaciones de la Melanesia y del Norte y Este Asiático, que coincide con las teorías sobre el poblamiento de la Polinesia. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se analizaron polimorfismos de DNA mitocondrial en un grupo similar (50 individuos), encontrándose que todos presentaban haplotipos de origen polinésico. Estos resultados en conjunto nos indican que la Isla de Pascua fue poblada desde la Polinesia, y que aún se conservan estos linajes tanto de origen materno como paterno, a pesar de su historia reciente.

96 - ANALISIS DE METILACION DE ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES EN LEUCEMIA LINFATICA CRONICA (Methylation analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in CLL) Oliveira-Cruz, L.; Bertin, P. Departamento de Hematología-Oncología. Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: P. Carvallo).

La leucemia linfática crónica (LLC) es un tipo de leucemia frecuente en adultos. Se han descrito mutaciones en el gen p53, una pérdida de heterocigocidad en el locus 17p, una trisomía del cromosoma 12 y la delección del cromosoma 13q14, como posibles causas de la LLC. Sin embargo, estas alteraciones explicarían sólo en parte la patología. La metilación de DNA es un mecanismo normal de regulación de la expresión génica, constituyendo, además, un sitio susceptible de mutaciones. Dado que las alteraciones cromosómicas conocidas parecen no explicar la mayoría de los casos de LLC, nos interesó estudiar el patrón de metilación y el nivel de expresión proteica de los genes c-myc, bcl-2, Rb1 y p53, por estar involucrados en el control de la proliferación celular y la apoptosis. Se tomaron muestras de sangre periférica de 40 pacientes con LLC y 20 controles y se extrajo DNA genómico y proteínas linfocitarias. El nivel de expresión de las proteínas c-myc y bcl-2 fue analizado por Western, el patrón de metilación de c-myc y de Rb1 por Southern y el de p53 por digestión con Hpa II seguido de PCR. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: los genes c-myc, Rb1 y p53 no presentaron diferencias en su patrón de metilación entre pacientes y controles. La proteína bcl-2 aparece aumentada y la proteína c-myc disminuida en los pacientes. Es interesante el cambio de expresión de estas dos proteínas, a pesar de no correlacionarse con un cambio en la metilación. Es probable que la variación en la expresión de c-myc y de bcl-2 se deba a una variación en el patrón de metilación de estos genes, en sitios diferentes de los estudiados. Fondecyt 1981051

97 - RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A HIPOXIA EN DROSOPHILA MELANOGASTER (Transcriptional response to hypoxia in *Drosophila melanogaster*) Russo D.M., Centanin L., Muzzopappa M., Bocca S.N., Lavista-Llanos S., Wappner P., IIB Fundación Campomar, Buenos Aires (1405), Argentina.

Con el objeto de identificar componentes de la vía de señalización de hipoxia en *Drosophila*, hemos generado una serie de líneas transgénicas que expresan β -galactosidasa (β -gal) controlada por secuencias regulatorias de vertebrados provenientes de genes inducibles por hipoxia. Se compararon niveles de β -gal en moscas en hipoxia y en normoxia. Mientras que las secuencias de reconocimiento de HIF-1 α confieren una inducción modesta, moscas que llevan un elemento de 50 pares de bases del *enhancer* del gen LDH-A murino mostraron una inducción mucho mayor. Utilizando esta línea transgénica, hicimos una caracterización fisiológica de la respuesta transcripcional a hipoxia. La inducción del reporteador fue máxima entre 3 y 5% de oxígeno y alcanza niveles máximos hacia el final de la embriogénesis. Utilizando la misma secuencia regulatoria, generamos una segunda línea transgénica que expresa la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Al colocar las larvas en 5% de oxígeno durante 12 horas, se observó que GFP se expresa mayormente en células del sistema traqueal (respiratorio). Una hipoxia mas severa durante tiempos mas prolongados induce la expresión de GFP también en otros tejidos, indicando que el sistema tiene niveles diferentes de sensibilidad. Mediante la utilización de diversos mutantes, estamos intentando determinar cuál es el homólogo de HIF-1 en *Drosophila* y qué proteínas regulan su actividad transcripcional. Paralelamente, hemos iniciado un screening genético sistemático, destinado a identificar nuevos genes relacionados con el sentido celular de oxígeno y con la cascada de transducción de la señal inducida por hipoxia que culmina con la expresión génica diferencial.

98 - DELECCIONES DEL CROMOSOMA 3p EN LA PATOGENIA DEL CANCER DE LA VESICULA BILIAR (CVB) (Chromosome 3p deletions in the pathogenesis of gallbladder carcinoma). Wistuba I., Ashfaq R., Maitra A., Pimentel F., Gazdar A., Minna J. Deptos. de A. Patológica y Cirugía, Facultad de Medicina, P. Univ. Católica de Chile; Pathology Dept. y Hamon Center, UT-Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. (FONDECYT 1990489).

Delecciones de regiones del brazo corto del cromosoma 3 (3p) son frecuentes en varias neoplasias humanas y en él se han identificado algunos potenciales genes supresores de tumores (GST) (VHL, FHIT, DUTTI, etc). Nuestro reciente análisis de pérdida de heterocigocidad (PH) o alelotipificación de baja densidad a través de todo genoma humano indica que las delecciones de 3p ocurren frecuentemente en CVB. Nuestro objetivo fue determinar con mayor precisión las regiones del cromosoma 3p y sus potenciales GST involucrados en la patogenia del CVB. Se realizó alelotipificación de alta densidad de 3p en ADN extraído de tejido microdisecado de 24 CVB y sus lesiones precursoras adyacentes, utilizando 30 marcadores microsatélites. Se observó una alta frecuencia de delecciones de 3p (23/24, 96%) en CVB. El análisis de regiones mínimas con delecciones frecuentes indicó que las regiones 3p21.3 (79%), 3p14.2 (gen FHIT, 75%) y 3p12 (gen DUTTI, 88%) se afectan frecuentemente en CVB, y lo hacen precozmente en la progresión de esta neoplasia (lesiones precursoras). Además, mediante técnica inmunohistoquímica se observó una alta frecuencia de ausencia o disminución significativa de Fhit en CVB (79%) y sus lesiones precursoras adyacentes (55%). Nuestros resultados indican que las delecciones de tres regiones del cromosoma 3p (3p21.3, 3p14.2 y 3p12) son importantes en la patogenia del CVB y pueden contener GST potencialmente relevantes en esta neoplasia. Las frecuentes delecciones en la región 3p14.2 son concordantes con la aparente inactivación del gen FHIT en CVB.

Paneles II

MACROMOLECULAS

99 - CARACTERIZACION DE ALTERACIONES EN EL SITIO DE UNION A IONES METALICOS DE β -LACTAMASA II DE *BACILLUS CEREUS*. (Characterization of alterations in the metal ion binding site of β -lactamase II from *Bacillus cereus*) J.A. Cricco, A.J. Vila. Area Biofísica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas U.N.R.

Las metalo- β -lactamasas son enzimas que inactivan antibióticos β -lactámicos, presentan amplio espectro de sustrato y utilizan Zn(II) como cofactor natural. Se han caracterizado metalo- β -lactamasas producidas por distintos microorganismos, entre ellas β -Lactamasa II (β LII) producida por *B. cereus*. Su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado. Se determinó que estas enzimas incorporan hasta dos iones Zn(II) en su sitio activo y la mayoría de los residuos del mismo están conservados. β LII presenta distinta afinidad para la incorporación del primer y segundo ion Zn(II), siendo activa tanto en forma mono como binuclear.

En β LII Cys 168 es ligando del sitio unión de Zn(II) de baja afinidad. Con el fin de estudiar las características estructurales y catalíticas de β LII se substituyó el residuo Cys 168 por Asp, His y Ser por mutagénesis sitio dirigida. Se determinaron los parámetros cinéticos de estas enzimas mutantes, en C168S y C168H se observó una marcada disminución de k_{cat} y un aumento de K_M comparado con los valores determinados para β LII. La enzima C168D mostró un comportamiento similar a la enzima salvaje. En base a los valores obtenidos podemos concluir que las sustituciones en C168H y C168S disminuyen la eficiencia catalítica porque afectan la incorporación del segundo ion Zn(II), lo que no ocurre en C168D y que el residuo Cys-168 cumpliría un rol en el mecanismo catalítico de β LII, aun actuando en forma mononuclear.

100 - CAMBIOS EN LA COMPOSICION PROTEICA DE LAS CAVEOLAS DURANTE LA MADURACION DE TERMINALES AXONICOS (Changes in the protein components of caveolae during the maturation of axonal terminals). Patterson, S.L., Rizzo, R.G. y Alvear, D. Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

La formación de conexiones interneuronales que sostienen el funcionamiento del sistema nervioso maduro está orquestada por la actividad independiente de los terminales axónicos: conos de crecimiento y sinapsis. Estas estructuras perciben e integran las señales ambientales necesarias para establecer y refinar conexiones durante las etapas críticas del desarrollo dependientes de actividad. Una gran variedad de proteínas de transducción de señales se encuentran enriquecidas en las terminales neuronales para llevar a cabo estos comportamientos variados. Una pregunta fundamental para desentrañar la compleja red de funciones de estas proteínas es la de como interactúan específicamente in situ. Dos clases de modificaciones post-traduccionales - fosforilación y S-palmitoilación - han sido implicadas en la regulación de la selectividad de la interacción entre proteínas a través del targeting a compartimientos membranales especializados conocidos como caveolas. La S-palmitoilación de proteínas es necesaria para el funcionamiento adecuado de varias vías de transducción de señales, y para la extensión normal de axones. Los sustratos palmitoilados endógenos en las terminales neuronales cambian dramáticamente durante las etapas críticas del desarrollo, sugiriendo un acoplamiento entre la incorporación de proteínas específicas en caveolas y la adquisición de características sinápticas maduras. La investigación de la palmitoilación dinámica de determinados sustratos en las terminales neuronales y su incorporación subsecuente en caveolas es un abordaje poderoso para evaluar sus actividades in situ, y para elucidar el rol del targeting a caveolas en rutas de transducción de señales.

101 - DETECCION FOTOQUIMICA DE TRANSICIONES CONFORMACIONALES EN PROTEINAS. (Photochemical detection of conformational transitions in proteins) Ureta D. B., Craig P. O., Delfino J. M. Departamento de Química Biológica-IQUIFIB (U.B.A.-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A. Junín 953, 1113 Buenos Aires, Argentina. delfino@qb.ffyb.uba.ar

3 H-diazirina es un gas fotorreactivo de tamaño comparable al del agua, útil para estudiar el estado conformacional de proteínas. Por irradiación UV ($\lambda > 300$ nm) 3 H-diazirina genera metilén carbeno tritiado que reacciona casi instantáneamente con el entorno molecular inmediato (proteína o solvente). La incorporación de marca radiactiva en β -lactamasa dependiente de fotólisis resultó proporcional a la concentración de diazirina. Por otro lado, la transición conformacional observada por dicroismo circular (UV lejano y cercano) para β -lactamasa de *B. licheniformis* en urea (punto medio ~ 3.8 M) coincide con la medible por incorporación de C^3H_3 a la proteína. La proteína en estado desnaturalizado incorpora $\sim 30\%$ más marca radiactiva que en estado nativo. El nivel de marcación global puede interpretarse como la suma de la marcación superficial y la marcación de sitios interiores. Estos resultados son consistentes con una disminución del volumen interior hidrofóbico y un incremento del área superficial concomitantes al desplegamiento de la proteína. Actualmente se está intentando delimitar el/los sitio/s de reacción por fragmentación enzimática e identificación de los péptidos marcados. Se anticipa que el empleo de diazirina será útil no sólo para monitorear transiciones conformacionales, sino que también ayudará a caracterizar estructuralmente otros estados no-nativos (p. ej. glóbulo fundido) y áreas de contacto en proteínas oligoméricas.

Con subsidios de CONICET, UBACyT y ANPCyT.

102 - PURIFICACION DE UNA PROTEINA "TIPO-CALTRIN" DE PLASMA SEMINAL HUMANO (Purification of a "caltrin-like" protein from human seminal plasma). Franchi, A. y Coronel, C.E. Cátedras de Química Biológica, F.C.M y F.C.E.F y N., Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

En plasma seminal humano se detectaron, por SDS-PAGE y western blotting, dos proteínas de aproximadamente 34 y 15 kDa que reaccionan con anticuerpos contra caltrin II (calcium transport inhibitor) de la secreción de vesícula seminal de cobayo. La inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides de eyaculados reveló "binding" específico sobre la región acrosomal (Dematteis y col. Medicina BsAs 59:630, 1999). Esta especificidad fue previamente demostrada con caltrin I de cobayo, rata y ratón (Coronel y col. Mol Reprod Dev 33:74, 1992; Winnica y col. Biol Reprod 63:42, 2000). En esta comunicación se presenta un procedimiento para la purificación de la fracción inmunoreactiva de 15 kDa el cual involucra fraccionamiento salino con sulfato de amonio y cromatografía de exclusión en columnas de Sephadex G-50 (convencional) y Ultraspherogel Sec 2000 en HPLC. La proteína purificada se sometió a secuenciamiento. La secuencia de los primeros 35 residuos de aminoácidos presentó total homología con las de β -inhibin y PSP 94 (prostatic secretory protein 94), proteínas de 94 aminoácidos, y con el fragmento Ser₂₁-Asp₅₅ de la molécula precursora de β -MSP (β -microseminoprotein), aisladas del plasma seminal humano (Kamada y col. BBActa 1388:101, 1998). Estas tres proteínas poseen la misma cadena polipeptídica pero el papel funcional de PSP 94 y β -MSP aún no ha sido definido. También se comprobó homología parcial de estas secuencias con la de caltrin II de cobayo. Tanto la inmunoreactividad con anticuerpos anticaltrin como el "binding" específico a la región acrosomal de los espermatozoides sugieren que la proteína de 15 kDa purificada de plasma seminal humano podría ser una forma molecular de caltrin.

103 - "BUSQUEDA DE NUEVAS FITOPROTEASAS EN ESPECIES PATAGONICAS". (Screening of new plant proteases from Patagonian species). Sequeiros, C.^{1,2}, López, L.M.I.¹, Mattio, N.², Caffini, N.O.¹ y Natalucci, C.L.¹.
¹ LIPROVE, Fac. Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.
² CENPAT-CONICET, Pto. Madryn, Argentina.

Se estudió el látex de las siguientes especies: *Colliguaja integerrima* Gill. et Hook., *Euphorbia collina* Philippi, *Euphorbia peplus* L., *Stillingia patagonica* (Speg.) Pax et Hoffmann (*Euphorbiaceae*), *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Asclepiadaceae*) y *Grindelia chiloensis* (Corn.) Cabrera (*Asteraceae*). El látex se recogió sobre buffer Tris-HCl 0,1M de pH 7,5 conteniendo EDTA 5mM y se ultracentrifugó durante 60 min a 40.000g. Los extractos de *Philibertia gilliesii* y *Stillingia patagonica* mostraron elevada actividad caseinolítica, siendo ésta escasa en los de *Euphorbia collina* y no detectable en los demás extractos. El perfil proteico de cada extracto fue analizado por SDS-PAGE e IEF-zimograma. La especie más promisoría fue *Philibertia gilliesii*. El IEF-zimograma revela la presencia de 7 fracciones, de las cuales tres son proteolíticamente activas: dos de pI > 9,3 y una de pI = 9,2. El perfil de pH (buffers de Good 25mM) muestra máxima actividad caseinolítica en el rango de pH 7-8. La enzima retiene un 80% de la actividad máxima luego de 2 h a 45 °C, la actividad residual es del 50% luego de 30 min a 55 °C y se inactiva totalmente al cabo de 5 min a 75 °C. El extracto crudo resiste altas concentraciones salinas: retiene el 60% de la actividad inicial en NaCl 0,7 M y es inhibido en un 55% con E-64 y en un 12% con ácido iodoacético.

AGRADECIMIENTOS: a M. Quiroga, A. Beescow, N. Olivera y V. Mavrek, por su ayuda en la recolección e identificación de las especies estudiadas. C. Sequeiros es becaria de estudio y N. Caffini y C. Natalucci son miembros de la Carrera del Investigador de la CICPBA.

104- CARACTERIZACION DE ESTADOS PARCIALMENTE PLEGADOS DE IFABP POR PROTEOLISIS CONTROLADA Y ESPECTROMETRIA DE MASA (Characterization of non-native states of iFABP using partial proteolysis and LC-MS) Clérico, E.M.; Ermácora MR. Universidad Nacional de Quilmes eclerico@unq.edu.ar

Comprender las propiedades estructurales de los intermediarios de plegamiento es crucial para dilucidar el mecanismo y el código que media la formación del estado nativo de las proteínas. Para desestabilizar la forma nativa respecto de los intermediarios, se diseñó y se produjo una variante truncada de la iFABP en la cual se removieron tres residuos del extremo C-terminal. Estudios estructurales preliminares de esta variante indicaron que se trata de un estado parcialmente plegado, estable en solución acuosa. Una evidencia es la resistencia diferencial a proteólisis controlada de la variante truncada respecto de la proteína salvaje: como se comprobó por SDS-PAGE, existen condiciones en las cuales la proteína truncada es exquisitamente sensible a la tripsinólisis mientras que la proteína salvaje es resistente. En esas condiciones de digestión, se tomaron muestras a distintos tiempos de ambas variantes y cada una se inyectó en un sistema de HPLC acoplado a un espectrómetro de masa (LC-MS). Esto permitió separar e identificar todas las especies presentes a cada tiempo. Se realizó así un mapeo conformacional de las variantes y se identificaron los eventos tempranos de corte. Las zonas de la variante truncada que aparecen desorganizadas por este método corresponden a las zonas más móviles de la proteína nativa, como se observa por NMR.

105 - ESTABILIZANDO ESTADOS PARCIALMENTE PLEGADOS DE LA β -LACTAMASA DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* (Trapping partially folded states of *Bacillus licheniformis* β -lactamase) Santos J., Zaneck C., Gebhard L, Ermácora M.R. Universidad Nacional de Quilmes jsantos@unq.edu.ar

Si bien algunas veces es posible eliminar residuos de los extremos sin ocasionar consecuencias estructurales drásticas, en la mayor parte de los casos la truncación proteica conduce a estados parcialmente plegados en condiciones fisiológicas. Estos estados constituyen valiosos modelos para estudiar la reacción de plegamiento porque revelan etapas intermedias del proceso. En este trabajo se estudiaron dos variantes de la β -lactamasa madura truncadas en el extremo C-terminal, $\Delta 9$ ($\Delta 257-265$) y $\Delta 19$ ($\Delta 247-265$). Estas variantes fueron purificadas en condiciones desnaturalizantes y replegadas. Mediante técnicas de FPLC-SEC, espectroscopía UV de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular y proteólisis limitada se pudo establecer la presencia de un estado parcialmente plegado, con características de glóbulo fundido en ambos casos. Sin embargo una fracción de $\Delta 9$ (10%) pudo plegarse en una forma enzimáticamente activa y resistente a la proteólisis con las características espectroscópicas e hidrodinámicas de la proteína salvaje.

Nuestros resultados indican que el segmento 257-265 contiene información que es crucial para el mecanismo de plegamiento pero no es esencial para la estructura final. Esta distinción entre secuencias esenciales y no esenciales para la estructura final puede simplificar el abordaje del problema del plegamiento proteico al disminuir el número de conformaciones a considerar en la búsqueda termodinámica del estado nativo.

Apoyado por Fundación Antorchas, CONICET y UNQ

106 - EXPRESION Y PURIFICACION DE UNA FORMA TRUNCADA ACTIVA DE 58 kDa DE LA GLUTAMATO DECARBOXILASA HUMANA EN *E. COLI* (Expression and purification of an active truncated 58kDa form of human glutamic acid decarboxylase in *E. coli*) Antón E.[§], Maffía P.[§], Poskus E.[†], Valdez S. N.[†], Villanueva L.[†], Santos J.[§], Ermácora M. R.[§]
[§]Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes
[†]Cátedra de Inmunología Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IDEHU (CONICET-UBA) eanton@unq.edu.ar

Muchos pacientes con Diabetes Mellitus mediada por inmunidad (IMD) generan autoanticuerpos contra la isoforma 65 kDa de la glutamato decarboxilasa (GAD65). Se ha demostrado en animales modelo que la administración de GAD65 retrasa la enfermedad. Existe gran interés en producir este antígeno en gran cantidad y aplicarlo eventualmente en humanos. La GAD65 es una molécula compleja que se sintetiza con bajos rendimientos en eucariotes y no se expresa correctamente en procariotes. En anteriores trabajos conseguimos la expresión de GAD65 en *E. coli*, como una proteína de fusión con tioredoxina, para ser utilizada en la detección precoz de la IMD. Sin embargo, la presencia de epítopos bacterianos es inconveniente para su uso como tolerógeno. En el presente trabajo se expresó un fragmento C-terminal de GAD65 de 58 kDa. Este fragmento, a diferencia de la proteína intacta, es soluble y en él se localizan el sitio catalítico y el mapa casi completo de epítopos relacionados con la diabetes. La proteína truncada, purificada por cromatografía de afinidad, conservó sus propiedades enzimáticas (síntesis de GABA) y resultó inmunológicamente reactiva (western blot).

107 - "AISLAMIENTO Y PRODUCCION DE PROTEASAS DE LA CEPA HIDROCARBUROLITICA *VIBRIO HARVEYI* 80". (Isolation and protease production of the oil-degrading strain *Vibrio harveyi* 80) Olivera, N.¹ y Sequeiros, C.^{1,2} CENPAT-CONICET, Pto. Madryn, Argentina. ¹LIPROVE, Fac. Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Argentina. Patrocinador: Natalucci, C.L. Investigador de la CICPBA.

Los microorganismos de ambientes expuestos a condiciones altamente selectivas, como los que crecen en piletas de depósito de residuos hidrocarburos (Puerto Madryn, Chubut), pueden constituir una fuente de enzimas con nuevas propiedades. De este ambiente se aislaron y caracterizaron 18 cepas bacterianas. Cuatro cepas demostraron capacidad de licuar gelatina, sugiriendo producción de proteasas. Estos microorganismos se cultivaron en medios con caseína o gelatina, y se determinó la actividad caseinólítica en los sobrenadantes. La cepa que presentó mayor actividad en estas condiciones, *Vibrio harveyi* 80, fue seleccionada para analizar la producción de proteasas extracelulares y asociadas a las células, en distintos medios de cultivo (Luria Bertani -LB-, Casoy, Gelatina, y medio agua de mar e hidrocarburos). En este último caso, los pellets se incubaron en buffer 0,1 M Tris-HCl 1mM EDTA (pH 7,5), se centrifugó y se determinó actividad en la fase acuosa. El sobrenadante con mayor actividad caseinólítica (proteasas extracelulares), fue el obtenido en el medio LB, seguido por los medios gelatina e hidrocarburos. En los extractos provenientes de los pellets, la mayor actividad se registró en el medio con hidrocarburos, luego en los medios gelatina y Casoy. En estos extractos se observó una menor actividad específica, sugiriendo la presencia de proteínas no activas; por tal motivo se está optimizando el aislamiento y purificación parcial de estas fracciones. Sequeiros, C. Becaria de CICPBA

108 - ESTUDIOS DE DESPLEGAMIENTO DE LA GALECTINA-1 DE BAZO PORCINO. EFECTO PROTECTOR DEL LIGANDO ESPECIFICO. (Unfolding pathway of porcine spleen galectin-1. Protective effect of the specific ligand). Iglesias, M.M.*; Elola, M.T.*; Wolfenstein-Todel, C.* y Fink N.E.*. *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), UBA-CONICET, Fac. Farmacia y Bioquímica, Junín 956, Buenos Aires (1113), E-mail: miglesia@criba.edu.ar, *Depto. de Cs. Biológicas, Fac. Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Con el objeto de detectar los cambios conformacionales producidos en la galectina-1 de bazo porcino por interacción con sus ligandos específicos, se realizaron estudios de fluorescencia y de diroísmo circular, demostrando cambios en el entorno de los residuos aromáticos. Se determinaron las constantes de disociación (K_d) de los complejos formados por la galectina-1 con los siguientes disacáridos: tiodigalactósido, lactulosa y lactosa, $K_d = 0,086 \pm 0,01$, $0,204 \pm 0,02$ y $0,368 \pm 0,03$ mM, correspondientes a ($-\Delta G$) 23,2, 21,1 y 19,6 kJ/mol, respectivamente.

Para investigar la estabilidad conformacional de esta galectina-1, se realizaron estudios de desplegamiento en el equilibrio, utilizando cloruro de guanidinio como agente desnaturante, tanto en presencia como en ausencia de lactosa. El proceso de desnaturación se analizó por contenido de estructura secundaria e interacciones de residuos aromáticos, empleando diroísmo circular en el UV-lejano y fluorescencia intrínseca del triptófano, respectivamente.

En ausencia del azúcar se detectaron especies intermedias entre el estado nativo y el desnaturado, mientras que la formación del complejo lectina-hidrato de carbono aumentó significativamente la estabilidad conformacional de la proteína, y su desplegamiento se ajustó a un modelo de dos estados.

109 - LECTINAS DEL ALGA PATAGONICA *ENTEROMORPHA PROLIFERA*. ESTRUCTURA Y EFECTO SOBRE EL ESTALLIDO RESPIRATORIO DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATON. (Lectins from the patagonic algae *Enteromorpha prolifera*. Structure and effects on the murine intraperitoneal macrophages respiratory burst.) Ambrosio, A.¹, Calvete, J.J.², Fernández, M.L.¹, Sánchez E.I.³ y Wolfenstein-Todel C.¹, ¹IQUIFIB - UBA, Argentina. ³UNPSJB, Argentina. ²IBV - CSIC, España.

La capacidad de las lectinas de modular diversas actividades celulares ha llamado la atención de biólogos y de médicos y es por esto que las lectinas, especialmente las vegetales, se utilizan como herramientas en la investigación tanto básica como clínica. Dentro de las lectinas vegetales, las lectinas de algas han sido las menos estudiadas y, sin embargo, revisten especial interés ya que presentan características diferentes de las lectinas de plantas terrestres.

Purificamos mediante cromatografía de afinidad dos lectinas con afinidad por manano a partir del alga verde *Enteromorpha prolifera*. Estas lectinas poseen pesos moleculares de 20000 y 22000 estimados por SDS-PAGE y el estado de agregación de ambas, analizado por ultracentrifugación analítica, revela sistemas polidispersos con $M_{w,av}$ 59500 $\pm$ 3500 y 60000 $\pm$ 6000 respectivamente. Ambas lectinas poseen actividad hemaglutinante inhibible por manano y fucoidan y se trata de proteínas nunca antes descritas ya que sus secuencias aminoácídicas parciales no presentan similitud con la de ninguna proteína conocida. Además, presentan un efecto diferente al de las lectinas de plantas terrestres sobre la producción de radicales libres por leucocitos, inhiben en aproximadamente un 40% la producción de anión superóxido por macrófagos peritoneales de ratón estimulados con PMA.

110 - LECTINAS CON AFINIDAD POR LACTOSA Y FUCOSA DEL ALGA ROJA MARINA *Gigartina scotibergii*. PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL. (Lactose- and fucose-binding lectins from the red marine alga *Gigartina scotibergii*. Purification and partial characterization). Troncoso, M.F.*; Sánchez, E.I.* y Wolfenstein-Todel, C.*. *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB), UBA-CONICET, Fac. de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, Buenos Aires (1113). E-mail: fernanda@qb.ffyba.uba.ar *Fac. de Ciencias Naturales, UNPSJB, Comodoro Rivadavia, Argentina.

A partir de plantas terrestres y de animales se aislaron grandes cantidades de lectinas, cuyas características se explotaron en bioquímica y en biomedicina. Sin embargo, pocas lectinas se aislaron y caracterizaron en detalle a partir de algas marinas. Aquellas caracterizadas muestran frecuentemente propiedades diferentes de las de lectinas obtenidas a partir de otras fuentes. El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar parcialmente lectinas del alga roja *Gigartina scotibergii*, presente en el mar de Santra Cruz.

Dos lectinas se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de afinidad en columnas de lactosa-agarosa o fucosa-agarosa, respectivamente. Ambas lectinas resultaron capaces de aglutinar eritrocitos de conejo tratados con tripsina y glutaraldehído, en presencia de Ca^{2+} . Su especificidad se caracterizó mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación, utilizando varios monosacáridos y glicoproteínas. La hemaglutinación de la lectina con afinidad por lactosa se inhibió en presencia de lactosa y sus derivados, galactosa y fucoidan, mientras que la lectina con afinidad por fucosa se inhibió en presencia de D- y L-fucosa y fucoidan. Los pesos moleculares estimados por SDS-PAGE fueron de 19.000 y 62.000, respectivamente.

111 - LA REGION DE LA PMCA QUE UNE LIPIDOS ACIDOS ES ESENCIAL PARA LA EXPRESION DE UNA ENZIMA FUNCIONAL. (The acidic lipid-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump is essential for the expression of a functional enzyme). de Tezanos Pinto F, Adamo H.P. IQUIFIB-Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET), chiappe@ciudad.com.ar.

La PMCA (bomba de Ca^{2+} de membranas plasmáticas) es activada por lípidos ácidos tales como la fosfatidilserina y los fosfoinosítidos. Estudios previos han sugerido que estos lípidos interactúan con la región que se extiende entre los residuos 315-356. Con el objeto de estudiar este putativo dominio de unión de lípidos se obtuvieron por mutagénesis dirigida varios cDNAs que codifican hPMCA4 mutantes con deleciones secuenciales en esta región. Los proteínas mutantes se expresaron en células COS-1 en cantidad similar a la proteína salvaje con excepción de la mutante delecionada en los aminoácidos 346-356 que alcanzó un nivel de expresión ligeramente menor. La remoción de los aminoácidos 300-349 no afectó la capacidad de la enzima para transportar Ca^{2+} o formar fosfoenzima a partir de ATP. En contraste la deleción de los residuos 346-356 originó una PMCA inactiva. Estos resultados indican que parte de la región que ha sido involucrada en la unión de lípidos ácidos (aminoácidos 349-356) es esencial para la expresión de una enzima funcional y en consecuencia no cumple una función exclusivamente regulatoria. Con subsidios de UBA, CONICET y ANPCYT BID 802 OC-AR PICT 2033.

112 - "ACTIVIDAD PROTEOLITICA Y COAGULANTE DE PROTEASAS DE BROMELIA BALANSAE SOBRE PROTEINAS LACTEAS" (Proteolytic and clotting activity of proteases from *Bromelia balansae* on milk proteins). Pardo M.F.¹, Mercerat J.R., Fernández Tayeldín M., Fingerman M., Natalucci C.L.² y Caffini N.O.². LIPROVE, Fac. Cs. Exactas, UNLP, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: mfpardo@biol.unlp.edu.ar

Preparaciones parcialmente purificadas de frutos inmaduros de *Bromelia balansae* mostraron actividad proteolítica y coagulante (10-20 Ucas y 30-40 Ucoag/g fruto respectivamente) a pH alcalino y una buena estabilidad térmica, condiciones que favorecen su uso en la modificación de proteínas alimentarias. La principal cisteína proteasa presente en los extractos (PM: 24,4 kDa, pI: 5,5) fue purificada por intercambio aniónico (DEAE). Para mejorar las propiedades funcionales en proteínas lácteas se realizaron hidrólisis controladas (45°C, pH 8-10). Se trabajó con leche descremada reconstituida (10% p/v), aislándose las caseínas de las proteínas del suero por precipitación isoelectrica (pH 4,2). Los hidrolizados fueron sometidos a electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (10-16 % T, 3 % C) analizando los perfiles electroforéticos por densitografía. Al emplear caseína como sustrato se obtuvieron patrones de proteólisis característicos en sus principales fracciones componentes (α_1 , α_2 y β). El patrón de péptidos a los 2 minutos indicó degradación parcial de las bandas α_2 y β , pero no de α_1 . En la fracción sérica se degradó el 50% de α -lactalbúmina y β -lactoglobulina (10 minutos de hidrólisis). La solubilidad de los hidrolizados respecto al sustrato original se determinó por el método de Bradford.

¹ Becario Perfeccionamiento CICPBA

² Carrera del Investigador CICPBA.

113 - CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS RECOMBINANTES EgFABP1 Y EgFABP2 DE *Echinococcus granulosus*. (Characterization of recombinant proteins EgFABP1 and EgFABP2 from *Echinococcus granulosus*). Alvite, G.; Esteves, A.; Di Pietro, SM.*; Santome, JA.* y Ehrlich, R. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo Uruguay. *IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina.

Este proyecto ha sido financiado por CONICYT, PEDECIBA y Facultad de Ciencias de Montevideo, Uruguay.

Nuestro trabajo se ha centrado en la búsqueda de genes de expresión diferencial implicados en el desarrollo de la larva metacestode del Platelminto parásito *Echinococcus granulosus*, agente causante de la hidatidosis, apuntando al control del parásito mediante el bloqueo de genes claves.

Hemos caracterizado dos genes que codifican para las proteínas EgFABP1 y EgFABP2 pertenecientes a la familia de las FABPs, proteínas que en otros platelmintos parásitos han demostrado tener un papel inmunoprotector. Ambos genes fueron amplificados mediante RT-PCR, y clonados en el vector de expresión pET-5a, en *E. coli* BL21. La proteína EgFABP1 fue purificada por cromatografía de F.M. e I.L., con un rendimiento de 10.6 mg/lit. de cultivo. La proteína EgFABP2 fue purificada por técnicas similares, realizándose un tratamiento de solubilización con urea. La producción de las proteínas recombinantes nos ha permitido iniciar la caracterización de la cinética de unión a ácidos grasos (determinación del número de sitios, de constantes de disociación y de preferencia por diferentes ligandos). Ambas proteínas fueron analizadas en geles bidimensionales.

Destacamos finalmente, que estos parásitos son incapaces de sintetizar de novo sus propios ácidos grasos, por lo que ambos genes pueden estar involucrados en la internalización y transporte intracelular de ácidos grasos provenientes del huésped.

Nos planteamos en breve realizar estudios estructurales mediante cristalografía de rayos X, y dicroísmo circular.

114 - ESTRATEGIA PARA MEJORAR LA INMUNOGENICIDAD DE CARBOHIDRATOS: MODIFICACION TERMINAL APOLAR AUMENTA LA RESPUESTA INMUNE AL DISACARIDO DE THOMSEN-FRIEDENREICH ADYACENTE (Strategy for improving carbohydrate immunogenicity: Terminal nonpolar modification enhances immune response to adjacent Thomsen-Friedenreich disaccharide). Irazoqui E.J., Lopez PHH, Nores GA. CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Argentina.

La expresión de O-glicosilaciones incompletas es frecuente en la superficie celular de tumores epiteliales. El disacárido de Thomsen-Friedenreich (TFD), core I de O-glicanos, tiene una demostrada relación con malignidad. Como una estrategia alternativa para mejorar la inmunogenicidad de carbohidratos, se estudió la influencia de residuos terminales como bencilo (Bzl) o p-nitrofenilo (pNP) sobre la inmunogenicidad del TFD adyacente. Ratones inmunizados con TFD-KLH, BzlαTFD-KLH o pNPαTFD-KLH producen anticuerpos anti-KLH que fueron analizados por ELISA. TFD-KLH no generó anticuerpos anti-TFD, confirmando la pobre inmunogenicidad del disacárido. Inmunizaciones con BzlαTFD-KLH y pNPαTFD-KLH produjeron incremento en los títulos de anticuerpos anti-BzlαTFD y anti-pNPαTFD, respectivamente. BzlαTFD-KLH generó anticuerpos anti-TFD que no se apreciaron con pNPαTFD-KLH, indicando que el residuo bencilo terminal mejora la respuesta inmune al carbohidrato adyacente. Ensayos de ELISA competitivos de anticuerpos IgG anti-BzlαTFD y anti-pNPαTFD demostraron alta especificidad por sus respectivos antígenos. Anti-pNPαTFD no fue inhibido por TFD, a diferencia de pNPαGalNAc que lo hizo significativamente. El hecho que p-nitrofenol mostró mayor capacidad inhibitoria que GalNAc indica que el principal target antígeno es el residuo terminal polar. En oposición, anticuerpos anti-BzlαTFD fueron similarmente inhibidos por BzlαGalNAc y TFD, confirmando que anticuerpos generados por residuos terminales apolares reconocen al carbohidrato adyacente.

115 - CORRELACION ENTRE LA ESPECIFICIDAD DE DIFERENTES PROTEINAS QUE RECONOCEN EL DISACARIDO DE THOMSEN-FRIEDENREICH CON SU EFECTO EN LA PROLIFERACION DE CELULAS TUMORALES (Correlative fine specificity of several Thomsen-Friedenreich disaccharide-binding proteins with effect on tumor cell proliferation) Irazoqui FJ, Jansson B, Lopez PHH, Noreas GA. CIQUIBIC-CONICET, Dpto Qca Biológica, Fac Cs Químicas, UNC, Argentina. BiolInvent International AB, Lund, Sweden.

Células de tumores epiteliales muestran incrementada expresión de mucinas con *O*-glicosilaciones incompletas, como core I (Gal β 1-3GalNAc α) llamado disacárido de Thomsen-Friedenreich (TFD), antígeno glucídico con una demostrada relación con malignidad. El presente trabajo muestra la especificidad de unión a carbohidrato de proteínas que reconocen TFD en comparación con su efecto en la proliferación de células tumorales. Ensayos competitivos contra asialoglicoforina mostraron que la interacción de la lectina de *Agaricus bisporus* (ABL) y el anticuerpo humano monoclonal (mAb) anti-TFD TF1 fueron inhibidos solo por TFD y sus α -derivados. La aglutinina de maní (PNA) y los mAbs anti-TFD TF2 y TF5 también fueron inhibidos por otros carbohidratos como Gal β 1-3GlcNAc, Gal β 1-4Glc, y (Me α 6 β)Gal, indicando un menor reconocimiento de la posición axial del hidroxilo C4 de GalNAc de TFD y una mayor relevancia del Gal terminal en estas últimas tres proteínas. Ensayos de interacción directa con glicolípidos mostraron la unión de ABL a α -anómeros de TFD, mientras que PNA reconoce principalmente terminales TFD β -unidos. Los tres mAbs estudiados reconocieron N5b (β -TFD) y solo TF2 a N6 (α -TFD). Estos hallazgos indican que proteínas que estimulan la proliferación de líneas celulares de tumores epiteliales reconocen principalmente la región β -Gal terminal de TFD β -unidos, mientras que ABL, la cual inhibe la proliferación de esas células tumorales, reconoce principalmente a GalNAc subterminal del TFD α -anómico.

116 - PREDICCIONES ESTRUCTURALES DE NDH-2 DE E. COLI (Structural predictions of *E. coli* NDH-2). Rapisarda V.¹, Chelín R.¹, Massa E.¹ y De Las Rivas J.². ¹INSIBIO (CONICET-UNT)-Chacabuco 461-(4000) Tucumán, Argentina - E. mail: rosana@unt.edu.ar. ²IRNA (CSIC)- España - E mail: jrivras@gugu.usal.es

NADH deshidrogenasa-2 (NDH-2) es una flavoproteína de la cadena respiratoria de *E. coli*, constituida por una única cadena polipeptídica de 443 aminoácidos codificada por el gen *ndh*. Esta enzima tiene actividad NADH:Cu (II)-oxidoreductasa en presencia de FAD o quinona. La estructura tridimensional de la proteína no ha sido aún resuelta. Mediante alineamientos multiseuencia se identificaron regiones altamente conservadas en NDH-2 de procariotas, achaeas y eucariotas inferiores que permitieron la predicción de: i) estructura secundaria, ii) accesibilidad al disolvente y iii) topología de NDH-2 de *E. coli*. En la región N-terminal, la proteína presenta dos regiones homólogas entre sí (dominios I y II) que permiten inferir que provienen de la duplicación de un gen ancestral común. El dominio I contiene el motivo de unión al FAD y el dominio II el motivo de unión a NADH. En el extremo C terminal (dominio IV) se identificaron dos hélices que representarían el sitio de anclaje de la proteína a la membrana plasmática. La región comprendida entre el dominio II y IV (dominio III) contiene tres de las cuatro Cys de la molécula, de las cuales Cys₃₁₅ está localizada en una región altamente conservada con nitrato reductasas y mercurio reductasas, lo que permite deducir que sería la región involucrada en la reacción redox-activa. Se aplicaron métodos de reconocimiento de plegamiento para obtener un modelo bidimensional de la proteína y se encontró homología remota de NDH-2 con proteínas resueltas tridimensionalmente lo que permitió la modelización de los dominios I y II usando el servidor Swiss Model. Las predicciones estructurales muestran correlación con datos experimentales reportados por nuestro laboratorio.

117 - POLISACARIDOS DEL ALGA PARDA SCYTOSIPHONLOMENTARIA. (Polysaccharides of brown seaweed *Scytosiphon lomentaria*). Uhrich, A.¹; Flores, M.¹; Ponce, N.²; Stortz, C.². ¹Farmacognosia, FCN, UNPSJB, Km 4, 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut; ²Qca. Orgánica, FCEN, UBA, C.Universitaria, 1428, Buenos Aires, Argentina.

Muchas algas pardas han sido estudiadas por contener polisacáridos de importancia industrial.

Para su estudio, los polisacáridos de *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae) fueron extraídos secuencialmente con soluciones acuosas de etanol 80 %, cloruro de calcio 2 % (en ambos casos a temperatura ambiente y a 70 °C), ácido clorhídrico diluido y carbonato de sodio 3 %.

Los extractos alcohólicos presentaron rendimientos del 16 y 18 %, y bajo contenido de carbohidratos (3 %) siendo el manitol el principal componente. Al progresar las extracciones aumentó el contenido de azúcares en los productos, aunque nunca superó el 29 %. Las proteínas fueron mayoritarias en el extracto de cloruro de calcio en caliente, mientras que los ácidos urónicos predominaron obviamente en el de carbonato de sodio. El sulfato predominó en los extractos de cloruro de calcio.

Los principales monosacáridos componentes fueron glucosa y fucosa especialmente en los extractos de cloruro de calcio y ácido clorhídrico, sugiriendo la presencia de fucoidanos y laminaranos en el sistema de polisacáridos.

Los análisis de citotoxicidad (Test de *Artemia salina*) evidenciaron una potente actividad en los extractos de ácido clorhídrico y carbonato de sodio.

Estos estudios continúan para profundizar el conocimiento de los sistemas de polisacáridos de esta especie que podrían representar productos como puntos de partida para nuevas aplicaciones industriales.

118 - ESTUDIO DE LOS POLISACARIDOS DE ADENOCYSTIS UTRICULARIS: METODOS EXTRACTIVOS. (Study of the polysaccharides from *Adenocystis utricularis*: extraction procedures). Ponce, N.¹; Stortz, C.¹; Flores, M.²; Rodríguez, M.³. ¹Qca. Orgánica y ³Cs. Biológicas, FCEN, UBA, C. Univ., 1428, Buenos Aires; ²Farmacognosia, FCN, UNPSJB, Km4, 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Se estudiaron los polisacáridos de esta especie, obtenidos mediante diferentes secuencias extractivas. Los solventes utilizados fueron etanol al 80 % seguido de agua o HCl (a temperatura ambiente y a 70 °C en todos los casos).

Se obtuvo gran rendimiento al extraer con alcohol en frío (49 %). Los productos extraídos con HCl mostraron mayor contenido de carbohidratos que aquellos obtenidos con agua. El extracto acuoso en caliente presentó el mayor porcentaje de proteínas (23 %), y su equivalente en frío el más alto de sulfato (50 %). Los ácidos urónicos predominaron en el de HCl en caliente (12 %).

Mediante CGL se determinó que los extractos alcohólicos son ricos en manitol. Además se evidenció la presencia de fucoidanos, pero no la de laminaranos en los demás productos. Los estudios sobre SDS-PAGE mostraron que los pesos moleculares de los principales polisacáridos unidos a proteínas oscilaron entre 10 y 56 kDa.

Los estudios histoquímicos con Calcofluor white permitieron identificar la presencia de componentes de tipo fibrilar en las paredes celulares, y la tinción con PAS, mostró gran coloración hacia la corteza, y menor hacia la médula.

Estos estudios contribuyen al conocimiento del potencial concentrado en nuestras algas, en relación con un futuro desarrollo industrial.

119 - CLONADO Y SECUENCIACION DEL AG5 DEL VENENO DE *POLYBIA SCUTELLARIS*. (cDNA cloning and microsequencing of Ag5 from *Polybia scutellaris* venom). Pirpignani, M.L.; ¹Hellman, U.; ¹King, T.P.; ¹Biscoglio de Jiménez Bonino, M. ¹IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. ¹Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Suecia. ²Rockefeller University, NYC, USA.

Polybia scutellaris es una avispa sudamericana que habita principalmente en Argentina y Uruguay; no se han descripto casos de hipersensibilidad a su picadura. El veneno de *P. scutellaris* contiene Antígeno 5 (Ag5), principal alérgeno en todos los venenos de avispa previamente descriptos. Con el objeto de caracterizar este nuevo miembro de la familia de Ag5, se determinó su estructura primaria completa, utilizando tanto el método de Edman como espectrometría de masa.

Por otro lado, y con el fin de obtener la cantidad de proteína necesaria para la determinación de su estructura espacial, se encaró el clonado de la misma. A partir del RNA total proveniente de los sacos de veneno del insecto se sintetizó cDNA. Utilizando la estrategia denominada RACE, se amplificó el cDNA que codifica para el Ag5. El producto de la PCR se purificó y se clonó en un vector adecuado para su secuenciación. El estudio estructural de este nuevo Ag5 pretende brindar información útil para el diseño de péptidos que modulen la respuesta alérgica frente a la picadura de estos insectos.

120 - PROTEASAS OBTENIDAS DE LATEX DE ASCLEPIADACEAE. (Proteases obtained from latex of *Asclepiadaceae*). Vairo Cavalli, S.¹, Conforti, P.², Obregón, W., Morcelle del Valle, S.¹, Liggieri, C., Arribére, M.³, Priolo, N., Caffini, N.⁴ LIPROVE, Fac. de Cs. Exactas, UNLP, Argentina. svairo@biol.unlp.edu.ar ¹Becarias CONICET, ²Becaria CIC, ³Profesional Asistente CIC, ⁴Investigador Independiente CIC

Araujia h I, II y III; morrenaina b I y II y morrenaina o II, proteasas purificadas del látex de *Araujia hortorum* Fourn., *Morrenia brachystephana* Griseb. y *Morrenia odorata* Hook et Arn. (Lindley) respectivamente, fueron parcialmente caracterizadas.

Todas las enzimas poseen puntos isoelectrónicos alcalinos y pesos moleculares comprendidos entre 24,0 y 29,2 kDa. La actividad caseinólítica es máxima a pH básico y es inhibida por E-64, HgCl₂ y PMSF. Utilizando N-CBZ-p-nitrofenil ésteres de distintos aminoácidos como sustratos, *morrenaina b I y II* muestran mayor preferencia por el derivado de Asp, *morrenaina o II* por el derivado de Ala y *araujaínas h I, II y III* por el derivado de Gln.

Los residuos N-terminales muestran alta homología entre sí, 80% entre *araujaína h II y III*, 75% entre *morrenaina b I y II*, 85% entre *araujaína h II y morrenaina b I*, 99% entre *araujaína h III y morrenaina b II* y 95% entre *morrenaina b II y morrenaina o II*. En el caso de *araujaína h I* se secuenció un péptido interno. Comparando las identidades con papaína, una proteasa cisteínica típica, se observan los siguientes resultados: *morrenaina b I* posee una identidad del 55%; *morrenaina b II y o II* del 60%; *araujaína h II*, del 55%; *araujaína h III*, del 64%.

121 - INCORPORACION POSTRADUCCION DE ARGININA SOBRE LA PROTEINA N-STOP. (post-translational incorporation of arginine into N-STOP protein). Galiano M., Fissolo S., Barra H. S y Hallak M. CIQUIBIC- Dpto Química Biológica. Facultad Ciencias Químicas UNC Córdoba Argentina. mhallak@dqbfq.unc.edu.ar Subsidiado por: SECyT-UNC, CONICOR- FONCYT- CONICET.

La modificación postraduccion de proteínas mediante la unión covalente de arginina en el terminal amino se lleva a cabo sobre varias proteínas de cerebro de rata. El único sustrato identificado de esta reacción en cerebro de rata es la proteína asociada a microtúbulos denominada N-STOP que se comporta, en geles de poliacrilamida, como una proteína de peso molecular de 125kDa. Aparentemente, la incorporación postraduccion de arginina ocurre sobre una molécula que ya ha sufrido otra modificación postraduccion. En células CHO-K1 transfectadas con el cDNA, aislado de cerebro de rata, que codifica a la proteína N-STOP encontramos que expresan una proteína de 100kDa, peso molecular que coincide con el calculado de la secuencia del cDNA y es reconocida por el anticuerpo monoclonal anti N-STOP. Esta proteína no está presente en células controles. Las células transfectadas también contienen, aunque en mucho menor proporción, la proteína de 125kDa que suponemos deriva de una modificación postraduccion de la proteína de 100kDa. Los extractos solubles de estas células transfectadas tienen la capacidad de incorporar, mediante reacción postraduccion, Arg¹⁴C sobre la proteína de 100kDa. En cerebro de rata habría una activa conversión de la proteína de 100kDa a 125kDa, dado que solo se encuentra esta última. De acuerdo a los resultados obtenidos en células transfectadas, esta conversión no sería necesaria para la incorporación postraduccion de arginina en esta proteína.

122 - PARTICIPACION DE FOSFATASAS EN LA REGULACION DE LA ASOCIACION DE TUBULINA CARBOXIPEPTIDASA CON MICROTUBULOS (Participation of phosphatases in the regulation of the association of tubulin carboxypeptidase with microtubules). Contín, M. A.; Barra, H.S. y Arce, C.A. CIQUIBIC (Conicet). Depto. Química Biológica, Fac. Ciencias Químicas, UNCba. E-mail: caecra@dqbfq.fcq.unc.edu.ar

La subunidad α de tubulina es biosintetizada con tirosina en el C-terminal (tub-Tir). *Tubulina carboxipeptidasa* remueve esa tirosina dejando expuesto un ácido glutámico (tub-Glu). *Tubulina tirosina ligasa*, reincorpora una tirosina en esa posición. Esto se conoce como el ciclo de tirosinación/detirosinación de la tubulina. Dependiendo del tipo de célula o del estado funcional, predominan microtúbulos con mayor o menor contenido en tub-Glu o tub-Tir. Las bases moleculares de la regulación del estado de tirosinación no se conocen. Anteriormente mostramos que en extractos solubles y en células cultivadas la actividad carboxipeptidasa puede asociarse con microtúbulos. Se mostró que, in vitro, esta asociación es regulada por eventos de fosforilación/defosforilación. Usando cultivos de células COS, aquí demostramos que la asociación de la enzima disminuye significativamente cuando las células son incubadas (1 h) en presencia del inhibidor de fosfatasa ácido okadaico (OA). La estabilización de los microtúbulos por adición de taxol (10 μ M) no modificó el efecto del OA. La adición de OA directamente sobre citoesqueletos aislados (que contienen microtúbulos con enzima asociada) no produjo la disociación de la actividad carboxipeptidasa ni la inhibición de la enzima. Es decir, factores citosólicos eliminados durante el aislamiento de los citoesqueletos son requeridos para lograr la disociación de la enzima. Estos resultados indican que proteínas-fosfatasa tipo PP2A y/o PP1 (y supuestamente alguna kinasa) están involucradas en la regulación de la asociación de la carboxipeptidasa con los microtúbulos.

123 - INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA Na,K-ATPASA POR TUBULINA. (Inhibition of the Na,K-ATPase activity by tubulin). Casale C. H. y Barra H. S. CIQUIBIC, Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba. E-mail: hbarra@dqbfq.uncor.edu.ar

La tubulina de membranas de cerebro, que se aísla como un compuesto hidrofóbico, está asociada a la Na,K-ATPasa (Alonso y otros, Biochem. Biophys. Res. Comm. 253, 824-827, 1998). Esta tubulina es rica en la isoforma acetilada y cuando está disociada de la ATPasa se comporta como un compuesto hidrofílico. Recientemente, mediante el empleo de membranas de cerebro de rata, demostramos que la actividad enzimática de la Na,K-ATPasa es inhibida mediante el agregado de tubulina y que la magnitud de la inhibición es proporcional a la cantidad de tubulina acetilada presente en la preparación de la tubulina utilizada y a la cantidad de complejo tubulina-ATPasa formado. La asociación de tubulina con Na,K-ATPasa fue también estudiada en células COS en cultivo. Se determinó el grado de asociación tubulina-ATPasa en presencia de diferentes efectores que afectan la actividad de la ATPasa. Se encontró que: a) el ácido glutámico, agregado al sistema de cultivo, es capaz de reducir en un 50% el grado de asociación entre tubulina y ATPasa y b) la caída de la formación del complejo tubulina-ATPasa por ácido glutámico es restituida mediante el agregado de glucosa al medio de cultivo. Estos resultados sugieren que la tubulina podría participar en la regulación de la actividad Na,K-ATPasa como transportador iónico.

124 - PROPIEDADES IN VITRO DE TUBULINAS MODIFICADAS POR SUSTITUCION DE LA TIROSINA C-TERMINAL DE LA SUBUNIDAD A POR ANALOGOS (In vitro properties of tubulins modified by substitution of the α -tubulin C-terminal tyrosine by analogues). Bisig, C.G., Contín, M.A., Barra, H.S. y Arce, C.A. CIQUIBIC (Conicet). Depto. Química Biológica, Fac. Ciencias Químicas, UNCba. E-mail: caerca@dqbfq.fcq.unc.edu.ar

El COOH-terminal de α -tubulina está sometido a un ciclo de tirosinación/detirosinación por acción de *tubulina tirosina ligasa* (incorporación) y *tubulina carboxipeptidasa* (remoción). El rol fisiológico de este ciclo es desconocido. Intentamos obtener tubulinas que en lugar de tirosina en el C-terminal tengan un análogo de ésta. Esperamos que esta sustitución altere el comportamiento de la tubulina en cuanto a su aptitud para polimerizar y/o su habilidad como sustrato ante la tubulina carboxipeptidasa. Estas tubulinas modificadas podrían ser inyectadas en células para estudiar eventuales alteraciones en la fisiología celular (organización microtubular, morfología, división celular, etc) que permitan sacar conclusiones respecto al rol que cumple el ciclo de tirosinación/detirosinación.

L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) y 3-nitrotirosina (NO_2Tyr) fueron incorporadas en tubulina en extractos solubles de cerebro. Se verificó que tanto NO_2Tyr como dopa fueron realmente unidos a tubulina. Dopa no pudo ser removida de tubulina-dopa por acción de tubulina carboxipeptidasa en condiciones en que Tyr es removida rápidamente. Carboxipeptidasa A pancreática si liberó rápidamente la dopa. Por el contrario, NO_2Tyr solo pudo ser removida lenta y parcialmente por ambas enzimas. Tubulina-dopa pudo formar microtúbulos in vitro mientras que tubulina- NO_2Tyr solo fue parcialmente apta. Resumiendo, ambos análogos se incorporan en tubulina y cambian las propiedades con respecto a tubulina tirosinada normal y podrían ser usados para interferir el ciclo de tirosinación/detirosinación. También se generaron anticuerpos específicos contra las tubulinas modificadas.

LIPIDOS

125 - ACIDOS GRASOS POLINOSATURADOS DE ORIGEN MARINO (N-3): ACCION SOBRE LA RESISTENCIA INSULINICA (RI) EN UN MODELO DE DISLIPEMIA NUTRICIONAL. (N-3 fatty acids: Effect on the insulin resistance (IR) in a nutritional model of dyslipemia). Chicco A., D'Alessandro M.E., Fortino A., Giangrossi G., Lombardo Y.B. Dpto. de Cs. Biológicas. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria Paraje El Pozo (3000) Santa Fe. Argentina.

Desde hace algunos años ha cobrado importancia la incorporación de ácidos grasos polinosaturados (n-3) en la dieta dado que los mismos pueden mejorar o prevenir situaciones patológicas tales como dislipemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión, etc. En este trabajo investigamos el efecto de la sustitución de aceite de maíz (AM) por aceite de hígado de bacalao (AHB: rico en ácidos grasos n-3) en el modelo de hipertrigliceridemia y RI global inducido por una dieta rica en sacarosa (DRS). Ratas alimentadas durante 90 días con DRS (% p/p: sacarosa 63, AM 8, proteínas 17) fueron divididas en 2 grupos: a) DRS continuó con la misma dieta y b) DRS+AHB (% p/p: AHB 7 + AM 1) hasta los 120 días de ingesta. El lote control recibió durante todo el período una dieta equivalente a la DRS donde la sacarosa fue sustituida por almidón. Se analizó en todos los lotes en estado basal y posterior a una clamp euglicémica hiperinsulinémica: Plasma: triglicéridos (Tg), ácidos grasos libres (AGNE), glucosa, insulina; Músculo *Gastronemio*: Tg, glucógeno, glucosa-6-fosfato (G6P), actividades glucógeno sintasa (Gs), piruvato dehidrogenasa (PDH) y PDH quinasa. Los resultados en el lote DRS+AHB vs DRS muestran: Estado basal: disminución significativa de Tg, glucosa, AGNE plasmáticos y en músculo disminución de Tg y PDHquinasa con un aumento en el % de PDHa. Al final de la clamp: el músculo muestra aumento del contenido de glucógeno, G6P y actividad Gs y del % de PDHa con disminución de PDHquinasa. Esto sugiere un rol de los ácidos grasos en el manejo de las dislipemias y RI.

126 - LIPIDOS Y RESISTENCIA INSULINICA (RI): ROL DEL MUSCULO ESQUELETICO EN LA RI EN UN MODELO DE DISLIPEMIA EXPERIMENTAL. (Lipids and insulin resistance (IR): Contribution of the skeletal muscle to the IR in an experimental model of dyslipidemia). Chicco A., D'Alessandro M.E., Lombardo Y.B. Dpto. de Cs. Biológicas. Facultad Bioquímica y Cs. Biológicas. UNLitoral. Ciudad Universitaria Paraje El Pozo (3000) Santa Fe. Argentina.

La incrementada demanda insulínica por parte de los tejidos periféricos (IR) parece ser un defecto temprano común de distintos desórdenes metabólicos entre los que se incluyen la hiperlipemia, obesidad, diabetes mellitus Tipo II, intolerancia a la glucosa, etc. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la contribución del músculo esquelético en la evolución de la IRI, desde normoglucemia e hiperlipemia (período de inducción: PI) a la hiperglucemia moderada y normoinsulinemia (período de recurrencia: PR) en un modelo de dislipemia nutricional inducida en ratas normales alimentadas crónicamente con una dieta rica en sacarosa (DRS). Las ratas fueron alimentadas durante 180 días con DRS (% p/p: sacarosa 63, aceite de maíz 8, proteínas 17) o con una dieta control (DC) donde la sacarosa fue sustituida por almidón. Al cabo de 22 (PI), 90 (PR temprano) o 180 (PR tardío) días de dieta, los animales de cada lote fueron sacrificados en el estado basal o al finalizar la clamp euglicémica-hiperinsulinémica. Se determinó a nivel de tejido muscular el contenido de triglicéridos (Tg), glucógeno, glucosa-6-P y actividades enzimáticas Glucógeno sintasa y Piruvato Dehidrogenasa (PDH). Los resultados muestran: 1) Estado basal: incremento del contenido de Tg plasmáticos en los tres períodos, mayor contenido de Tg musculares asociado a menor actividad PDH en el PR (temprano y tardío), 2) Frente al estímulo de la insulina (clamp): alterada actividad glucógeno sintasa en el PR y disminuida acción periférica de la insulina en todos los períodos en los animales alimentados con DRS. Esto contribuye a la alterada utilización de la glucosa en el músculo esquelético y a la RI global.

127 - CARACTERIZACION BIOFISICA DE LIPIDOS CON ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE MUY LARGA CADENA DE MEMBRANAS FOTORRECEPTORAS. (Biophysical characterization of photoreceptor membrane lipids containing very long chain polyunsaturated fatty acids). Antollini, S. y Avelaño, M. INIBIB, Universidad del Sur - COINICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

Estudios previos demostraron que los fosfolípidos de las membranas fotorreceptoras de la retina bovina, principalmente fosfatidilcolina (PC), contienen ácidos grasos poliinsaturados de muy largas cadenas (hasta C_{36}) (AGPMLC). Se resolvieron estas PC en tres grupos de especies moleculares, uno pequeño formado por PCs disaturadas, uno mayoritario intermedio formado principalmente por PCs con 22:6n-3 en sn-2, y uno que contenía las PCs dipoliinsaturadas, ricas en AGPMLC. Se realizaron estudios de espectroscopía de fluorescencia utilizando la sonda laurdan. Se obtuvo la temperatura de transición (T_g) de PC total como así de sus fracciones, mostrando diferencias consistentes con las composiciones en ácidos grasos. Además se determinó el cambio inducido a la T_g de sistemas modelo (DMPC o DPPC) al agregar 50% de las PCs de retina, confirmando la tendencia observada con las PCs puras. A partir de los segmentos externos de la retina se obtuvieron discos de membranas fotorreceptoras altamente enriquecidos en rodopsina. Utilizando transferencia de energía resonante (FRET) desde la proteína (triptofanos) al laurdan, se fotoseleccionaron las moléculas de laurdan en la vecindad de la proteína. Se trabajó con discos en oscuridad (rodopsina activa) e iluminados (rodopsina blanqueada). Los valores de PG fueron menores en el primer caso que en el segundo, demostrando un microentorno más fluido en el caso de la rodopsina activa.

128 - "PRESENCIA EN PAPILA RENAL DE UN POOL DE CERAMIDA ENRIQUECIDO EN ACIDO ARAQUIDONICO QUE SE ENCUENTRA REGULADO DURANTE EL DESARROLLO" ("Existence in rat renal papilla of an arachidonic acid-enriched ceramide pool which is developmentally regulated") Facchinetti M.M., Beuret C., Slemenson A., Favale N. y Sterin-Speziale N. Biología Celular e Histología, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIFIB-CONICET.

La mayoría de los trabajos de investigación que estudian esfingolípidos se centran en el rol de los mismos en las vías de transducción de señales pero hay poca información en cuanto a la composición en ácidos grasos y los efectos funcionales de estas diferentes especies moleculares.

En este trabajo estudiamos la composición en ácidos grasos de la ceramida y la esfingomielina en papila renal de rata en dos estadios del desarrollo. Encontramos importantes diferencias en la composición de ácidos grasos de la ceramida entre ambos estadios. Observamos un aumento en la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en papila de rata adulta junto con una disminución de los ácidos grasos saturados. El ácido araquidónico se encontró en una alta proporción. Encontramos poca cantidad de este ácido graso en SM. Posteriormente estudiamos la incorporación de [^{14}C] ácido araquidónico a la misma y observamos una activa incorporación a ceramida en ambos estadios. Este pool de ceramida se encontraba distribuido preferentemente en citosol en animales adultos y en membrana plasmática y en retículo endoplásmico en animales en desarrollo. Por lo tanto, este pool de ceramida altamente insaturado se encuentra regulado durante el desarrollo renal y podría afectar la señalización transmembrana o ser fuente de ácido araquidónico.

129 - VARIACIONES DEL PERFIL LIPIDICO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRONICA EN HEMODIALISIS, TRATADOS CON ACIDO FOLICO O PIRIDOXINA. (Lipid variation pattern in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis, treated with folic acid or pyridoxine). Gómez Dummm N.T. de, Touceda L. y Giammona A.M. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) y Laboratorio de Trasplante de Organos (LTO), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Argentina.

Existe una correlación positiva entre la hiperhomocisteinemia y las enfermedades vasculares. En la insuficiencia renal crónica se observa una hiperhomocisteinemia que se reduce con tratamiento con ácido fólico y vitaminas B_6 y B_{12} . En el presente trabajo se estudió el perfil lipídico plasmático y de membranas de eritrocitos en pacientes con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis, tratados con ácido fólico o piridoxina durante 60 días. Ambas vitaminas redujeron los niveles de homocisteína. En el plasma de los pacientes tratados, se observó un aumento del colesterol total y en las LDL, y una disminución en las HDL. El ácido fólico incrementó la distribución porcentual de la mayoría de los ácidos grasos polinsaturados. La vitamina B_6 no provocó cambios significativos en el perfil de ácidos grasos. En las membranas de eritrocitos de los pacientes tratados con ambas vitaminas se observó un aumento del colesterol, los triglicéridos y los ácidos grasos libres y una disminución del contenido de fosfolípidos, así como un aumento de la movilidad rotacional del difenilhexatrieno. Se concluye que, desde el punto de vista lipídico, el tratamiento con ácido fólico o piridoxina aumentaría el riesgo de complicaciones vasculares.

130 - REGULACION DE LA ENZIMA $\Delta 6$ DESATURASA HEPATICA EN LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL. (Regulation of the enzyme $\Delta 6$ desaturase in experimental diabetes mellitus). Rimoldi, O.J.; Finarelli, G.S.; Bagnato, C. y Brenner, R.R. INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata) CONICET-UNLP. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, 60 y 120, La Plata. Argentina. Fax (221)-425-8988.

Se ha comprobado que la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa hepática esta disminuida en la diabetes mellitus experimental, hecho que es posible revertir mediante la administración de insulina. En este estudio se utilizaron ratas diabéticas inducidas por la inyección de estreptozotocina para analizar la función reguladora de la insulina sobre la expresión del gen de la $\Delta 6$ desaturasa hepática. En los animales diabéticos la actividad enzimática y la abundancia del mRNA de la $\Delta 6$ desaturasa hepática están, respectivamente, 1,5 y 2,5 veces más bajas en comparación con las ratas controles. La administración de insulina a los animales diabéticos, provoca un aumento de los niveles de mRNA de 4,5 veces, pero tan solo una recuperación de la actividad enzimática de 1,3 veces. Estos resultados sugieren que la enzima $\Delta 6$ desaturasa hepática está regulada por mecanismos pre- y post-traduccionales. Por otra parte, la administración de dibutiril-cAMP a ratas diabéticas tratadas con insulina, suprime los efectos estimuladores de ésta, indicando que la inhibición de la expresión del gen de la $\Delta 6$ desaturasa hepática en el estado diabético, al menos en parte, se debe a la activación de protein-quinases dependientes del cAMP, activadas por el glucagón.

131 - METABOLISMO DE LA LIPOGLICOCAROTENO-PROTEINA OVRUBINA EN POMACEA CANALICULATA. (metabolism of the glycolipocarotenoprotein ovorubin in *Pomacea canaliculata*). Dreon, M., Heras, H. y Pollero R.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-CONICET), Fac. Cs. Médicas, UNLP.msdeon@atlas.med.unlp.edu.ar

La ovorubina está presente en el perivitelo de huevos de *P. canaliculata*, contribuyendo a suplir la demanda energética y estructural de la embriogénesis. Estudios previos mostraron que es una lipoglicocarotenoproteína de muy alta densidad, de 300 KDa, tres apoproteínas y bajo contenido lipídico. Nuestro objetivo fue continuar estudiando el metabolismo energético durante la ovogénesis determinando su distribución y síntesis tisular en este caracol y completar su caracterización bioquímica.

La lipoproteína se aisló a partir de huevos por ultracentrifugación y purificó por HPLC en columnas de intercambio aniónico y exclusión molecular. Se exploró la presencia de ovorubina en distintos tejidos mediante western blot y se cuantificó por ELISA. Además se incubaron *in vitro* cortes de tejidos de hembras vitelogenéticas en presencia de ^{14}C -Leu que fueron analizados por radio-HPLC y electroforesis-centelleo líquido.

Se detectó la presencia de ovorubina sólo en glándula del albumen (34 mg/g) que fue asimismo el único tejido que incorporó ^{14}C -Leu a esta lipoproteína. Esto descarta el mecanismo de heterosíntesis y explicaría la ausencia de su vitelogenina. Tanto en glándula del albumen como en huevo la ovorubina es la proteína predominante (más del 80 %). Se analizó la composición en ácidos grasos y se determinará la secuencia N-terminal de las tres subunidades.

132 - ALTERACION DE PROPIEDADES FISICAS DE LIPOPROTEINAS DE *P. PYTHAGORICUS*, POR EFECTO DEL FENITROTION. (effect of fenitrothion on the physical properties of *P. pythagoricus* lipoproteins). Cunningham, M., García, F., Garda, H. y Pollero R. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). E-mail mcunning@atlas.med.edu.ar.

En este trabajo se estudió el efecto del insecticida fenitrotión (FS) sobre las propiedades físicas de dos lipoproteínas de araña, una con alto contenido lipídico sin hemocianina (HDL_1) y otra con bajo contenido en lípidos y con hemocianina como apolipoproteína (HDL_2).

La anisotropía de fluorescencia (r_s), el tiempo de vida media (τ), el tiempo de correlación rotacional (τ_r) y la anisotropía límite (r_∞) del DPH y del DPH-PA, fueron medidas en muestras expuestas a distintas cantidades de FS y a diferentes temperaturas.

Las medidas dinámicas de fluorescencia de ambas sondas demostraron que el FS incrementa la anisotropía límite, disminuye el tiempo de correlación rotacional y el tiempo de vida media en las dos lipoproteínas estudiadas.

Los resultados de r_s del DPH indican que el FS altera la dinámica de los lípidos en ambas lipoproteínas, en todo el rango de temperatura utilizada. Por el contrario las medidas con DPH-PA mostraron el efecto solo en HDL_1 .

Podemos concluir que el FS aumenta el orden de la fase lipídica disminuyendo la amplitud de rotación en la HDL_1 , y en menor medida en la HDL_2 , esto podría atribuirse a sus diferentes estructuras lipoproteicas. Las medidas de τ indican que el FS facilita la entrada de agua en la fase lipídica de ambas lipoproteínas.

133 - ENCAPSULAMIENTO DE NAFOXIDINA EN SISTEMAS LIPIDICOS Y SU INTERACCION CON ALBUMINA. (Lipidic drug delivery system with nafoxidine and its interaction with albumin). Miller, J. y Alonso-Romanowski, S. Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. salonso@unq.edu.ar

La propuesta es encapsular nafoxidina y luego estudiar su interacción con albúmina, lo cual reflejaría la interacción con proteínas plasmáticas. La nafoxidina (dihidronaftaleno) interviene en el metabolismo de lípidos y es aplicada en personas deficientes de estrógenos.

Se estudió la interacción de nafoxidina y albúmina con liposomas multilamelares de fosfatidilcolina de yema de huevo.

Se midieron los espectros de absorción en el UV de cada compuesto disuelto en buffer tris-HCl (pH=7.4) y en presencia de liposomas, con distintas concentraciones de colesterol (10%, 20% y 30%). La referencia era buffer tris-HCl y suspensiones fosfolipídicas de igual concentración.

Se determinaron los coeficientes de extinción (ξ) y de partición (k_p) en buffer y en membrana en base a las longitudes de onda máxima (λ_{max}) correspondientes. Los datos de los coeficientes de extinción, ξ , permiten afirmar que los tres compuestos en estudio tienen una alta interacción con la membrana sólo a bajas concentraciones de colesterol.

Por otro lado, se observa un corrimiento importante del máximo de absorción a 210 nm del espectro de albúmina hacia la zona del rojo, cuando los liposomas contienen 10% de colesterol. Esto corrobora lo encontrado con los ξ y con los coeficientes de partición (k_p) obtenidos.

Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad Nacional de Quilmes y CONICET.

134 - LIPOPEROXIDACION DE MITOCONDRIAS DE EPIHELIO PIGMENTADO DE RETINA BOVINA (RPE) INDUCIDA POR HIDROPEROXIDOS. PROTECCION POR CRBP. (Lipid peroxidation stimulated by fatty acid hydroperoxides of retinal pigment epithelium mitochondria. Protection by CRBP). Terrasa, A.M. Guajardo, M. H. Catalá, A. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

El RPE es una monocapa celular ubicada entre los fotorreceptores y el lecho coriocapilar que está involucrado en el transporte y procesamiento de retinoides, la fagocitosis de las porciones distales de los fotorreceptores reciclando el ácido docosahexaenoico y la captación selectiva de dicho ácido graso de la circulación. Estas células contienen proteínas citosólicas de PM ≈ 15 KDa encargadas del transporte de retinoides y ácidos grasos (CRBP-FABP). El daño oxidativo del RPE es uno de los primeros eventos de la degeneración macular, siendo la mitocondria el principal target de la lipoperoxidación con la formación de hidroperóxidos lipídicos que actúan en la etapa de propagación.

Se estudió el efecto inductor de hidroperóxidos derivados de distintos ácidos grasos (18:2 n-6, 20:4 n-6 y 22:6 n-3) sobre la lipoperoxidación Fe^{2+} -ascorbato dependiente de mitocondrias de RPE bovino, medido por quimioluminiscencia. El agregado de cantidades crecientes (0 a 100 nmol) de hidroperóxidos a las mitocondrias de RPE produce un marcado incremento, concentración dependiente, en la emisión lumínica. El proceso se siguió simultáneamente por variación en la composición de ácidos grasos observándose un marcado descenso en los ácidos grasos polinsaturados. Fracciones citosólicas de bajo PM, aisladas de RPE, que mostraron capacidad de ligar ^3H -todo-*trans* retinol se utilizaron como antioxidantes en el sistema en estudio, produciendo en todos los casos inhibición de la peroxidación.

135 - EFECTO DE HIDROPEROXIDO DE ACIDO ARAQUIDONICO SOBRE LA LIPOPEROXIDACION DE NUCLEOS DE HIGADO DE RATA. (Effect of arachidonic acid hydroperoxide on the liperoxidation of rat liver nuclei) Marmunti, M., Catalá, A. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Los fosfolípidos conteniendo ácidos grasos polinosaturados son el sitio preferido de la peroxidación, a través de una reacción en cadena. Un grupo metileno de un ácido graso polinosaturado, flanqueado por dobles enlaces pierde fácilmente un átomo de hidrógeno. El radical libre residual adiciona oxígeno generando un radical peroxilo, que a su vez extrae hidrógeno de otra molécula de ácido graso, produciendo el hidroperóxido e iniciando otro ciclo de liperoxidación. En este trabajo se investigó el efecto del hidroperóxido de ácido araquidónico sobre la liperoxidación no enzimática de núcleos aislados de hígado de rata y fracciones de cromatina, obtenidas por sonicación de núcleos suspendidos en sacarosa 0.25M y fraccionados por sedimentación de acuerdo al siguiente esquema: 3K, 12K, 27.5Kg por 10 min c/u. La fracción de cromatina de más baja densidad fue obtenida por precipitación con etanol frío del sobrenadante de la última centrifugación. Los núcleos se incubaron con hidroperóxido de ácido araquidónico (32, 64 y 96 µM) sin y con la adición de ácido ascórbico 0.4 mM. En ambos casos se observó un incremento en los valores de quimioluminiscencia (cpm/mg proteína), siendo mayor en presencia de ascórbico. La adición de hidroperóxido a fracciones de cromatina pesada produjo un aumento en la emisión luminica, que fue potenciada por la adición de ácido ascórbico, no observándose cambios en la fracción 27.5K etanol. Los aumentos en quimioluminiscencia fueron acompañados por un descenso en el contenido de C20:4 n6 y C18:2 n6.

136 - PERFIL DE ACIDOS GRASOS Y LIPOPEROXIDACION DE MICROSOMAS Y MITOCONDRIAS DE HIGADO Y CORAZON DE CAIRINA MUSCHATA. (Fatty acid profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver and heart of *Cairina muschata*). Gutiérrez, A.M., Reboredo, G.R., Catalá, A.* Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias*, Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, Argentina.

El contenido de ácidos grasos y nivel de antioxidantes de membranas biológicas difiere entre especies y tejidos de una misma especie, lo que podría explicar las diferencias observadas con respecto a la susceptibilidad a la peroxidación lipídica. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar en pato criollo (*C. muschata*) la composición de ácidos grasos y peroxidación lipídica de microsomas y mitocondrias aislados de hígado y corazón. Las organelas fueron incubadas en un sistema ascorbato-Fe⁺⁺ in vitro, midiendo quimioluminiscencia y variación en la composición de ácidos grasos. Los resultados indican que las mitocondrias y microsomas de hígado y corazón poseen aproximadamente 50 % de ácidos grasos no saturados siendo el C18:1n9 y C20:4n6 los que se encuentran en mayor porcentaje. En hígado, los valores de emisión luminica fueron más elevados en microsomas que en mitocondrias con una disminución significativa de los ácidos grasos C20:4n6 y C22:6n3, mientras que en mitocondrias disminuyó solamente el C20:4n6. En corazón las mitocondrias fueron las más afectadas por el proceso de liperoxidación presentando una disminución de los ácidos grasos C18:2n6, C20:4n6 y C22:6n3. Los ácidos grasos de microsomas no experimentaron cambios. La composición de ácidos grasos de los microsomas de corazón no parece ser responsable de la diferente susceptibilidad al proceso de liperoxidación, otros factores podrían estar involucrados en la protección observada.

137 - "REMODELADO DEL ACIDO ARAQUIDONICO EN LOS POOL NUCLEARES DE FOSFATIDILCOLINA (PC) DE CELULAS HEPATICAS Y RENALES" ("Remodeling of arachidonic acid in nuclear PC pools of hepatic and renal rat cells"). Ves-Losada, A.^{1,2}, Maté, S.M.¹ y Brenner, R.R.¹. INIBIOLP, CONICET-UNLP, calles 60 y 120 y 2° Fac. Cs. Exactas, UNLP, 1900 La Plata, Argentina. E-mail: avlosada@nahuel.unlp.biol.edu.ar, Fax: 221-425-8988.

Los ácidos grasos (AG) actúan en el núcleo regulando la expresión genética, como mediadores químicos y como componentes estructurales. Estas funciones las realizarán los AG provenientes del citosol y/o de los pools nucleares. Para entender estos procesos es necesario conocer el metabolismo lipídico nuclear. El objetivo fue estudiar el metabolismo del ácido araquidónico en los pools nucleares de PC en células hepáticas y renales de rata. Se incubaron *in vitro* núcleos con [1-¹⁴C]20:4n-6 - CoA durante 10 min y luego se reemplazó el medio por uno frío con citosol. Las especies moleculares de PC se resolvieron por HPLC - ELSD y se cuantificó el ¹⁴C en un contador β. Se observó que los núcleos hepáticos y renales incorporan 20:4-CoA exógeno en las especies moleculares PC con el 20:4 en la posición sn-2 (18:0-20:4, 16:0-20:4, 18:2-20:4, 18:1-20:4), si bien la especie molecular sintetizada en forma más activa posee el 20:4 en ambas posiciones sn-1 y sn-2. En presencia de citosol el ácido no saturado en la sn-1 fue reemplazado por uno saturado. En conclusión en el núcleo el 20:4 se incorporaría a PC por síntesis de novo y posteriormente sería remodelado.

138 - ANALISIS ESTRUCTURAL DE LA Δ5 DESATURASA DE LIPIDOS DE MEMBRANA DE B. SUBTILIS (Structural analysis of Δ5 desaturase of *B. subtilis*) Díaz, A.R., Margni, C. y de Mendoza, D. IBR, UNR-CONICET. (2000) Rosario, Argentina E-mail: cordiaz@infovia.com.ar

La Δ5 desaturasa inducible por frío de *B. subtilis* (Des) es un péptido de 352 a.a. que contiene tres grupos de histidina conservados y 4 dominios putativos transmembrana (TM) característicos de otras desaturasas de membrana.

Para el análisis topológico de la Des se usaron proteínas de fusión, obtenidas ligando diferentes fragmentos amino terminal de la Des a la proteína fosfatasa alcalina (PhoA). Estas fusiones fueron construidas usando mutagénesis dirigida a cuatro posiciones hidrófilas que flanquean los TM (posiciones: 52, 81, 109 y 213). La inactividad de la fusión en la posición 109 indicaría que este dominio se encuentra del lado citoplasmático mientras que la alta actividad de la fusión en el sitio 213 señalaría un dominio periplasmático limitando ambos el tercer TM, coincidiendo esto con el modelo predictivo obtenido por análisis de hidrofobicidad. Las otras dos fusiones no dieron el resultado esperado de acuerdo al modelo propuesto por lo tanto más estudios deberán ser realizados.

Para examinar el rol funcional de los residuos de His conservados, se usó la capacidad de esta enzima para desaturar ácidos grasos de larga cadena esterificados a lípidos de membrana cuando se la expresa en *E. coli*. Por mutagénesis sitio dirigida dos residuos de His fueron individualmente convertidos a Ala. Cada mutación His→Ala falló para producir palmitoleato a partir de palmitato demostrando que estos residuos son esenciales para la función catalítica de esta enzima.

139 - ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACCION DE TREHALOSA Y NAFOXIDINA SOBRE BICAPAS LIPIDICAS POLIMERIZADAS. (Comparative study of trehalose and nafoxidine action on polymeric lipid bilayers). Lioy, V., Viera, L.I. y Alonso-Romanowski, S. Laboratorio de Biomembranas. Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. salonso@unq.edu.ar

En este trabajo se estudió la acción de trehalosa y nafoxidina sobre las propiedades de interfaz y el empaquetamiento de bicapas lipídicas poliméricas. Como sistema modelo se usaron liposomas multilamelares constituidos por DIAPC: DMPC: Colesterol (1:1:0.2). Los mismos fueron polimerizados irradiándose con luz UV a 254nm. La trehalosa es un disacárido de reconocida acción crioprotectora. Su interacción con la bicapa se produce a nivel de interfaz a través de puentes de hidrógeno entre los oxhidrilos del azúcar y los grupos fosfato y carbonilo del lípido. La nafoxidina posee una estructura con varios anillos aromáticos, por lo cual es factible que la misma se ubique en la zona de las cadenas hidrocarbonadas de las bicapas. Se realizaron espectros visibles y de fluorescencia de la sonda Merocianina 540 en presencia de liposomas polimerizados y sin polimerizar, en presencia de ambos compuestos. Los mismos permiten indagar la interacción a nivel interfaz lípido-solución. Por otro lado, los espectros visibles de los liposomas polimerizados reflejan la efectividad de conjugación de dobles enlaces en las cadenas poliméricas y la eficiencia de polimerización. La posición e intensidad de los picos en estos espectros indican la perturbación en el ordenamiento de las cadenas de polímero por la inserción de moléculas en la zona hidrocarbonada de la bicapa. Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad Nacional de Quilmes y CONICET.

140 - DISEÑO DE UN TRANSPORTADOR LIPIDICO PARA NITROPRUSIATO DE SODIO. (Drug delivery system design for sodium nitroprusside). Stern A¹, L., Taira M.C.², Escobar M.E.¹, Adragna N.³ y Alonso-Romanowski S¹. ¹Biomembranas Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. ²Dpto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, UBA. ³Pharmacology and Toxicology Department, Wright State University, Dayton, Ohio, USA. salonso@unq.edu.ar

El objetivo de este trabajo es el diseño de un transportador adecuado para el nitroprusiato sódico, droga utilizada en el tratamiento de la hipertensión arterial aguda, y disminuir su toxicidad por la presencia de cinco grupos cianuros en su molécula. Se estudió la interacción de liposomas de fosfatidilcolina de soja, yema de huevo y dimiristoil-fosfatidilcolina, con nitroprusiato de sodio (SNP). Se utilizaron técnicas de electroforesis y cromatografía en capa delgada para evaluar la interacción droga-lípido-proteína y droga-lípido. Los resultados son coincidentes sobre la estabilidad de los liposomas. Los experimentos en capa fina indican que liposomas con nitroprusiato no migran, mientras los componentes de los lípidos muestran un frente característico. La mezcla de solventes usados fue hexano (75): dietileter (25): acético glacial (1). La interacción de albúmina con liposomas conteniendo SNP se siguió usando electroforesis por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con glicerol. Los resultados muestran bandas no resueltas en el caso de contener SNP y una separación de las mismas cuando se trata de liposomas sin SNP. Para poder cuantificar de un modo más exacto estas interacciones se midieron cinéticas de binding de la droga al lípido. Este trabajo fue realizado con subsidios de la Universidad Nacional de Quilmes y de CONICET.

141 - EFECTOS DE LA C₆-CERAMIDA SOBRE LA EXPRESION EN SUPERFICIE DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTINICO (Effects of C₆-Ceramide on the surface expression of nicotinic acetylcholine receptor). Pediconi M.F., de los Santos E.B., Gallegos C.E. y Barrantes F.J. INIBIBB (UNS-CONICET) CC 857, Bahía Blanca, Argentina

En trabajos previos mostramos que la esfingomielina (SM) es necesaria para la inserción del receptor nicotínico muscular adulto (AChR) en la membrana plasmática de células CHO. Un incremento significativo en los niveles endógenos de SM producidos por un oxiesterol, incrementa la proporción de AChR en la membrana. Se postuló que este incremento podría deberse a la disminución de ceramidas (cer) necesarias para la síntesis de SM. Para probar esto se incubaron células CHO que expresan al AChR con tres concentraciones de C₆-cer durante 5 h a 37°C. Los ensayos de binding con [¹²⁵I] α-bungarotoxina (α-BTX) mostraron que el AChR disminuyó en las células tratadas en función de la concentración de cer. Las curvas de tiempo realizadas con 37.5 μM del lípido mostraron que el AChR de superficie disminuyó en un 35 ± 12% a las 3 hs. Mediante ensayos de saturación con α-BTX en células incubadas con 25 y 37.5 μM de C₆-cer se observó que la K_d para el ligando disminuyó en un 50 y 70% respectivamente. Los resultados indican que la inserción del AChR en la membrana celular es inhibida por C₆-cer en forma dependiente del tiempo y de la concentración, y que la cer aumenta la afinidad del AChR de la superficie celular por su ligando.

142 - LA ACTIVIDAD DE COLESTEROL ESTER HIDROLASA MICROSOAL Y CITOSOLICA DE HAPACITOS DE RATA ES REDUCIDA POR REMANENTES DE QUILOMICRONES ENRIQUECIDOS EN ACIDOS n-6 Y n-3 (Microsomal and cytosolic cholesterol ester hydrolase activity in hepatocytes is reduced by quilomicron remnants enriched in n-6 and n-3 fatty acids). Maldonado, E.N.¹, Chico, Y.², Botham, K.³, Ochoa, B.² y Avelaño, M.I.¹ ¹INIBIBB, Bahía Blanca, Argentina. ²UPV, Bilbao, España. ³The Royal Veterinary College, London, UK.

Se estudió el efecto del agregado de remanentes de quilomicrones (RM) enriquecidos en ácidos grasos n-6 o n-3 sobre la actividad de la colesterol éster hidrolasa (CEH) microsomal y citosólica de hepatocitos de rata en cultivo primario. Las células se incubaron frente a RM que aportaban concentraciones de triglicéridos (TG) cercanas a las fisiológicas durante 6 h y 19 h, y dos concentraciones de TG durante 6 h. En los hepatocitos, la relación TG/PL aumentó en todos los casos debido al incremento relativo de TH. La composición acídica de los PL y TG en ellos no fue modificada por los RMn-6 mientras que los RMn-3 aumentaron los n-3 de TG y sólo afectaron levemente la relación 20:5n-3/18:2n-6 en PL. Los dos tipos de RM disminuyeron la actividad de CEH a los distintos tiempos y dosis utilizadas. Los resultados sugieren que esta reducción no se relacionaría con modificaciones de las membranas del hepatocito, ni con el tipo de ácido, sino con la mayor disponibilidad en las células de ácidos grasos, lo que es interesante en vista de la participación de CEH en la formación del colesterol biliar.

143 - LOS ACIDOS GRASOS N-3 DIETARIOS MODIFICAN LOS LIPIDOS DE PLASMA, HIGADO Y CELULAS SANGUINEAS DE RATON EN FORMA REVERSIBLE (Dietary n-3 fatty acids affect in a reversible way plasma, liver and blood cell lipids). **Maldonado, E.N., Furland, N.E., Pennacchiotti, G.L., y Avelaño, M.I.** INIBIBB, UNS-CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina

Mostramos previamente que la incorporación de ácidos n-3 provenientes de aceite de pescado (AP) en los lípidos totales de plasma, hígado y células sanguíneas de ratón es reversible. En este trabajo estudiamos las principales clases lipídicas en ellos durante la administración de AP y luego del retorno a una dieta standard. En plasma, la dieta n-3 disminuyó acentuadamente los fosfolípidos (PL), colesterol y triglicéridos (TG). El PL más afectado fue la fosfatidilcolina (PC). El AP aumentó los porcentajes de ácidos n-3 en los PL, TG, y ésteres de colesterol plasmáticos, pero cuantitativamente el evento dominante fue la disminución de los ácidos n-6, en especial 18:2n-6. Coincidentemente, la recuperación de éste fue el cambio más rápido en lípidos plasmáticos durante la fase de reversión. En hígado, sólo los TG disminuyeron luego de dos semanas de AP. En los PL se observaron incrementos relativos de difosfatidilglicerol, de esfingomielina, y de la relación fosfatidiletanolamina (PE)/PC. Dos semanas después del retorno a la dieta standard, todos los lípidos hepáticos y plasmáticos habían retornado a su composición inicial. En contraste, los cambios inducidos por la dieta en los lípidos de las células sanguíneas fueron más lentos, tanto en la incorporación como en la reversión. Esta falta de reversibilidad fue debida a la PE.

144 - INCREMENTO DE ALCANOS DE MUY LARGA CADENA EN HOJAS DE PLANTAS DE SOJA BAJO DEFICIENCIA DE FOSFORO Y AGUA (Increase in very long chain alkanes in soybean plant leaves under water and phosphorus deficiency). **Varillas, M., Brevédan, R. y Avelaño M.** Universidad Nacional del Sur y CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

El objeto de esta investigación fue estudiar los efectos de la deficiencia de agua y fósforo sobre los lípidos epicuticulares foliares en plantas de soja. Las plantas fueron sujetas a ciclos severos de deficiencia hídrica durante 2 meses, entre floración y formación del grano. El contenido total de lípidos superficiales por unidad de área aumentó unas tres veces con el estrés hídrico. La composición de las ceras también se modificó y aunque todos los componentes aumentaron, los constituyentes más hidrofóbicos fueron los más incrementados. Entre ellos, se destacaron los alcanos impares de muy larga cadena (C_{25} a C_{31}). Los efectos de la carencia de fósforo en el suelo se complementaron con los efectos de la deficiencia de agua, con pequeños efectos adicionales negativos sobre el estado de agua de las plantas (conductividad estomática, contenido relativo de agua y potencial de agua foliar), tamaño de las hojas, peso seco y área foliar. La alteración en el contenido y composición de ceras en hoja representa una de las respuestas adaptativas de las plantas de soja al estrés. La planta se defiende de la pérdida de agua por incremento de la cantidad de sus ceras, y los alcanos juegan el principal papel en esta protección.

145 - EL SIMVASTATIN OCASIONA UNA ALTERACION EN LA CAPTACION Y METABOLISMO DE DISTINTOS ACIDOS GRASOS EN CELULAS A549 DE ADENOCARCINOMA DE PULMON HUMANO EN CULTIVO (Simvastatin modifies the uptake and metabolic conversion of fatty acids in a human lung adenocarcinoma cells line A549) **Bellini M.J., Polo M., Alaniz M.J.T. y Bravo M.G.** de. INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas, CONICET-UNLP 60 y 120, La Plata. Argentina.

Las células neoplásicas requieren una activa síntesis de lípidos para construir sus estructuras a una velocidad compatible con su rápido crecimiento. Habría una estrecha correlación entre el grado de inhibición de la proliferación celular y el grado de insaturación de ácidos grasos y que a su vez está modulado por los niveles de colesterol. Estudiamos la captación y metabolización de los ácidos radiactivos palmítico, alfa-linolénico y dihomo-gamma-linolénico ($10 \mu\text{M}$) en células A549 en cultivo y el efecto que sobre ello ejerce el simvastatin (inhibidor de la colesterologénesis). Para ello se cultivaron células en fase logarítmica de crecimiento en medio conteniendo 0 y $90 \mu\text{M}$ de simvastatin durante 48 hs; las últimas 24 horas en medio libre de suero conteniendo los ácidos grasos radiactivos. El simvastatin produjo un 88% de inhibición en la proliferación celular conservando la viabilidad. Los tres ácidos grasos fueron activamente captados y metabolizados tanto en las células control como en las tratadas con simvastatin encontrándose en estas últimas un aumento de la actividad de $\Delta 5$ desaturasa y una alteración de la actividad desaturante-elongante en los ácidos palmítico y alfa-linolénico.

146 - LOCALIZACION DE LA ESFINGOMIELINA EN MEMBRANAS RICAS EN RECEPTOR DE ACETILCOLINA NICOTINICO. COMPARACION CON OTROS LIPIDOS MARCADOS CON PIRENO. (Sphingomyelin localization in nicotinic acetylcholine receptor-rich membranes. Comparison with other pyrene-labelled lipids). **Bonini, I.C., Antolini, S.S. y Barrantes, F.J.** Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca. UNS-CONICET.

La esfingomielina (SM) constituye el cuarto lípido en importancia en membranas ricas en receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) de *Torpedo*. Estudios de hidrólisis enzimática controlada y análisis composicional de lípidos mostraron que la SM se distribuye asimétricamente, reuniendo ~60% en la cara externa de la bicapa lipídica y presentando en ambas hemicapas especies moleculares distintas. Estudios de formación de excímero de pireno-SM (Py-SM) en función de su concentración y de la temperatura indican una moderada selectividad de Py-SM por los dominios anulares. La eficiencia de la transferencia de energía resonante (RET) entre la fluorescencia intrínseca del AChR (en membranas nativas y en sistemas reconstituidos con AChR purificado) y Py-SM en función de la densidad superficial de aceptores permitieron determinar una constante de afinidad relativa de Py-SM por AChR, K_a , de ≈ 0.7 . Se compararon estos resultados con los obtenidos utilizando fosfatidilcolina y ácido decanoico marcados con pireno. La digestión de Py-SM incorporada a la membrana con esfingomielinasa incrementó la eficiencia de FRET en un 50% indicando que el producto resultante (Py-ceramide) presenta una mayor afinidad por la proteína que su lípido parental.

147 - EL METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS EN LA RETINA VARIA EN FORMA CIRCADIANA. (The metabolism of retinal phospholipids changes in a circadian manner). Garbarino Pico E., Caputto B.L. y Guido M.E. CIQUIBIC-Depto. Química Biológica, Fac. Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000 Córdoba, Argentina. garba@dqbfq.fcq.unc.edu.ar

Subsidiado por CONICET, FONCYT, CONICOR, SeCyT y Fundación Antorchas

En los vertebrados, el reloj circadiano recibe la información sobre la iluminación ambiental a través de la retina. Esta posee la capacidad de comportarse como un oscilador autónomo. Esto se manifiesta en el ritmo diario observado en la expresión de algunos genes y la secreción de melatonina.

Con el propósito de conocer la regulación circadiana del metabolismo de fosfolípidos en diferentes poblaciones celulares de la retina de pollo, se midió la incorporación de ^{32}P y ^3H -glicerol en fosfolípidos a diferentes horarios del día bajo condiciones de iluminación constante (oscuridad o luz por 48h.). Los animales fueron sacrificados a distintos horarios 1h. después de ser inyectados intraocularmente con el precursor radiactivo.

En oscuridad constante se observaron diferencias estadísticamente significativas en la marcación de fosfolípidos con los 2 precursores utilizados, tanto en células ganglionares como fotorreceptoras. Los niveles más bajos se presentaron hacia la mitad de la noche subjetiva y los más altos durante horarios diurnos. En condiciones de luz continua se observó un comportamiento similar pero con una menor amplitud. Es de destacar que es la primera vez que se describe un ritmo circadiano en las células ganglionares de la retina. Estos hallazgos sugieren que el metabolismo de fosfolípidos retinales está bajo control de un reloj circadiano.

148 - INTERACCION DE HORMONAS TIROIDEAS CON INTERFASES LIPICAS (Interaction of thyroid hormones with lipid interfaces). Issé B.*, Fidelio G.D.* y Farías R.*. *Dpto. de Bioquímica de la Nutrición del INSIBIO, UNT-CONICET y *Dpto. de Química Biológica-CIQUIBIC-Fac. Cs. Químicas, UNC-CONICET. (Financiado por Fund. Antorchas)

El acceso de las hormonas tiroideas (HT), L-T_4 y L-T_3 , a los receptores nucleares ocurre después de atravesar las membranas. El mecanismo molecular del transporte de las HT se desconoce. En trabajos previos de nuestro laboratorio indicaron que L-T_3 perturba propiedades físicas de lípidos organizados en sistemas artificiales de membranas (bicapas). Por otro lado hemos reportado que las HT son capaces de penetrar capas monomoleculares lipídicas a una presión lateral relevante (20 mN/m), lo que indicaría cierta capacidad de interaccionar directamente con membranas biológicas con afinidad en el orden μM . Nuevos experimentos realizados con monocapas mezcla lípido-hormonas indican un área molecular para L-T_3 y L-T_4 de $\sim 35 \text{ \AA}^2$, similar a colesterol, indicando que a pesar que las HT per se no presentan estabilidad en interfaces en ausencia de lípidos, éstas adquieren estabilidad en presencia de éstos. Además, en este período hemos extendido estos estudios analizando la perturbación de HT con lípidos utilizando calorimetría diferencial de barrido. L-T_3 modifica la temperatura de transición gel $\rightarrow$ líquido cristalino de DPPC, disminuye la cooperatividad y la entalpía del proceso. En liposomas multilamelares y en condiciones controladas hemos observado que la perturbación del comportamiento termotrópico depende del tiempo de incubación. A tiempos cortos de incubación, menores a 60 minutos, el termograma presenta bimodalidad con dos componentes. Uno de ellos puede interpretarse como lípido no perturbado que desaparece a mayor tiempo de incubación. Esto indicaría que HT penetra y atraviesa bicapas alterando paulatinamente las propiedades de los liposomas multilamelares.

149 - LAS POLIAMINAS INHIBEN LA PEROXIDACION LIPIDICA INDUCIDA POR H_2O_2 EN EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI. (Polyamines inhibit lipid peroxidation induced by H_2O_2 in epimastigotes of Trypanosoma cruzi) Hernández, S.*, Sánchez, M.* **, Schwarcz, M.* **, *Dpto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, **CBC, UBA. Buenos Aires. Argentina.

Con el objeto de ensayar la función protectora de las poliaminas frente al efecto tóxico de los radicales libres en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, utilizamos como generador de radicales libres al sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{++}$, agregado al medio de cultivo (in vivo) o a homogenatos (in vitro), y analizamos la proliferación y lipoperoxidación (medida como producción de malondialdehído).

El efecto del H_2O_2 depende de la dosis y de la etapa del crecimiento de los parásitos. $100 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2 / 5 \mu\text{M} \text{FeSO}_4$ agregado 2 horas in vivo o 20 minutos in vitro duplica la lipoperoxidación, mientras que agregado al cultivo durante 24 horas triplica la lipoperoxidación e inhibe en un 50% la proliferación. La espermina -pero no las otras poliaminas- protege de la peroxidación in vitro pero no in vivo. El tratamiento con un éster de forbol -que aumenta la espermina endógena y la proliferación- disminuye la peroxidación lipídica basal y la producida por H_2O_2 , en tanto que los inhibidores de la síntesis de poliaminas la aumentan.

Estos resultados muestran que la espermina endógena protege del daño oxidativo producido por el H_2O_2 . Por el contrario la espermidina y la espermina exógenas en presencia de suero bovino fetal (5 a 15%), probablemente a través de sus productos de oxidación, potencian la toxicidad del H_2O_2 .

Subsidiado por UBA

150 - EFECTO DE α TOCOFEROL SOBRE LA PEROXIDACION LIPIDICA DE MITOCONDRIAS DE HIGADO Y TESTICULO DE RATA. (The effect of α tocopherol on the lipid peroxidation of rat liver and testis mitochondria) Gavazza, M., Catalá A. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Las mitocondrias son organelas celulares expuesta a daño por radicales libres. El antioxidante liposoluble α tocoferol interfiere en la reacción de propagación de la peroxidación de moléculas lipídicas. Se estudió el efecto de administración intraperitoneal de α tocoferol (100mg/kg/24hs) sobre la peroxidación lipídica inducida por ascorbato- Fe^{++} de mitocondrias aisladas de hígado y testículo de rata, prestando especial atención al comportamiento de los ácidos grasos polinsaturados C20:4n6 y C22:6n3 en hígado y C20:4n6 y C22:5n6 en testículo. La peroxidación lipídica de mitocondrias hepáticas produjo una disminución significativa en el contenido de los ácidos C20:4 n6 y C22:6 n3 en el grupo control, no observándose cambios en la composición de ácidos grasos del grupo tratado con α tocoferol. La emisión lumínica fue significativamente mayor en el grupo control que en el tratado con vitamina E. La peroxidación lipídica de mitocondrias de testículo produjo una disminución significativa en el contenido de los ácidos C20:4 n6 y C22:5 n6 (4,7,10,13,16-docosapentaenoico) en el grupo control en relación a organelas nativas. La emisión lumínica de ambos grupos fue similar. El tratamiento con α tocoferol en la dosis y tiempo indicados protege los ácidos grasos polinsaturados de las mitocondrias hepáticas pero no aquellos presentes en mitocondrias de testículo durante la peroxidación lipídica inducida por ascorbato- Fe^{++} .

151 - PEROXIDACION LIPIDICA NO ENZIMATICA DE MITOCONDRIAS DE HIGADO Y CORAZON EN PRESENCIA DE HIDROPEROXIDO DE ACIDO LINOLEICO: EFECTO DE VITAMINA A. (Non enzymatic lipid peroxidation of liver and heart mitochondria in the presence of linoleic acid hydroperoxide: effect of vitamin A) Piergiacomi, V., Palacios, A., Catalá A. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina.

El hidroperóxido de ácido linoleico (LHP) estimula la peroxidación ascorbato-Fe⁺⁺ en membranas biológicas, formando radicales libres en el interior de la bicapa e iniciando así la degradación de los ácidos grasos polinosaturados, que es inhibida en presencia de vitamina A. En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración intraperitoneal de retinol palmitato (195mg/kg/7días) sobre la peroxidación lipídica no enzimática de mitocondrias obtenidas de hígado y corazón de ratas Wistar. La cuantificación del proceso de peroxidación lipídica se realizó midiendo quimioluminiscencia y composición de ácidos grasos. Las mitocondrias cardíacas incubadas en ascorbato-Fe⁺⁺ a 37° C durante 120 minutos no experimentaron daño peroxidativo. En iguales condiciones, las mitocondrias de hígado peroxidaron, siendo menos afectadas aquellas pertenecientes al grupo tratado con vitamina A. La adición de cantidades crecientes de LHP (45-180µM), produjo un aumento de la emisión lumínica en mitocondrias hepáticas y cardíacas, observándose cambios en la composición de ácidos grasos, siendo los más afectados C20:4n6 y C22:6n3. El análisis simultáneo de quimioluminiscencia y porcentaje de disminución de los ácidos grasos peroxidables, indica que retinol palmitato protege a las organelas en estudio del daño oxidativo inducido por LHP.

152 - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA RESISTENTES A DETERGENTE DE LA MUCOSA INTestinal DE *Cyprinus carpio*. (Isolation and partial characterization of detergent-resistant membrane microdomains from the intestinal mucosa of *Cyprinus carpio*) Echeverría, C., Villanueva, J. y Anthauer, R. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

El pez *Cyprinus carpio* es una especie agástrica muy utilizada para el estudio de internalización de proteínas. En los últimos años ha cobrado mucha importancia la aparición de nuevas rutas de endocitosis no mediadas por clatrina. Una de estas rutas involucra la participación de microdominios de membrana resistentes a detergente (DRMD) y de estructuras denominadas caveolas. Nuestro grupo ha demostrado la presencia de DRMD en enterocitos de *C. carpio*. Para aislar y caracterizar parcialmente los DRMD hemos utilizado la técnica de flotación en gradientes de densidad de sacarosa y la proteína anclada vía GPI, fosfatasa alcalina intestinal (IAP), como marcador de DRMD. La distribución de IAP en los gradientes muestra un enriquecimiento de la enzima en regiones de baja densidad de sacarosa, las cuales corresponderían a DRMD. EL análisis en PAGE-Triton X-100 demostró que IAP conserva su ancla de GPI en la fracción de DRMD. Adicionalmente, el perfil de proteínas de DRMD obtenido en geles PAGE-SDS al 12% en condiciones reductoras es diferente al obtenido para membranas de ribete en cepillo (BBM). Finalmente, esta es la primera vez que se describen DRMD en peces y ello abre nuevas perspectivas para el estudio de internalización de proteínas en estos animales.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1980993

BIOTECNOLOGIA

153 - ESTABILIDAD TERMICA DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO ADUCTOR DE VIEIRA (*Zigochlamys patagonica*). ESTUDIO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC). (Thermal stability of myofibrillar proteins from scallop (*Zigochlamys patagonica*). A differential calorimetric study). Paredi, M.E.^{1,2,a}, Tomas, M.C.^{3,b} y Crupkin, M.^{2,a}, aCentro Regional Sur (CEMSUR-CITEP), M. T de Alvear 1168-Mar del Plata. bCentro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), 47 y 116. La Plata. Argentina.

Se investigaron las características térmicas de las proteínas miofibrilares del músculo liso y estriado de vieira. Mediante estudios de SDS-PAGE 10% y fotodensitometría, se comprobó que el músculo liso posee mayor contenido de paramiosina que el estriado. Los termogramas de DSC de los músculos liso y estriado muestran dos principales transiciones endotérmicas con T_{máx} de 53,9 y 77°C y 55 y 79,5 °C, respectivamente. Los termogramas de las miofibrillas purificadas de ambos tipos de músculos, muestran un perfil similar al del músculo entero y una ligera disminución de los T_{máx}. Miosina y paramiosina contribuyen a la primera transición y actina a la segunda. No se observaron diferencias significativas entre los T_{máx} correspondientes a la primera transición de ambos músculos. Esto descarta una influencia directa del contenido de paramiosina sobre la estabilidad térmica. Los T_{máx} y el ΔH total disminuyen significativamente con el incremento del pH y de la fuerza iónica. El músculo liso mostró mayor sensibilidad a las modificaciones del entorno químico. Esto sugiere que diferentes interacciones miosina-paramiosina pueden estar involucradas en el comportamiento térmico de ambos músculos.

¹CIC, ²UNMDP, ³CONICET. Financiado por FONCYT, CIC, CONICET

154 - EVALUACION DE LA CENTRIFUGA PLANETARIA PARA LA CROMATOGRAFIA EN CONTRACORRIENTE EMPLEANDO SISTEMAS DE DOS FASES ACUOSAS. (Evaluation of the flow-through coil planet centrifuge for countercurrent chromatography using aqueous two-phase systems) Cabrera, R., Stumpo, R., Ferraro, G., Cascone, O., Fernández-Lahore, H.M. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina. E-mail: mflahore@huemul.ffyb.uba.ar

La cromatografía en contracorriente (CCC), basada en el principio de extracción líquido-líquido, se utiliza con éxito para la separación de productos naturales. La llamada centrifuga planetaria hace posible la retención de una fase líquida estacionaria en la "columna" CCC, de manera que por irrigación continua -con una fase móvil- se obtienen separaciones cromatográficas en ausencia de un soporte sólido. Nuestro objetivo es extender la aplicación de la CCC al fraccionamiento de mezclas proteicas complejas, como es el caso del plasma equino hiperinmune (Kijac *et al.*, Sep. Sci. Technol. 2000). Se propone el uso de sistemas de dos fases acuosas (ATPS) dado que proveen entorno adecuado para la partición de macromoléculas. Podemos predecir que la retención de la fase móvil es un parámetro crítico para la resolución (R_y) del sistema CCC/ATPS, según:

$$R_y = (1/4)(\alpha - 1)N^{1/2}[K_1/K_2 + (V_m/V_s)]$$

donde α es el factor de separación, N es el número de platos teóricos, K₁ es el coeficiente de partición, V_s y V_m son los volúmenes ocupados por las fases estacionaria y móvil, respectivamente. Operando una centrifuga tipo J (CCC 1000, PharmaTech Research, USA) a 1000 rpm y utilizando columnas semi-preparativas, hemos obtenido retenciones de ≈ 35% de la fase superior de un ATPS formado por PEG 1540 (12.5%) y fosfatos (12.5%). Dicho nivel de retención es estable en el tiempo y puede incrementarse aumentando el largo de "tie-line" de los ATPS. Puede calcularse un valor ≤ 1,8 para el módulo V_m/V_s lo que compara favorablemente con el propio de la cromatografía en columna (~13-20). Estos resultados abren la posibilidad de realizar separaciones de proteínas mediante CCC/ATPS.

155 - BIOMARCADORES EN *Eisenia fetida* EXPUESTAS A TRINITROTOLUENO (TNT) EN SUELO ARTIFICIAL (Biomarkers in *Eisenia fetida* exposed to artificial soil spiked with trinitrotoluene (TNT)). Fuchs, J.S., Casabé, N.B., Oneto, M.L., Basack, S.B., Kesten E.M. y Wood E.J.. Toxicología y Química Legal-Depto. Qca. Biológica -FCEN-UBA, Ciudad Universitaria, Pab.II, (1428), Bs. As., República Argentina. E-mail: juliof@qb.fcen.uba.ar.

Numerosos autores han propuesto a las lombrices como biomonitores de contaminación en suelos. Entre ellas, *Eisenia spp.* han sido validadas internacionalmente para este fin. Los tests de toxicidad en lombrices tienen la ventaja de exponer los organismos directamente a la matriz contaminada inalterada, involucrando sólo al tóxico biodisponible. En este trabajo, interesó el desarrollo de biomarcadores subletales en lombrices expuestas a suelos contaminados con TNT, un producto asociado con la fabricación de explosivos, altamente peligroso y que resulta preocupante a nivel mundial. Se empleó suelo artificial standard adicionado con distintas concentraciones de TNT y se procedió de acuerdo con normas internacionales (OECD, 1993). A los 14 días, se midieron el porcentaje de mortalidad y el número de cocones. Se observó una disminución en la producción de cocones al aumentar el contenido de TNT, aún en aquellas concentraciones que no produjeron mortalidad. Se realizaron ensayos enzimáticos en homogenatos de las lombrices expuestas a concentraciones subletales de TNT. Se midieron carboxilesterasas, glutatión-transferasas, colinesterasas, láctico deshidrogenasa, así como glutatión total, encontrándose niveles significativos de inhibición o inducción. Algunos de estos biomarcadores resultaron indicadores más precoces y sensibles que la mortalidad, y serán útiles en la evaluación del posible riesgo de ecosistemas terrestres impactados por residuos de TNT.

Agradecimientos: A la UBA por el subsidio TX34/ Programación 1998-2000

156 - DETERMINACION "IN SITU" DEL CRECIMIENTO DE BIOFILMS DE *P. fluorescens* (ATCC 17552) SOBRE ORO. MEDICION SIMULTANEA DE PARAMETROS ELECTROQUIMICOS. ("in situ" determination of growth of *P. fluorescens* biofilms on gold. Simultaneous measurements of electrochemical parameters) Busalmen JP, Sánchez SR de, INTEMA-División Corrosión-Univ. Nac. de Mar del Plata-CONICET * Juan B. Justo 4302. B7608FDQ Mar del Plata. jbusalme@fi.mdp.edu.ar

El desarrollo de biofilms, en particular sobre superficies metálicas, afecta una gran variedad de procesos. Desde la integración implante-tejido en las aplicaciones biomédicas, hasta procesos de corrosión en aplicaciones de uso industrial. En muchos procesos de corrosión por ejemplo, la accesibilidad del oxígeno a la superficie metálica es una variable fundamental en el control y la localización del proceso corrosivo y el desarrollo de biofilms la modifica fuertemente. La distribución, el grado de cobertura superficial y la arquitectura general del biofilm son parámetros muy importantes en estos casos. Las técnicas que en general se utilizan para la cuantificación del crecimiento de biofilms son *ex situ* y por lo tanto destructivas e impiden conocer características estructurales. Por este motivo, en este trabajo se desarrolló un método mediante el cual se puede realizar una cuantificación *in situ* por seccionamiento óptico y análisis digital de imágenes de biofilms crecidos sobre películas delgadas de metales puros. Se determinaron parámetros de crecimiento de biofilms de *P. fluorescens* sobre oro y paralelamente se registraron parámetros electroquímicos como el potencial de corrosión y la resistencia a la polarización. Se determinó que existe una variación exponencial del potencial de corrosión hacia potenciales catódicos que acompaña el crecimiento exponencial de los biofilms. Se determinó también que la resistencia a la polarización varía linealmente con el espesor medio de los biofilms. La determinación de estos parámetros permitiría evaluar la velocidad de corrosión.

157 - DINAMICA DE POBLACIONES DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES VINICAS ESPONTANEAS DE LA PATAGONIA, ARGENTINA (Yeast population dynamics in spontaneous wine fermentations from Patagonia, Argentina). Sangorrín M., Zajonskovsky I., van Broock M. y Caballero de Castro A. Dpto. Química. U. N. Comahue. C. Correo 790 (8300) Neuquen, ARGENTINA. msangorr@uncoma.edu.ar

En la región del Comahue (Patagonia) la producción vitivinícola se realiza mayoritariamente por fermentación espontánea de mostos de uvas. Diversos estudios han permitido determinar que variaciones en el cepaje de levaduras indígenas durante el proceso fermentativo influyen en la calidad final del vino. Se estudió la dinámica de poblaciones de levaduras en fermentaciones espontáneas industriales y de laboratorio procedentes de diferentes vendimias y de distintas variedades de *Vitis vinifera*. Las cepas de levaduras fueron caracterizadas por sus patrones de sensibilidad frente a 10 cepas testigos con actividad killer conocida (K_1 - K_{10}). Se observaron patrones característicos y diferenciales para levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. Dentro de la especie *S. cerevisiae* se identificaron 17 patrones diferentes evidenciando una gran heterogeneidad y una sustitución secuencial de cepas de esta especie a lo largo de la fermentación. Adicionalmente sólo dos patrones fueron comunes y mayoritarios en todos los procesos fermentativos exitosos los cuales también fueron identificados en levaduras aisladas de superficies de bodegas regionales. Estos resultados indicarían la presencia de ciertas cepas de *S. cerevisiae* esenciales para el desarrollo de la vinificación, las que adicionalmente podrían ser características de esta región vitivinícola particular. Concluimos también que los perfiles de sensibilidad a toxinas killer constituyen una herramienta sencilla de discriminación de cepas dentro de la misma especie.

158 - METABOLISMO DE ARGININA EN *Lactobacillus reuteri* AISLADO DE MASA PANARIA: VIA ARGININA DEIMINASA (Arginine metabolism in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough: arginine deiminase pathway). Rollán G.C. y Font de Valdez, G. Centro de Referencia para Lactobacilos, 4000 S. M. de Tucumán, Argentina. E-mail: rollan@cerela.org.ar

El sistema arginina deiminasa consta de 3 enzimas: arginina deiminasa (ADI), ornitina transcarbamilasa (OTC) y carbamato kinasa (CK). La biosíntesis de arginina procede de glutamato, principal aminoácido presente en gluten (35% de la proteína total). Este sistema se encuentra en una gran variedad de bacterias y resulta en la conversión de un mol de arginina en, un mol de ornitina, un mol de CO_2 , dos moles de amonio y un mol de ATP. De estos compuestos, ATP y amonio tienen importancia fisiológica. La energía derivada del catabolismo del aminoácido puede ser acoplada al crecimiento. La producción de amonio contribuiría a un incremento en el pH del medio llevando a una mayor supervivencia de los microorganismos. El objetivo del estudio fue determinar la capacidad de *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, aislado de masa madre panaria, de metabolizar arginina via el sistema arginina deiminasa. Los resultados indican la presencia de un sistema activo en *L. reuteri*. La actividad específica de las tres enzimas involucradas en la vía: ADI, OTC y CK corresponden a 11,74 $\mu\text{moles citrulina mg prot}^{-1} \text{h}^{-1}$, 1,78 $\mu\text{moles citrulina mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 80 $\mu\text{moles amonio mg prot}^{-1} \text{min}^{-1}$, respectivamente.

El sistema arginina deiminasa de *L. reuteri* fue parcialmente caracterizado en extractos libres de células. Máximas actividades enzimáticas se determinaron a pH 5,5 y 65°C, ADI; pH 5,5-7,0 y 40°C, OTC y pH 5,5 y 37°C, CK.

159 - PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO (EPS) POR *LACTOBACILLUS HELVETICUS* EN QUIMIOSTATO: EFECTO DETERMINANTE DEL pH. (Exopolysaccharide (EPS) production by *Lactobacillus helveticus* in chemostat: effect of pH). Torino M.I., Sesma F., and Font de Valdez G. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), 4000 S. M. de Tucumán, ARGENTINA. E-mail: mitorinocerela.org.ar

El empleo de cepas de *Lactobacillus helveticus* productoras de EPS ha adquirido particular interés tecnológico en la elaboración de queso Mozzarella de bajo contenido graso. En este trabajo se evalúa el efecto de la velocidad de dilución ($D=0.025$ y 0.1 h^{-1}) y el pH (4.5 y 6.2) sobre el metabolismo (producción de EPS, crecimiento y patrón de fermentación) de *L. helveticus* ATCC 15807 empleando un sistema de cultivo continuo en caldo MLB definido en nuestro laboratorio, limitado en la fuente de carbono (lactosa). A baja velocidad de dilución ($D=0.025\text{ h}^{-1}$), *L. helveticus* tuvo un crecimiento óptimo a pH 6.2, siendo la viabilidad celular (4.05×10^7 ufc/ml) y la biomasa formada (2.5 g/l) 4.5 y 1.7 veces superiores a las obtenidas a pH 4.5, respectivamente. Sin embargo, una mayor producción de EPS (34 mg/l) y síntesis de ácido láctico (50 mmol/l) se observó en condiciones ácidas, con formación de acetato (2.8 mmol/l) y succinato (0.34 mmol/l). La tinción negativa con tinta china reveló la presencia de EPS adherido a la célula (pH 6.2) pero no al pellet de pH 4.5. A un valor de $D=0.1\text{ h}^{-1}$, aumentaron los parámetros de crecimiento y producción de lactato a ambos valores de pH, con disminución de los productos de fermentación heteroláctica (acetato y succinato). La síntesis de EPS no fue afectada a pH 6.2 observándose un incremento a pH 4.5 (46 mg/l) que duplicó la producción obtenida a pH 6.2. Estos resultados demuestran que la síntesis de EPS por *L. helveticus* ATCC 15807 no ocurre como consecuencia de una menor velocidad de crecimiento, siendo el pH el factor determinante de la producción y/o de las características del polímero.

160 - EFECTO DE GALACTOSA Y GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE BIOSINTESIS DE AZUCARES NUCLEOTIDOS EN *LACTOBACILLUS PARACASEI* CRL 87 (Effect of galactose and glucose on exopolysaccharide production and activities of sugar nucleotides biosynthetic enzymes in *Lactobacillus paracasei* CRL 87). Mozzi F., Rollán, C., Savoy de Giori y Font de Valdez, G. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA). Chacabuco 145, 4000-Tucumán, Argentina. fmozzi@cerela.org.ar

La producción de exopolisacáridos (EPS) microbianos es de gran interés en la industria de alimentos fermentados. Los EPS producidos por las bacterias lácticas (BAL) se debe a las propiedades de sus polímeros y el carácter "GRAS" (Generally Recognized as Safe) de estos microorganismos. En la literatura, los resultados del efecto de la fuente de carbono en la producción de EPS y en la composición química de los polímeros son contradictorios. En este trabajo se investiga el efecto de galactosa y glucosa en la producción de EPS y en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de azúcares nucleótidos, precursores de polisacáridos. *L. paracasei* CRL 87 sintetiza un polímero con alto contenido en ramnosa y menor proporción de glucosa. Usando galactosa como fuente de carbono se obtiene 1.7 veces mayor cantidad de polímero que en presencia de glucosa. Análisis de las enzimas de biosíntesis de dTDP-ram y UDP-glu mostraron una mayor actividad de UDP-glucosa-pirofosforilasa ($12.2\text{ nmoles mg}^{-1}\text{ min}^{-1}$), dTDP-glucosa-pirofosforilasa (56.1) y las enzimas del sistema enzimático de ramnosa (TRS)(20) en extractos de células crecidas en galactosa que en glucosa (7.1 , 29.6 y $5.7\text{ nmoles mg}^{-1}\text{ min}^{-1}$, respectivamente).

161 - BIODEGRADACION DE 2,4-DINITROTOLUENO (2,4-DNT): CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *P. FLUORESCENS* CAPAZ DE BIODEGRADAR 4-METIL-5-NITROCATÉCOL (Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene: construction of a *P. fluorescens* strain that biodegrades 4-methyl-5-nitrocatechol) Monti M. R., Smania A. M. y Argaraña C. E. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. 5000 CORDOBA, ARGENTINA. mmonti@dqbfq.fcq.unc.edu.ar

El 2,4-DNT forma parte de efluentes industriales provenientes de la síntesis de toluendiisocianato (TDI). Un proceso biodegradativo constituye una alternativa de innovación para su eliminación con respecto a los métodos actuales. La vía oxidativa de *Burkholderia cepacia* DNT para mineralizar 2,4-DNT es la mejor caracterizada: una dioxigenasa (dntA) transforma el 2,4-DNT en 4-metil-5-nitrocatecol (MNC); seguidamente una monooxigenasa (dntB) y una reductasa inespecífica producen trihidroxitolueno (THT). Finalmente, una oxigenasa (dntD) abre el anillo aromático. La utilización de *B. cepacea* en bioprocesos constituye una desventaja por su caracterización como fitopatógena y patógena oportunista en humanos. El objetivo del presente trabajo es la construcción de una bacteria con capacidad de biodegradar 2,4-DNT, para lo cual se transfirieron los genes de *B. cepacea* a una cepa de *P. fluorescens*, especie bacteriana con características de inocuidad y capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. En primer lugar, se realizó la transferencia en conjunto de los genes dntB y dntD al cromosoma de *P. fluorescens* mediante eventos de conjugación/transposición utilizando el plásmido pUT-miniTn5 Km. La inserción fue confirmada por PCR así como por ensayos de actividad "in vivo" de ambas enzimas. Se llevaron a cabo distintos estudios analíticos para determinar y caracterizar la capacidad de biodegradar el MNC y THT. Actualmente se trabaja en la transferencia del gen dntA para obtener la cepa *P. fluorescens* con capacidad de mineralizar 2,4-DNT.

162 - CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN UN BIODIGESTOR ANAEROBICO (Molecular monitoring of microbial diversity in an anaerobic wastewater treatment system). Casserly, C. y Erijman, L. INGBE-CONICET. Obligado 2490. Buenos Aires. erijman@dna.uba.ar

El objetivo del trabajo es la comprensión de la estructura de la comunidad microbiana, y su dinámica durante la puesta en marcha de una laguna anaeróbica de tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*). Esta tecnología es aplicada para la depuración de efluentes industriales con muy alto contenido de materia orgánica. El estudio de diversidad microbiana tradicional en estos sistemas complejos está limitado debido a que la mayoría de los microorganismos no pueden ser aislados en cultivos puros. Se optimizaron técnicas moleculares de análisis, basadas principalmente en el marco filogenético dado por la subunidad 16S del ARN ribosomal para caracterizar y cuantificar microorganismos de los dominios *Bacteria* y *Archaea* en función de las condiciones operativas del bioreactor. La mezcla total de ADN genómico fue utilizada como template para la amplificación de fragmentos de la región variable V3 de la subunidad 16S del ARN ribosomal. Las condiciones de amplificación fueron evaluadas respecto de la concentración de ADN, temperaturas y duración de las etapas de desnaturalización y annealing. La separación de fragmentos amplificados por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo un gradiente lineal de desnaturalizantes (DGGE) permitió una caracterización cualitativa de la diversidad microbiana. Por otra parte, la detección e identificación de bacterias reductoras de sulfato (SRB) se efectuó mediante transferencia e hibridación con sondas radioactivas específicas. Finalmente, experimentos de dot-blot utilizando sondas específicas de taxón han permitido avanzar en la cuantificación de las especies metanogénicas predominantes.

Financiado por Fundación Antorchas y FONCyT

163 - SUB-CLONAJE DEL FRAGMENTO DE cDNA PARA LA SUBUNIDAD CATALITICA DE LA ENTEROPEPTIDASA BOVINA PARA SU EXPRESION EN *E. coli* Y EN EL SISTEMA DEL BACULOVIRUS (Sub-cloning of the cDNA fragment for the Catalytic Subunit of Bovine Enteropeptidase for its expression in *E. coli* and in the Baculovirus System). Saez Lancellotti, T. y Kobarg, J. Centro de Biología Molecular Estructural / Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron.

La producción biotecnológica de proteínas en *E. coli* como proteínas de fusión es un poderoso método para su análisis funcional. Cualquier proteína de fusión presenta una secuencia de reconocimiento proteolítico en la región interdominio. Por su alta especificidad y por cortar C-terminal del sitio de reconocimiento, Enteropeptidasa [EC 3.4.21.9] es preferida entre otras proteasas.

Enteropeptidasa ha sido expresada tanto en sistemas pro- como eucariota, rindiendo baja producción de proteasa activa el primero y siendo costoso y sólo apropiado para producción a baja escala el último. Por lo tanto, expresamos la Enteropeptidasa en el sistema del Baculovirus. Primero el cDNA de la subunidad catalítica de la enteropeptidasa bovina fue subclonado en un vector de transferencia, que fue utilizado para co-transfectar células de insecto Sf9 junto con el DNA del Baculovirus. Esto permite la generación de virus recombinantes. La infección de más células con Baculovirus recombinantes induce la expresión de enteropeptidasa y su secreción al medio de cultivo. Con la ayuda de una "histidine tag" la proteína puede ser purificada y concentrada, y así analizar su actividad proteolítica y compararla con la enzima expresada en *E. coli*.

164 - ENZIMAS HIDROLITICAS EN LA PREPARACION DE NUCLEOSIDOS DE INTERES FARMACOLOGICO. (Hydrolytic enzymes in the preparation of nucleosides of pharmacological interest) - Zinni, A.^a, Schmidt, A.^a, Roncaglia, D.^a, Iglesias, L.^{a,b} e Iribarren, A.^{a,b}. a- CEI, Universidad Nacional de Quilmes- Roque Sáenz Peña 180- (1876) Bernal b- INGEPI (CONICET)- Vuelta de Obligado 2490- (1428)- Bs. As. E-mail: leiglesias@unq.edu.ar

En nuestro laboratorio se está investigando el potencial de las enzimas hidrolíticas en biotransformaciones que pueden incorporarse ventajosamente en el proceso de obtención de nucleósidos de interés farmacológico.

Los productos de acilación parcial de nucleósidos antivirales actúan como prodrogas de propiedades farmacocinéticas convenientes para su administración; no obstante, su empleo ha sido limitado debido a que los métodos de preparación de dichos derivados acilados son poco satisfactorios. Así, hemos estudiado la remoción de grupos acilos de diversos nucleósidos peracilados (uridina, 2'-metiluridina, inosina, guanosina) mediante una alcoholisis catalizada por distintas hidrolasas (lipasas, proteasas, esterasas), encontrando que la lipasa B de *Candida antarctica* es un catalizador eficiente para la obtención selectiva de nucleósidos 2',3'-di-O-acetilados con altos rendimientos. Entre varios parámetros experimentales, la presencia de solvente y la estructura de los grupos acilos afectan la selectividad de la biotransformación.

Por otra parte se ha logrado la remoción total y cuantitativa de grupos acetilos en nucleósidos peracetilados mediante una hidrólisis enzimática, bajo condiciones experimentales muy suaves. La aplicación de esta reacción a la obtención del nucleósido biológicamente activo 6-cloropurínribósido, lábil en medio básico, ha permitido optimizar muy satisfactoriamente la preparación de dicho compuesto, descripta en bibliografía con bajos rendimientos.

165 - TRANSFORMACION DE NUCLEOSIDOS BIOCATALIZADA POR *E. coli* BL21: ANALISIS DE LAS VARIABLES DE REACCION. (Nucleosides transformation biocatalyzed by *E. coli* BL21: analysis of the reaction variables). Trelles, J. A.¹, Rogert, M. C.¹, Bentancor, L.¹, Runza, V.¹, Porro, S.¹, Lewkowicz, E.¹, Iribarren, A. M.^{1,2}. 1. Universidad Nacional de Quilmes. R. S. Peña 180, (1876) Bernal, Bs. As., 2. INGEPI, CONICET, Obligado 2490, (1428) Bs. As., E-mail: elewko@unq.edu.ar

De las drogas antivirales la gran mayoría pertenece al grupo de los nucleósidos modificados, éstos además tienen aplicación como precursores de drogas en el campo de la terapia génica. Es posible obtener nucleósidos purínicos modificados a partir de nucleósidos pirimidínicos y bases purínicas en un sólo paso de reacción empleando como catalizador células de microorganismos.

Se ha estudiado como reacción testigo la síntesis de adenosina a partir de uridina utilizando *E. coli* BL21. Las variables analizadas fueron: temperatura, concentración y pH del buffer, concentración absoluta y relativa de reactivos, tiempo de incubación de las células, velocidad de agitación y masa de catalizador, y se ha llegado a obtener rendimientos del orden del 94% en 1 hora de reacción. Además, se ha aislado el nucleósido del medio de reacción por técnicas cromatográficas. Utilizando la misma metodología se han sintetizado algunos desoxirribó, didesoxirribó y arabino nucleósidos a partir de los correspondientes nucleósidos pirimidínicos.

Las enzimas involucradas en estas biotransformaciones pertenecen al grupo de las transferasas, cuya especificidad hacia los sustratos puede variar en los diferentes microorganismos. Debido a ello se están seleccionando cepas capaces de catalizar la síntesis de nucleósidos con amplia diversidad estructural.

166 - SELECCION DE LEVADURAS NATIVAS PARA CULTIVOS INICIADORES VINICOS (Selection of indigenous yeasts to be used as a wine starter). Lopes, C.^{1*}, Rodríguez M.^{1*}, Sangorrín M.^{1*}, van Broock M.^{2*}, Caballero de Castro A.^{1,1*}, Fac. Ingeniería y 2-CRUB. *CONICET. U.N.Comahue. CC 790 (8300) Neuquen, Argentina. clopes@uncoma.edu.ar

El desarrollo de cultivos iniciadores para la conducción de fermentaciones alcohólicas ha sido la aplicación más importante de la biotecnología a la industria vitivinícola. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas nativas de *S. cerevisiae* para su potencial uso en cultivos iniciadores vínicos. Se evaluaron las características fermentativas de 53 aislamientos procedentes de mostos regionales tipo Malbeck frente a dos cepas comerciales. Los ensayos de fermentación se llevaron a cabo en medios semisintéticos conteniendo 20% de sacarosa, a 28°C y pH 3,5 en condiciones semiaeróbicas. El comportamiento killer, la tolerancia al etanol y la actividad β -glucosidásica también fueron evaluados. Se seleccionaron 16 aislamientos cuyos valores de productividad específica (0.37 ± 0.07 g. etanol/g. biomasa h) y poder fermentativo (7.9 ± 0.7 g. etanol/100 ml) resultaron mayores o iguales que los obtenidos con las cepas comerciales. Estos aislamientos presentaron adicionalmente adecuada producción de acidez volátil (0.7 ± 0.1 g/L), buena capacidad de fermentar sacarosa en presencia de 10% de etanol y velocidades de crecimiento en condiciones aeróbicas mayores o iguales a las presentadas por las cepas comerciales. Ninguno de los aislamientos seleccionados presentó actividad β -glucosidasa. Respecto del comportamiento killer el 43,75% de los aislamientos seleccionados presentó actividad killer y el 25% comportamiento killer neutro, características ventajosas desde el punto de vista tecnológico.

167 - ESTRUCTURA DE GELES MIXTOS DE CONCENTRADO DE PROTEINAS DE LACTOSUERO Y MIEL A DISTINTOS PHs. (Structure of mixed gels of whey protein concentrate-honey at different pH). Yamul, D. K.; Lupano C. E. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).- Facultad de Ciencias Exactas, UNLP - 47y116 (1900) La Plata, Argentina. e-mail: mcanon@isis.unlp.edu.ar

Este trabajo fue subvencionado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Las características de los geles de proteínas de lactosuero dependen, entre otras cosas, del pH y de la composición del medio. En este trabajo se prepararon geles por calentamiento de un concentrado proteico de lactosuero comercial y distintas concentraciones de miel, a pH 3,75; 4,20 y 7,00. La estructura de los geles se observó por microscopía electrónica de barrido y se determinó la solubilidad proteica en distintos medios, para ver qué tipos de uniones intervienen en el mantenimiento de la estructura del gel. Las dispersiones sin calentar se analizaron por calorimetría diferencial de barrido. Los geles con miel presentaron poros de menor tamaño, particularmente en los geles preparados a pH 4,20. La miel aumenta la resistencia de las proteínas de lactosuero a la desnaturalización por calor, pero no modificaría apreciablemente el tipo de unión que mantiene la estructura de los geles a pH 3,75 y 7,00, observando un ligero incremento en la solubilidad proteica de los geles de pH 4,20 en agua destilada y en un medio de pH 8 que rompe uniones hidrogeno e hidrofóbicas.

168 - PRODUCCION DE LEVANO UTILIZANDO UNA CEPA MUTANTE DE ZYMOMONAS MOBILIS. EVALUACION PRELIMINAR DE COSTOS DEL PROCESO. (Levan production using a mutant strain of *Zymomonas mobilis*. Preliminary economic evaluation). Muro A.C.¹; Heluane, H.², Rodríguez, E.¹; Abate, C.M.¹ y Siñeriz, F.¹. PROIMI. Av Belgrano y Pje Caseros. ²Dpto. Ing. Química, FACET, UNT. (4.000) Tucumán. E-mail: acmuro@proimi.edu.ar Fax: (0381)4344887.

Z. mobilis es una bacteria gram (-), anaeróbica facultativa, capaz de producir altos rendimientos de etanol a partir de glucosa. Cuando el sustrato es sacarosa además del etanol se forma levano como producto secundario mayoritario. La producción de levano tiene considerable interés económico debido a sus usos, como ser: sustituto de plasma sanguíneo, prolongador del efecto de algunas drogas, fuente de fructosa, inmuno modulador específico, antitumoral, etc. En este trabajo se realizó una evaluación preliminar de los costos para la producción del polímero utilizando un fermentador de 100 l de capacidad y estimando alcanzar una producción de 3 Kg. Cuando se utiliza medio de cultivo mínimo (MM) se requiere para el proceso 1 día de incubación a 30°C seguido de un almacenamiento durante 17 días a 7°C. Con medio complejo (MC), el tiempo de incubación a 30°C es de 3,5 días y no se requiere de incubación a baja temperatura ya que la misma no incrementa la producción. El costo estimado del proceso al utilizar MC sería 6 veces superior al obtenido para MM. Esta evaluación preliminar nos indica que resultaría conveniente utilizar MM para la producción de levano.

169 - CARACTERIZACION TAXONOMICA DE CEPAS DE *Zymomonas mobilis* (Taxonomic characterization of *Zymomonas mobilis* strains). Estévez, C.; Delgado O., Abate, C. y Siñeriz, F. PROIMI, Av. Belgrano y Pje. Caseros, 4000-Tucumán, Argentina. E-mail: cestevez@proimi.edu.ar. Fax: (0381) 4344887.

El género *Zymomonas* posee una sola especie *Z. mobilis* con dos subespecies *mobilis* y *pomacii*. Según el Manual de Bergey las cepas ATCC 29192, NCBI 8777 y 10565 pertenecen a la subespecie *pomacii*, el resto pertenece a la subespecie *mobilis*. Si bien *Z. mobilis* ha sido objeto de numerosos estudios sobre su fisiología, metabolismo y aplicaciones biotecnológicas, el estudio taxonómico sólo se realizó utilizando técnicas tradicionales.

En el presente trabajo se realizaron estudios del perfil plasmídico, perfil genómico por CHEF, RAPD, ITS-PCR, polimorfismo de simple cadena y la secuenciación del gen del ARN 16S de cuatro cepas de *Z. mobilis*, tres provenientes de la colección ATCC y una de la colección de PROIMI (aislamiento realizado en Tucumán).

Los resultados mostraron que los criterios tradicionales para la clasificación de estas cepas son insuficientes. Se observó que la cepa *Z. mobilis* ATCC 29191, actualmente caracterizada como subespecie *mobilis* posee un perfil molecular idéntico a la cepa *Z. mobilis* ATCC 29192 caracterizada como subespecie *pomacii*. Además el aislamiento realizado en Tucumán posee diferentes perfiles en CHEF, plásmidos y RFLP del gen ARN 16S con respecto a las otras tres cepas. Con los resultados obtenidos en la secuenciación del gen del ARN 16S, en el perfil de ITS-PCR y en el polimorfismo de simple cadena del gen ARN 16S, permiten agrupar estas cuatro cepas en una sola especie, *Zymomonas mobilis*.

170 - EFECTO DE LA IRRADIACION CON RAYOS GAMMA SOBRE LAS PROPIEDADES MECANICAS Y LA BIODEGRADABILIDAD DE PELICULAS DE PHA DE DISTINTOS PESOS MOLECULARES (Effect of gamma-radiation on mechanical properties and biodegradation characteristics of PHA-based films of different molecular weights) *Yep Rodríguez A, *Povolo F, *Hermida EB, *Quagliano JC y **Miyazaki SS. Departamento de Biología Aplicada y Alimentos - Facultad de Agronomía - UBA Avda. San Martín 4453 (1417), Ciudad Autónoma de Buenos Aires *E-mail: miyazaki@mail.agro.uba.ar *Unidad de Actividad Materiales - Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros de reserva sintetizados por una variedad de especies bacterianas. Estos polímeros, por sus características de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad tienen importantes aplicaciones potenciales en medicina, agricultura y otros campos.

El objetivo del presente estudio es comparar las propiedades mecánicas y de biodegradación de películas de PHA (poli-β-hidroxibutirato) irradiadas o no, y de películas de PHA de distintos pesos moleculares.

Las películas de PHA fueron realizadas mediante la técnica de casting de soluciones de cloroformo. Una serie de películas fue sometida a irradiación con rayos gamma (2 kGy). La elongación y el módulo de Young fueron medidos en una máquina universal de ensayos Instron 1122.

Se observaron modificaciones en las propiedades mecánicas de las películas irradiadas de dos pesos moleculares (PM) diferentes (1.150.000 y 300.000). La elongación y el módulo de Young aumentaron al irradiar las películas de PM 1.150.000, mientras que dicho efecto no se observó entre películas irradiadas y no irradiadas de PM 300.000.

Finalmente se evaluó la biodegradabilidad de las películas irradiadas en sistemas microbianos, cuantificando la pérdida de peso a distintos tiempos de exposición.

171 - CARACTERIZACION Y PURIFICACION PARCIAL DE METABOLITOS ANTIFUNGICOS DE *BACILLUS* SP.

(Characterization and partial purification of antifungal metabolites from *Bacillus* sp.) **Correa, O.S.**; Souto, G.I.; Pucheu, N.L.; Kerber, N.L. y García, A.F. Facultad de Agronomía. Cátedra de Microbiología Agrícola. Universidad de Buenos Aires. (IByF-CONICET). Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires. correa@mail@agro.uba.ar

Diversas cepas de *Bacillus* sp. Inhiben el crecimiento de los hongos debido a la producción de antibióticos y de enzimas que degradan la pared celular de los mismos. Una cepa de *Bacillus* sp. aislada en nuestro laboratorio como integrante de la microflora superficial de un esclerocio de *Sclerotinia sclerotiorum* libera al medio compuestos antifúngicos al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, con actividad "in vitro" contra *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Aspergillus* sp. Estos compuestos conservan su actividad luego de la exposición a 121 °C por 15 min, tratamientos con proteinasa K, son solubles en acetona al 90%, se precipitan del medio con 65 % de sulfato de amonio, dan reacción de ninhidrina positiva y antrona negativa. Dichos metabolitos no presentaron actividades de celulasas ni de quitinasas.

A partir del precipitado de sulfato de amonio al 65 % se realizó una purificación parcial por cromatografía en columna de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel), eluida con un gradiente 0-500 mM NaCl y obteniéndose tres picos a 280 nm: P1, P2 y P3; sólo P3 mostró actividad antifúngica. P3 en columna de exclusión molecular (Sephacryl S-200 HR) eluida con 10 mM TrisHCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, se resolvió como un único pico de absorbancia a 280 nm, de tamaño molecular aparente de 200.000 Da y que conservó la actividad antifúngica. Nuestros resultados sugieren la utilidad potencial de esta cepa y/o sus metabolitos en el control de hongos patógenos de plantas.

172 - INFLUENCIA DE INHIBIDORES DE β -D-GALACTOFURANOSIDASA EN LOS CULTIVOS DE *Penicillium fellutanum* SECRECION DE MACROMOLECULAS Y MODIFICACIONES EN LA ESTRUCTURA CELULAR DE LAS HIFAS

(Influence of inhibitors of β -D-galactofuranosidase in cultures of *Penicillium fellutanum*. Secretion of macromolecules and modifications in hyphal cell structure). **Mariño K.**, Lima C., Maldonado S.¹, Marino C. and Lederkremer R.M. CIHIDECAR. Dpto. de Química Orgánica, FCEyN, UBA. Pab. II, Ciudad Universitaria, 1428. Bs. As., Argentina; ¹Instituto de Recursos Biológicos, INTA, 1712. Castelar, Pcia. de Bs. As., Argentina.

Las enzimas que intervienen en el metabolismo de glicoconjugados con galactofuranosa son de creciente interés por su presencia en microorganismos y su ausencia en células de mamíferos. En el presente trabajo describimos la acción de inhibidores de una exo- β -D-galactofuranosidasa (Marino et al, 1998, Glycobiology, 8, 901-904) en cultivos de *Penicillium fellutanum*, que secreta al medio dicha enzima. La presencia de estos inhibidores, entre ellos D-galactono 1,4-lactona, disminuye drásticamente la producción de la enzima y los cultivos aparecen turbios. El estudio por microscopía óptica de los micelios obtenidos mostró, a diferencia de los cultivos control, hifas de tamaño irregular y células levaduriformes; las observaciones por microscopía electrónica de transmisión también evidenciaron grandes diferencias. Debido a que el material insoluble del medio contiene glucosa como hexosa mayoritaria (determinada por cromatografía gas-líquido) y tomando en cuenta que los constituyentes principales de las paredes celulares de hongos son β (1 $\rightarrow$ 3) glucanos, se utilizó un complejo oro-laminarinasas que permitió localizar estas estructuras en vesículas periféricas y en el ápice de las hifas.

Financiado por CONICET, ANPCyT y UBA.

173 - EL HONGO *Mucor rouxii* COMO CATALIZADOR EN LA REDUCCION DE COMPUESTOS CARBONILICOS POLIFUNCIONALES. DISTINTAS ESTRATEGIAS DE CONSERVACION

(The fungus *Mucor rouxii* as catalyst in polyfunctionalized carbonyl compounds reduction. Different strategies of preservation). **Mangone, C. P.^a**; Pereyra, E. N.^b; Argimón, S.^b; Moreno de Colonna, S. M.^b y Baldessari A.^a

^aDepartamento de Química Orgánica y UMYMFOR, Piso 3. ^bDepartamento de Química Biológica, Piso 4. FCE y N, UBA, Pabellón 2, Ciudad Universitaria. cpm@qo.fcen.uba.ar

Estudios previos realizados con cultivos frescos de *Mucor rouxii* mostraron su gran utilidad como biocatalizador en la reducción quimio- y enantioselectiva de β -cetoésteres. Los cultivos frescos presentan la limitación práctica de que la biomasa debe ser cosechada inmediatamente antes de realizar las incubaciones con el sustrato. Con el objeto de evitar este inconveniente se emplearon diferentes estrategias de conservación de la biomasa de *Mucor*. Se utilizaron como biocatalizador directamente las esporas, o biomasa proveniente de cultivo fresco deshidratada por dos métodos diferentes. Se analizó la influencia en la reacción de distintos parámetros: a) relación sustrato/biomasa, b) polaridad del solvente, c) tiempo límite de conservación del liofilizado y d) otras variantes de deshidratación como liofilización en presencia y ausencia de trehalosa y secado por corriente de aire caliente. La eficiencia y selectividad lograda utilizando estos procedimientos fue similar a la obtenida con cultivos frescos, lográndose la reducción completa quimio- y enantioselectiva del grupo cetónico a alcohol sin alterar a la función éster.

Agradecemos a CONICET por una beca a CPM y por ayuda financiera parcial.

174 - QUIMICA DE ESTADO SOL-GEL UNA ALTERNATIVA A LA MODIFICACION QUIMICA DE SUPERFICIES DE SILICIO. TECNOLOGIA DE RECUBRIMIENTO Y ATRAPAMIENTO DE BIOMOLECULAS

(sol-gel chemistry an alternative to chemically modified silicon surface. Encapsulation of proteins). **Desimone, M.F.**, Iglesias S., Díaz, L.E. FFyB. Q. Anal. Instrumental

Las enzimas pueden ser físicamente atrapadas y/o microencapsuladas en matrices poliméricas. Para una óptima estabilidad y rendimiento de la reacción catalítica, la preferida matriz huésped sería aquella que pudiese aislar la biomolécula, protegiéndola de una auto-degradación y del ataque microbiológico, al mismo tiempo de asignarle un microentorno similar a un medio biológico. Investigaciones recientes han demostrado que vidrios de silicato obtenidos por técnicas de sol-gel retienen sus características funcionales. Silicatos preparados por el método tradicional de fusión no resultan adecuados para la mayoría de los "dopings" orgánicos dadas las altas temperaturas requeridas en el proceso. La matriz de silicato es generalmente formada por hidrólisis de un precursor alcóxido seguido de condensación para dar puentes oxo en un entorno de SiO₂. Durante el proceso moléculas del correspondiente alcohol son liberadas. Se presentaron los resultados obtenidos al intentar la inmovilización de la enzima ureasa mediante encapsulamiento en una matriz obtenida por polimerización de distintos alcoxisilanos, en condiciones experimentales que no afecten la actividad enzimática. Aprovechando las propiedades mecánicas de estos materiales, también se realizó la polimerización de dos monómeros tetratoxisilano y amino propiltriethoxi-silano este último unido covalentemente a un colorante (Cibacron blue) que posee afinidad por albúmina, permitiendo la obtención de un material sólido con afinidad por albúmina en este caso. Agradecimientos D.M.F. Beca estímulo U.B.A. Subsidio U.B.A. AB28

175 - 2'-C-METILNUCLEOTIDOS: SINTESIS E INCORPORACION EN OLIGONUCLEOTIDOS. (2'-C-Methylnucleotides: Synthesis and Introduction in Oligonucleotides). Gallo, M.[†]; Torres, H.[†] e Iribarren, A.[‡]. [†]INGEBI, Vuelta de Obligado 2490 2º Piso (1428), Buenos Aires, Argentina. [‡] UNQ, Roque Sáenz Peña 180 (1876), Bernal, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

El desarrollo de la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida ha posibilitado la obtención de grandes cantidades de oligonucleótidos necesarias para estudios estructurales (espectroscopía de RMN y cristalografía de rayos X) y para propósitos terapéuticos en el marco de la estrategia antisentido. En este último caso, es importante el desarrollo de modificaciones químicas que provean tiempos de vida adecuados para el uso de oligonucleótidos como drogas. El desarrollo de análogos de RNA es de interés para el diseño de ribozimas, de inhibidores de ribozimas y de aptámeros.

De las modificaciones desarrolladas hasta ahora, ninguna conserva el hidroxilo 2', grupo funcional que demostró ser esencial para todas aquellas estructuras en donde la conformación terciaria es importante para la actividad. Aquí se presenta el desarrollo químico para la obtención de los monómeros necesarios para la síntesis en fase sólida de 2'-C-metilnucleótidos, primera modificación química de nucleótidos que conserva el hidroxilo 2'. Se muestra una nueva ruta para la obtención de la 2'-C-metiluridina, altamente estereoselectiva respecto a la formación del isómero arábino, así como también la adecuada protección del OH-2'. La síntesis de la fosforamidita correspondiente y su incorporación en oligonucleótidos.

176 - MEMBRANAS CROMATOGRÁFICAS TENTACULARES DE INTERCAMBIO IÓNICO (Ion-exchange tentacle chromatographic membranes) Ventura¹, A.M., Carbajal¹, M.L., Cascone², O. y Grasselli¹, M. ¹Dpto. de Ciencia y Tecnología. Univ. Nac. Quilmes. R. Sáenz Peña 180 (1876) Bernal. Pcia. de Buenos Aires. ² Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología. Fac. de Farmacia. UBA. E-mail: mgrasse@unq.edu.ar

La cromatografía realizada sobre soportes convectivos como son las membranas macroporosas, permite disminuir el tiempo del proceso de recuperación de proteínas en por lo menos un orden de magnitud. La baja capacidad, su principal inconveniente, pudo ser salvado por el desarrollo de membranas "tentaculares" que incrementan la superficie de interna de adsorción.

En el presente trabajo se describe la performance de diferentes membranas de fibra hueca de intercambio de cationes (sulfónicas) con proteínas modelo de diferente peso molecular.

Se obtuvieron membranas de 45 a 300 µmoles/ml de ligandos sulfónicos, que presentaron una capacidad estática de 60 a 130 mg/ml para lisozima, 67 a 97 mg/ml para ovoalbúmina, 50 a 65 mg/ml para conalbumina y 10 a 20 mg/ml para inmunoglobulinas cuando se enfrentaron estas proteínas a membranas con diferente densidad de ligando. Se encontraron relaciones inversas entre la capacidad de la membrana y el peso molecular de la proteína y entre el flujo de filtración y la capacidad de adsorber proteínas, especialmente en aquellas de menor peso molecular. Las membranas de menor capacidad relativa mostraron una menor variación de flujo cuando se utilizaron soluciones de molaridad creciente. Se preparó un cartucho de 9 fibras de 9 cm (0,6 ml de volumen de matriz) de membranas sulfónicas (densidad de ligando = 100 µmoles/ml). El cartucho se utilizó para recuperar lisozima de clara de huevo diluida al sexto (concentración proteica total mayor a 50 mg/ml). Se filtraron 43 ml de la dilución de clara de huevo, quedando completamente depletada de lisozima. Después de un lavado con agua destilada, se eluyeron 18 mg de lisozima por aumento de la fuerza iónica del eluyente. Su pureza, determinada por HPLC, fue mayor del 90%.

177 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON COLORANTES TRIAZINICOS INMOVILIZADOS SOBRE SOPORTES DIFUSIVOS Y CONVECTIVOS (Dye-affinity chromatography on diffusive and convective supports). Wolman E.J., Navarro del Cañizo A.A., Iannucci N.B., Grasselli M¹, Cascone O. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. ¹Universidad Nacional de Quilmes.

La cromatografía de afinidad pseudobioespecífica que usa colorantes triazínicos como ligando constituye una opción conveniente para la purificación de proteínas por su bajo costo, fácil reacción de inmovilización y aceptable selectividad y capacidad. Tradicionalmente estos ligandos se han unido a matrices particuladas donde la adsorción de proteína al ligando está gobernada fundamentalmente por procesos difusivos. En el caso de utilizarse como soporte membranas (en este caso de fibra hueca), el ligando seleccionado queda inmovilizado en la superficie interna de los poros que son accesibles por flujo convectivo a la unión de las biomoléculas, mejorándose significativamente la productividad del proceso.

Para seleccionar el ligando a emplear se realizó un *screening* de colorantes inmovilizados a Sepharose. Se ensayaron 10 colorantes para la purificación de una proteasa ácida (quimosina recombinante) y 22 para la purificación de una proteasa neutra de origen fúngico contenida en un preparado comercial (*Flavourzyme*). El Red F5B, el Red HE-3B y el Yellow HE-4R mostraron la mejor performance. Los colorantes seleccionados fueron inmovilizados a través de la aminación de las membranas previamente activadas. Los flujos medidos en las membranas derivatizadas no disminuyeron respecto de las membranas originales.

Los resultados de adsorción y elución en las matrices convectivas son comparables con los resultados previos obtenidos con matrices particuladas.

178 - CRECIMIENTO DE *Kluyveromyces lactis* EN SUERO LÁCTEO (Growth of *Kluyveromyces lactis* in whey) Cortassa, S. y Franco, M.G. Instituto Tecnológico de Chascomús, (INTECH/CONICET) C.C. 164, 7130-Chascomús, Buenos Aires, ARGENTINA. E-mail: maaon@criba.edu.ar

Se realizaron estudios de flujos metabólicos de la levadura *K. lactis* creciendo en suero a fin de optimizar el desempeño de la misma durante la transformación de componentes del suero lácteo en biomasa. *K. lactis* (Crabtree positiva) creció en suero lácteo completo sin suplementación alguna, siendo lactosa la principal fuente de carbono. Los otros nutrientes mayores, nitrógeno, fósforo y azufre, fueron suministrados por compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el suero. La suplementación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y K_2PO_4 no introdujo diferencias en velocidad de crecimiento, consumo de lactosa y rendimiento en biomasa.

Las levaduras usaron intensivamente el carbono suministrado por el suero lácteo completo, no solo en forma de lactosa sino de otros componentes como aminoácidos y lípidos. Los cocientes respiratorios observados, cuando se cultivaron células de *K. lactis* en batch y batch-alimentado, correspondieron a valores de 0,8-0,85 indicando un consumo mixto de compuestos orgánicos de alto grado de reducción. Los lípidos utilizados fueron catabolizados dadas las altas velocidades específicas de consumo de O_2 y producción de CO_2 .

Estos estudios contribuyen al diseño de un proceso (medio y condiciones de cultivo, organismo) para transformar eficientemente el carbono presente en el suero (fundamentalmente como azúcar), en biomasa rica en proteína. Esto último implica aumentar el valor biológico del subproducto de la industria quesera para su uso como suplemento nutricional animal.

179 - DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA VIRUS HANTA. (Development and characterization of monoclonal antibodies against *Hantavirus*). **Jamett, A.,** Tischler, N., Roseblatt, M. y Valenzuela, P. Bios Chile I.G.S.A., Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio MIFAB, Avenida Marathon 1943, Santiago.

Una de las cinco especies de virus Hanta, causante del Síndrome Pulmonar Agudo (HPS), es el virus Andes. Este es un virus de la familia *Bunyaviridae* que posee un genoma de RNA de hebra simple que se caracteriza por poseer una alta virulencia y provocar mortalidades del 50% en humanos infectados. La transmisión del virus se produce principalmente por la inhalación de aerosoles de heces, orina o saliva de roedores portadores. Los altos índices de mortalidad en humanos infectados, es el reflejo de la ausencia de tratamientos efectivos en las primeras etapas de la infección.

Con el propósito de identificar epítomos virales capaces de ser neutralizados en esta etapa de la infección, se desarrollaron anticuerpos monoclonales (AMCs) contra la proteína completa y péptidos sintéticos de la nucleocápside (N1), y también contra un péptido sintético de la glicoproteína G1, de la envoltura del virus. La selección de los AMCs producidos, se realizó por ELISA y *Western Blot* contra los antígenos descritos. Como resultado de estos ensayos se seleccionaron 13 AMCs específicos anti nucleoproteína completa y 10 contra el péptido N1. Estos AMCs reconocen epítomos diferentes, comprobados mediante ensayos con péptidos sintéticos correspondientes a distintas secuencias aminoácidas. Estudios preliminares sugieren que 3 AMCs obtenidos contra el péptido G1, reconocerían diferentes epítomos en el péptido. La utilización de estos anticuerpos en futuros ensayos de neutralización, permitirá identificar los epítomos relevantes para diseñar un suero capaz de controlar la fase aguda de la infección por virus Hanta. Además constituyen una buena herramienta para el desarrollo de métodos específicos de diagnóstico.

180 - DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL VIRUS DE LA NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA (IPNV). (Development and characterization of monoclonal antibodies against the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)). **Jamett, A.,** Miquel, A., Aguayo, J., Valenzuela, P. y Burzio, L.O., Bios Chile I.G.S.A., Fundación Ciencia para la Vida e Instituto Milenio MIFAB, Avenida Marathon 1943, Santiago.

El virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV), es un virus con un genoma de RNA de doble hebra de la familia *Birnaviridae* y es el agente etiológico de una enfermedad que afecta gravemente a la industria salmonera, pudiendo generar cuantiosas pérdidas económicas. Estudios iniciales en Chile han demostrado prevalencia del serotipo viral Sp, sobre el VR-299. Por esta razón, es imprescindible contar con métodos rápidos y específicos de diagnóstico. Con este propósito se obtuvo un panel de anticuerpos monoclonales contra el IPNV, empleando como antígeno preparaciones de virus crecido en células CHSE-214 y concentrado por ultracentrifugación. La selección de estos anticuerpos se realizó mediante ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Células CHSE-214 infectadas con IPNV y riñones de salmónes infectados, se analizaron por IFI empleando el panel de anticuerpos monoclonales. Como resultado de estos ensayos se seleccionaron 13 anticuerpos específicos contra IPNV.

Posteriormente, estos anticuerpos fueron caracterizados por análisis de *Western Blot* y se encontró que cuatro anticuerpos reconocen la proteína VP2, dos de ellos reconocen la proteína VP3 y uno de ellos reconoce la proteína VP1, tanto del serotipo SP como del VR-299.

Estos anticuerpos constituyen una poderosa herramienta para el desarrollo de métodos de diagnóstico de IPNV tanto IFI como ELISA.

181 - DESARROLLO DE UN ELISA-PCR PARA LA DETECCION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (Development of an ELISA-PCR assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*). **Flores, C.,** Müller, I. and Burzio, L.O., Bios Chile I.G.S.A. y Fundación Ciencia para la Vida, Avenida Marathon 1943, Santiago.

Mycobacterium tuberculosis es el principal causante de la tuberculosis en humanos, enfermedad crónica y altamente infecciosa. Según una estimación hecha por la OMS, en 1994 habían más de 1.500 millones de personas infectadas con el patógeno, por lo que es necesario contar con un método de detección mucho más sensible y específico que el usado actualmente.

Mediante PCR se logró amplificar un fragmento proveniente de la región IS6110 del genoma de *M. tuberculosis*. La incorporación de digoxigenina-11'-dUTP en la mezcla de reacción permitió la detección del producto de PCR en una microplaca de ELISA. Para esto fue necesario la utilización de un oligonucleótido biotinilado en el extremo 3' que tiene la secuencia complementaria a una de las hebras del amplicón. La unión de este oligo de captura a la placa se realizó mediante el uso de estreptavidina adherida a la superficie del plástico previamente recubierto con el adhesivo biológico del *Aulacomya ater*. Una vez hibridado el producto de amplificación al oligonucleótido de captura, la detección del amplicón se realizó mediante el uso de un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa y una reacción colorimétrica posterior. Con este sistema fue posible la detección de una copia del fragmento amplificado, lo que equivale a la décima parte de una bacteria, ya que el elemento IS6110 se encuentra repetido 10 a 12 veces en el genoma. Además se encontró un 100% de correlación con resultados obtenidos en muestras doble ciego provenientes del ISP, usando el test de Pharmagen.

182 - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE GENES DE CEPAS CHILENAS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA EQUINA. (Isolation and characterization of equine influenza virus genes from Chilean strains). **Müller, I.,** Jaureguierry, B. y Valenzuela, P., Bios Chile I.G.S.A., Fundación Ciencia para la Vida, Avenida Marathon 1943 y Verterquímica S.A. Camino a Melipilla 5641, Casilla 81. Los Cerrillos, Santiago.

La influenza equina es provocada por el virus de la influenza tipo A. Este virus tiene RNA como genoma y pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Esta clase de virus se ha aislado de humanos, pájaros, cerdos y caballos, incluso esta última especie es un reconocido reservorio. El virus posee varios antígenos de superficie como hemaglutinina y neuroaminidasa, los cuales median la absorción y penetración del virus estimulando la producción de anticuerpos neutralizantes. Existen dos tipos de virus de influenza equina, estos son A/Equi-1/Praga/56 denominado más comúnmente H7N7 y el A/Equi-2/Miami/63 denominado H3N8. Estos virus han sido secuenciados.

Uno de los mecanismos de evasión del sistema inmune que presentan los virus de influenza es la variación antigénica. Esta puede ocurrir a través de mutaciones que cambian de manera gradual estos antígenos de superficie o puede ocurrir a través de recombinaciones genéticas con cambios antigénicos bruscos y de mayor importancia los cuales generan una nueva cepa.

En Chile se han aislado los subtipos H7N7 (A/Equi-1/Santiago/77) y H3N8 (A/Equi-2/Santiago/85) de los cuales se desconoce en gran medida la secuencia de sus genes.

Nosotros hemos aislado a partir de estas dos cepas chilenas tres genes virales de interés para potenciales desarrollos de vacunas genéticas que codifican la hemaglutinina (HA), la nucleoproteína (NP) y la neurominidasa (NA). Estos genes se han secuenciado y comparado con secuencias publicadas de virus relacionados. Hemos encontrado que la nucleoproteína es un gen bastante conservado, y que el gen de la hemaglutinina presenta algunas diferencias con la secuencia del gen publicada para la cepa chilena Santiago/85.

183 - LA ACTIVIDAD DE UNA β -1,3-GLUCANASA DE TUBERCULO DE PAPA ESTA ASOCIADA A UNA PATATINA.

(An acidic 1,3-glucanase from potato tubers appears to be patatin). Tonón C.*, Machinandiarena M. F., Oliva C. y Daleo G. Instituto de Investigaciones Biológicas. FCEyN. UNMdP. CC 1245 (7600) Mar del Plata, Argentina. *Prof. Asist. de CIC.

Se piensa que las β -1,3-glucanasas y quitinasas tienen un rol en la defensa de las plantas contra enfermedades producidas por hongos ya que son componentes mayoritarios de la pared celular de muchos de ellos. A partir de rodajas de papa infectados con *P. infestans* durante 120 horas por diferentes métodos cromatográficos se purificó una β -1,3-glucanasa ácida. Algunas características indican que la β -1,3-glucanasa es una patatina: el peso molecular (40 kDa) y el pI entre 4-4.5 de la enzima purificada corresponden al de patatinas. La secuencia de aminoácidos del NH₂-terminal y de distintos digestos tripticos presentó un total grado de homología con patatina. Esta proteína se induce específicamente por infección y tiene actividad antifúngica in vitro. Las patatinas son proteínas de reserva del tubérculo de papa y está demostrado que tienen actividad de esterasas. Sin embargo, se desconocen la(s) función(es) u otras actividades enzimáticas de la patatina. En la bibliografía no hay antecedentes sobre patatinas con actividad de β -1,3-glucanasas en ningún sistema planta-patógeno estudiado.

Panel 111

PLANTAS

184 - CLONADO Y EXPRESION DE UN GEN DE SACAROSA-FOSFATO SINTASA DE *Anabaena* sp. PCC 7120 (Cloning and expression of a sucrose-phosphate synthase gene from *Anabaena* sp. PCC 7120). Cumino, A.C., Vargas, W.A. y Salerno, G.L. - Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600-Mar del Plata - Argentina - fibamdq@infovia.com.ar

En nuestro laboratorio se demostró que la biosíntesis de sacarosa en cianobacterias (*Anabaena* sp. PCC 7119 y *Synechocystis* sp. PCC 6803) tiene lugar, como en plantas, por acción de las enzimas sacarosa-fosfato sintasa (SPS) y sacarosa-fosfato fosfatasa, y se identificó y caracterizó el primer gen cianobacteriano que codifica SPS (*spsA*) de *Synechocystis*. El objetivo de este trabajo fue buscar otros genes de SPS, contribuyendo al estudio evolutivo del metabolismo de sacarosa. Los ensayos utilizando sondas heterólogas de SPS no dieron resultados positivos. Recientemente se publicó la secuencia del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. A partir de comparaciones con las secuencias conocidas de SPSs se encontró un marco de lectura abierto (MLA) con una identidad del 40 %. Se diseñaron oligonucleótidos y se amplificó por PCR un fragmento de DNA (2350 pb) conteniendo el MLA, que se clonó en un vector pGEM-T, el que confirió actividad SPS a *Escherichia coli*. La enzima expresada en *E.coli* fue purificada y caracterizada bioquímicamente. Este nuevo gen *spsA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 es importante por ser el primero de una cianobacteria filamentosas fijadora de dinitrógeno, y por ser el más pequeño conocido, demostrándose una secuencia catalítica mínima. Apoyado por ANPCyT, FIBA, UNMDP, CONICET

186 - SACAROSA SINTASA DE *Anabaena variabilis*: SECUENCIACION Y EXPRESION DEL GEN *susA* (Sucrose synthase from *Anabaena variabilis*: sequencing and expression of the *susA* gene). Curatti, L., Giarocco, L., Cumino, A. y Salerno, G.L. Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600 Mar del Plata - Argentina - fibamdq@infovia.com.ar

Las cianobacterias son procariontes capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y metabolizar sacarosa mediante reacciones bioquímicas similares a las plantas. Sin embargo, se han reportado importantes diferencias en cuanto a la estructura y las propiedades bioquímicas de algunas de las enzimas intervinientes. Se ha propuesto que la sacarosa sintasa (SuS: UDP-glucosa 2- α -D glucosiltransferasa) cumple el rol de síntesis de sacarosa en *Anabaena variabilis*. En este trabajo se clonó y secuenció el gen *susA* de *A. variabilis*, que resultó codificar un polipéptido de 806 aminoácidos con 96% de identidad con respecto al gen de *Anabaena* sp. 7119 (Curatti et al. 2000) y 7120 (Genoma de *Anabaena*, 2000). *SusA* fue expresada en *E. coli*, y la proteína de fusión SuSA::His₆ obtenida fue purificada. Las propiedades bioquímicas de esta enzima resultaron similares a las descriptas para SuSA de *Anabaena* sp. 7119. El patrón de expresión de SuSA en distintas condiciones fisiológicas también fue similar al de *Anabaena* sp. PCC 7119. Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado el papel de SuSA en el clivaje de sacarosa en *Anabaena* sp. PCC 7119. Los resultados del presente trabajo sugieren una revisión del rol propuesto para SuSA en *A. variabilis*. Apoyado por ANPCyT, FIBA, UNMDP, CONICET

185 - IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL GENE DE LA GLUCOGENO SINTASA DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Identification and characterization of a glycogen synthase gene from *Synechocystis* sp. PCC 6803). Pozzoli, C., Curatti, L. y Salerno, G.L. - Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600 Mar del Plata - Argentina - fibamdq@infovia.com.ar

El glucógeno, principal hidrato de carbono de reserva en bacterias, se acumula en las cianobacterias como corpúsculos entre los tilacoides. Las enzimas que intervienen en su metabolismo no han sido caracterizadas aún en estos microorganismos. El objetivo del trabajo fue identificar un gen que codifique una glucógeno sintasa (GS) de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC6803 cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado. Se encontraron dos marcos de lectura abiertos (*sll1393* y *sll0945*) con 46% y 35% de identidad con la GS de *Vigna unguiculata*, y 32% y 33% respecto de *Escherichia coli*. Se amplificó por PCR un fragmento de DNA conteniendo el *sll1393* y se clonó en un vector pGEM-T que confirió actividad GS a *E. coli*, diferenciada temporalmente de la actividad endógena. La enzima expresada en *E. coli* fue parcialmente purificada y caracterizada bioquímicamente. Además, se midieron la acumulación de glucógeno y la actividad GS en distintas fases de crecimiento de *Synechocystis* y en células sometidas a "shock" salino. El patrón de acumulación de glucógeno y la actividad GS concuerdan con el rol del polisacárido como compuesto de reserva y fuente de carbono para la formación de osmoprotectores durante el estrés salino. Apoyado por ANPCyT, FIBA, UNMDP, CIC, CONICET

187 - SINTESIS DE TREHALOSA EN *Euglena gracilis*. PROPIEDADES DE LA TREHALOSA-6P FOSFATASA. (Trehalose synthesis in *Euglena gracilis*. Properties of trehalose-6P phosphatase.). Fiol, D. y Salerno, G.L. - Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC 1348 7600-Mar del Plata - Argentina. fibamdq@infovia.com.ar

La acumulación de trehalosa, disacárido no reductor presente en organismos de todos los reinos, está asociada principalmente, a condiciones de estrés, presentando probadas propiedades de protección de estructuras celulares. En *E. gracilis*, la síntesis de trehalosa se produce por acción sucesiva de la trehalosa-6P sintasa (TPS) y la trehalosa-6P fosfatasa (TPP). Los estudios previos sobre la TPS se complementan con el presente trabajo sobre la purificación parcial y caracterización de la TPP. Empleando distintas estrategias de purificación no fue posible separar las actividades TPS y TPP, lo que sugiere la existencia de un complejo macromolecular, similar al encontrado en *Saccharomyces cerevisiae*. La TPP mostró alta especificidad con la trehalosa-6P ($K_m = 0,7$ mM) y un requerimiento absoluto de Mg^{2+} ($K_s: 2,2$ mM). Los inhibidores usuales de fosfatasa, fluoruro, vanadato y molibdato, fueron capaces de inhibirla sólo un 50%. La masa molecular del aparente complejo se estimó en 200-220 kDa mediante columnas de filtración por gel. Anticuerpos preparados contra TPS-TPP copurificadas en geles nativos revelaron en inmunoensayos dos polipéptidos, uno de 80 kDa, correspondiente a la TPS según se determinó mediante geles activos, y otro de 25 kDa, peso similar a la TPP de *E. coli*. Los resultados indicarían que el complejo TPS/TPP estaría conformado por dos subunidades de cada polipéptido. Apoyado por ANPCyT, FIBA, CONICET.

188 - REGULACION DE LA ACUMULACION DE OLIGO-SACARIDOS EN RESPUESTA A SAL EN *Anabaena* (Regulation of oligosaccharide accumulation in response to salt in *Anabaena*). Vargas, W., Pontis, H.G. y Salerno, G.L. Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - CC.1348, 7600 Mar del Plata - Argentina - fibamdq@infovia.com.ar

En la adaptación a ambientes de alta salinidad, las cianobacterias acumulan sustancias de bajo PM, compatibles con el metabolismo celular; en algunas cepas moderadamente halotolerantes es sacarosa. En nuestro laboratorio se había demostrado que *Anabaena* sp. PCC7119, cianobacteria filamentosa fijadora de nitrógeno, sintetiza también polisacáridos conteniendo fructosa en presencia de NaCl. En este trabajo se estudió la síntesis de sacarosa y de dichos oligosacáridos en cepas de *Anabaena* en relación a la fuente de nitrógeno, y en dos mutantes, una que tiene interrumpido el gen de sacarosa sintasa (*susA*-) y otra, sensible a sal (*orrA*-). Se demostró que la acumulación de los oligosacáridos es similar en la cepa salvaje y en *susA*-, a pesar que ésta acumula más sacarosa. El patrón de los polímeros en presencia de sal es igual para células creciendo en nitrato o fijando dinitrógeno. La mutante *orrA*- no sintetiza oligosacáridos aunque acumula sacarosa normalmente, lo cual no sería suficiente para que actúe como osmoprotector. Dado que *OrrA* se identificó como un regulador de respuesta de sistemas de dos componentes en *Synechocystis*, un sistema de este tipo estaría implicado en la biosíntesis de los polímeros. Se hicieron también estudios preliminares sobre la biosíntesis de los oligosacáridos. Apoyado por ANPCyT, FIBA, UNMDP, CONICET

189 - TRANSDUCCION DE SEÑALES MEDIADA POR HIDRATOS DE CARBONO EN HOJAS DE TRIGO (Carbohydrate-mediated signal transduction in wheat leaves). Martínez Noël, G., Tognetti, J.A. y Pontis, H.G. - Centro de Investigaciones Biológicas, FIBA - CC.1348, 7600 Mar del Plata, Argentina - fibamdq@infovia.com.ar

Los azúcares son importantes fuentes de energía y componentes estructurales en las plantas. Recientemente se demostró que también participan en la represión/activación de genes, aunque poco se conoce sobre los mecanismos bioquímico-moleculares subyacentes. En nuestro laboratorio se eligió el sistema de hojas de trigo cortadas para estudiar la transducción de señales mediada por azúcares debido a la fuerte inducción de las actividades enzimáticas que sintetizan fructanos (ISST, sacarosa-sacarosa-fructosiltransferasa, y 6SFT, sacarosa-fructan-fructosiltransferasa). Con el agregado de sacarosa (Sac), las actividades enzimáticas y la síntesis de fructanos aumentan en mayor proporción en las variedades más tolerantes a bajas temperaturas. El efecto es menor con otros azúcares, no observándose con azúcares no-metabolizables y/o no-fosforilables. La inducción involucraría transcripción y traducción *de novo* ya que es anulada por inhibidores específicos. Además, se comprobó una fuerte inducción de los RNA-mensajeros de la 6SFT por sacarosa. El agregado de ácido okadaico, w7 y estaurosporina inhibe en diferentes niveles la inducción por Sac, sugiriendo que proteinquinas (posiblemente dependientes de calmodulina y Ca^{2+}), y -fosfatasa intervendrían en la transducción de la señal, como reguladores positivos. Estos resultados indican que los genes de la síntesis de fructanos estarían regulados por azúcares y que el sistema empleado ha sido útil para este estudio. Apoyado por FIBA, UNMDP, CONICET

190 - EFECTO DEL PESTICIDA ORGANOFOSFORADO METILAZINFOS SOBRE PARAMETROS FISIOLOGICOS DE PLANTAS DE ALFAFA (*Medicago sativa*). Effect of organophosphate pesticide azinphos-methyl on physiological parameters of alfalfa plants (*Medicago sativa*). Flocco¹, C.G., Carranza¹, M.P., Pechén de D'Angelo², A.M. & Giulietti¹, A.M. ¹Cátedra de Biotecnología, Fac. Farm. y Bioq. U.B.A. Junín 956 6° piso (1113) Buenos Aires. ² LIBIQUIMA, Fac. Ingeniería, Univ. Nac. del Comahue, Neuquén. e-mail: flocco@ffyb.uba.ar

Resumen: Metilazinfos (Azinphos- methyl) es un pesticida organofosforado no sistémico, de amplio espectro y altamente persistente, utilizado en aplicaciones foliares para combatir insectos que afectan a una gran variedad de cultivos y especies ornamentales. En nuestro país es utilizado principalmente en la zona del alto valle de Río Negro. Este pesticida se adsorbe fuertemente a las partículas del suelo y posee una baja solubilidad en agua. Puede afectar la vida silvestre siendo mas vulnerables los organismos acuáticos y mamíferos. La biodegradación y la evaporación son las principales vías de remoción del pesticida. Por lo anteriormente expuesto, resulta de interés el estudio de sistemas biológicos capaces de degradar este pesticida. Con este objetivo se realizaron ensayos con cultivos hidropónicos de alfalfa, seleccionando esta especie vegetal por su capacidad de favorecer el desarrollo de la flora microbiana y la degradación de contaminantes orgánicos. En primera instancia se estudiaron los efectos agudos del metilazinfos sobre el vegetal, en un ensayo de 7 días. Se evaluó el índice de crecimiento, la concentración de clorofila y la actividad de enzimas relacionadas con procesos de estrés (peroxidasa) en raíces y hojas. Posteriormente se realizaron ensayos a mas largo plazo evaluando la remoción del pesticida.

191 - CARACTERIZACION DE DOS GENES DE LA ENZIMA UDP-GLUCOSA: PROTEINA TRANSGLUCOSILASA DE PAPA (Characterization of two UDP-glucose: protein transglucosylase genes from potato). Wald, F.A.¹, Kissen, R.², Cozarin, M.E.¹, Harfi, I.², Du Jardin, P.² y Moreno, S.¹. ¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar", FCEN, UBA, I.I.B.B.A.-CONICET, Patricias Argentinas 435, (1405), Cap. Fed., Argentina; ²Plant Biology Unit, Gembloux Agricultural University, 5030 Gembloux, Belgium.

La proteína UDP-Glc:proteína transglucosilasa (UPTG) es una glicosiltransferasa que se autoglicosila a partir de 3 nucleótidos azúcares e involucrada en la síntesis de polisacáridos vegetales, aunque su función exacta aún se desconoce. Presentamos la caracterización de dos genes de la proteína (UPTG1 y UPTG2). El análisis de los ARNm por Northern blot empleando sondas específicas para ambas isoformas mostró una expresión diferencial en diversos tejidos de papa. Ambas proteínas presentaron diferencias en sus parámetros cinéticos. Aunque los valores de Km para UDP-glucosa, UDP-xilosa y UDP-galactosa (0.45-0.71 μ M) y los valores de Vmax para UDP-glucosa fueron similares en ambas formas, la isoforma UPTG2 presentó un incremento de 3-4 veces en la Vmax para UDP-xilosa y UDP-galactosa con respecto a la observada para UDP-glucosa (35 y 27 vs 6.45 pmol de azúcar incorporado/min, respectivamente). Los datos sugieren que la UPTG2 podría ser un gen muy activo en la síntesis de polisacáridos del tipo de los xiloglucanos. Los análisis por Southern blot indican la existencia de por lo menos 3 genes en el genoma de papa. Los dos genes caracterizados estarían relacionados con metabolismos diferentes de polisacáridos en papa.

192 - PREPARACION Y ANALISIS DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana* QUE SOBREENPRESAN TIORREDOXINA-M Y TIORREDOXINA-F DE COLZA (*Brassica napus*) (Construction and analysis of *Arabidopsis thaliana* plants that overexpress Thiorredoxin-m and Thiorredoxin-f of colza (*Brassica napus*)). Stolorowicz F.G y Wolosiuk R. A. Instituto de Investigaciones Bioquímicas-F.C.E.N.-U.B.A., Antonio Machado 151, (1405) Buenos Aires, Argentina. Fax: 5411-4865-2246. e-mail fstolori@campomar.iib.uba.ar

Las Tiorredoxinas (Trx) son proteínas-disulfuro óxido-reductasas presentes en todos los organismos. Los cloroplastos de las plantas superiores tienen dos Trx de codificación nuclear, Trx-m y Trx-f. La Trx-m presenta homología de secuencia con las Trx procariotas, y la Trx-f con la Trx humana. Aunque *in vitro* ambas tienen capacidad para modular la actividad de varias enzimas del cloroplasto, lo hacen con diferente eficiencia. Sin embargo esta capacidad puede modificarse con distintos moduladores. Así la función fisiológica no está claramente establecida. En base a ello preparamos plantas transgénicas que sobreexpresan la Trx-m o Trx-f de colza mediante la infiltración de plantas de *Arabidopsis thaliana*, con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Aislamos las plantas resistentes a Kanamicina (marcador de selección) que presentan una única copia de la construcción en homocigosis, y luego analizamos la presencia del DNA mediante PCR y Southern blot. Seleccionamos las líneas que en un Western blot sobreexpresan altos niveles de Trx en comparación con la planta salvaje. Varias líneas independientes para cada una de las construcciones serán utilizadas para estudiar la respuesta de las plantas transgénicas a diferentes tipos de estrés. Este estudio fue subvencionado por el FONCYT

193 - LOS RECEPTORES QUINASAS LePRK1 Y LePRK2 FORMAN OLIGOMEROS EN MEMBRANAS DE POLEN DE TOMATE. (LePRK1 AND LePRK2 exist as hetero-oligomers in tomato pollen membranes. Valsecchi I, Cabanas ML, Wengier, D y Muschietti J. INGEBI-FCEyN-U.B.A CONICET. Obligado 2490, C.F. (1428) ivalse@ingebi.dna.uba.ar

LePRK1 y LePRK2 son dos proteínas receptores quinasas (RLK's), estructuralmente relacionadas y específicas de membrana de polen de *Lycopersicon esculentum* (VF36; tomate cultivado) (Muschietti, et al, 1998). Las RLK's actúan en el reconocimiento célula-célula y en nuestro caso estarían involucradas en la comunicación entre polen y pistilo.

Datos preliminares mostraron que LePRK₁ y LePRK₂ se encuentran en membranas de polen formando parte de un complejo de aproximadamente 400 kDa. Hemos también observado que:

- La GTPasa Rop1 está presente en dicho complejo.
- Por ensayos de co-inmunoprecipitación en polen y levaduras, demostramos que LePRK1 y LePRK2 interactúan entre sí.
- Analizamos también en levaduras si la interacción entre LePRK1 y LePRK2 es dependiente o no del estado de fosforilación de las proteínas quinasas.
- Cuando el polen fue previamente germinado en presencia de extractos de pistilo, dicho complejo se disocia por completo en sus componentes monoméricos. Esto sugiere que ligando/s provenientes del pistilo transducirían la señal al grano de polen a través de la disociación del complejo proteico.

Financiado por IFS (International Foundation of Science), Fundación Antorchas, FONCYT (PICT98), CONICET (PEI) y UBACyT.

194 - EFECTO DEL CADMIO SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN TALLO Y HOJA DE SOJA *GLYCINE MAX L.* (Effect of cadmium on antioxidant defense system on soybean *Glycine max L.* shoots and leaves). Molina, A., Zirulnik, F. y Gimenez, M.S. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL. Chacabuco y Pedernera. 5700-San Luis

Se conoce la relación existente entre acumulación de metales pesados y sus concentraciones en especies vegetales de importancia agropecuaria, así como la relación entre la toxicidad de cadmio y la producción de estrés oxidativo en tejidos vegetales. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la alteración de las defensas antioxidantes en raíz de soja, evidenciando estrés oxidativo inducido por cadmio. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del cadmio sobre la actividad de enzimas que protegen del daño oxidativo y parámetros de lipoperoxidación en tallo y hoja en una curva de tiempo. Las plantas de soja crecidas bajo condiciones controladas de temperatura, luz-oscuridad y humedad relativa, se sometieron al sexto día de germinación y adaptación a condiciones hidropónicas a intoxicación con CdCl_2 (10mg/l) durante 2, 4, 8 y 12 días. Se trabajó con grupo Control y Cadmio. Se midió la actividad de superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (P) y la acumulación de malondialdehído (MDA) como parámetro de lipoperoxidación. Los resultados demostraron que SOD en hoja incrementa a los 4, 8 y 12 días; en tallo aumenta a 2 y 8 días. P en hoja incrementa en todos los puntos de la curva, en tallo aumenta a 2, 4 y 12 días. Los niveles de MDA en hoja incrementan a los 4, 8 y 12 días, mientras que en tallo aumentan a los 2, 8 y 12 días. La alteración de los parámetros antioxidantes sería indicativa del estrés oxidativo inducido por cadmio en el vegetal.

195 - PROTEINA INHIBIDORA DE LA INVERTASA EN FRONDES DE *Pteris deflexa*. (INHIBITORY PROTEIN OF *Pteris deflexa* FRONDS INVERTASE). Savago, J. E., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A.; Isla María I. Cátedra de Fitoquímica y Cátedra de Botánica, Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro" Fac. de Bioq., Qca. y Fcia., Univ. Nac. de Tucumán. Ayacucho 471 S. M. de Tucumán (4000) ARGENTINA E-mail: fitoqui@unt.edu.ar

Proteínas inhibidoras de la actividad invertásica fueron descriptas en numerosas especies con diversas localizaciones. Hasta el presente, estas proteínas fueron encontradas sólo en tejidos heterotróficos y, aunque su función en la planta aún es poco clara, en algunos sistemas parecerían tener un rol en la regulación de la actividad invertásica. En otros casos, sin embargo, esta función es poco probable. Durante la caracterización de la invertasa de frondes del helecho *P. deflexa*, se evidenció la presencia de una proteína que inhibía la actividad enzimática. El objetivo de este trabajo fue aislar el inhibidor a partir de extractos de las frondes, donde forma complejos con la enzima, a fin de caracterizarlo y estudiar su interacción con la enzima. A partir de un mismo extracto se obtuvo la enzima y su inhibidor. Ambas proteínas fueron purificadas. La enzima es un dímero de 2 subunidades de 66 y 30 kDa. El inhibidor tiene un Mr de 18.000. La interacción INV-INH es pH dependiente (máxima a pH 5,0). La inhibición es de tipo no-competitiva con una K_i estimada en 0,15 mM, siendo el complejo poco disociable. La sacarosa protege a la enzima de la acción de su inhibidor. Estos resultados demuestran que los inhibidores proteicos de las invertasas también pueden encontrarse en tejidos fotosintéticos. Por otro lado, estas proteínas no habían sido informadas anteriormente en plantas inferiores.

196 - EXPRESION DE UN COACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL DE PAPA EN *Escherichia coli*, OBTENCION DE ANTICUERPOS Y ANALISIS DE SU EXPRESION EN LA PLANTA DE PAPA (Expression of a potato transcriptional coactivator in *Escherichia coli*, production of antibodies and analysis of its expression in potato plants. Zanetti, ME; Godoy AV; Olivieri F y Casalongué C. IIB, FCEyN-UNMDP, CC1245, 7600 Mar del Plata. E-mail: casalong@mdp.edu.ar

Los coactivadores transcripcionales constituyen una nueva clase de factores de transcripción cuya función es conectar, mediante interacciones proteína-proteína, algún activador transcripcional con la maquinaria basal de la transcripción. Recientemente, hemos reportado la identificación de un clon de ADNc de papa expresado diferencialmente en los tubérculos de papa en respuesta a la infección por el hongo *Fusarium eumartii*. Dicho clon, denominado *StMBF1* (*Solanum tuberosum* Multiprotein Bridging Factor 1), codifica para un posible coactivador transcripcional de tipo MBF1. El marco abierto de lectura del clon *StMBF1* se expresó como proteína de fusión a la Glutión-S-transferasa (GST) en *E. coli*. La proteína de fusión se purificó mediante columnas de Glutión sepharosa 4B, y se digirió con trombina para liberar la proteína *StMBF1* (PM 15,3 kDa) de la GST. Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-*StMBF1* y se analizó la expresión de dicho coactivador en distintos órganos de la planta de papa mediante "Western blot". La expresión de *StMBF1* se detectó en tubérculos, hojas y tallos. Actualmente estamos analizando el patrón de expresión de *StMBF1* y su posible interacción con proteínas celulares en plantas de papa sometidas a diferentes situaciones de estrés.

Agradecimientos: UNMDP, CONICET, IFS (Suecia)

197 - PERFILES DE EXPRESION EN FRAGMENTOS EPIDERMIALES DE *ARABIDOPSIS THALIANA* (EXPRESSION PROFILING IN *ARABIDOPSIS thaliana* EPIDERMAL FRAGMENTS). Zanor M.I., Müller-Röber B., Instituto Max Planck de Fisiología Molecular de Plantas- Am Mühlenberg 1, 14476-Golm, Alemania, e-mail: zanor@mpimp-golm.mpg.de

En los distintos tejidos de las plantas y aún en distintas células se observan diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de poblaciones de ARN. En los últimos años, los proyectos de secuenciación a gran escala han originado una cantidad exponencialmente creciente de secuencias sin sus correspondientes análisis de patrones de expresión o funciones. Debido a esto, el desarrollo de técnicas que permiten el monitoreo simultáneo de miles de genes permite obtener una idea de los procesos que en un momento o en un determinado tejido pueden estar ocurriendo. Con el objeto de estudiar cuáles son los genes involucrados en el funcionamiento de las células oclusivas, una biblioteca de ADNc hecha a partir de ARN de fragmentos epidermales de *Arabidopsis* fue ordenada en placas de microtitulación y posteriormente amplificada por PCR. Dichos productos fueron usados para fabricar membranas de nylon de alta densidad. La hibridización de las membranas con ADNc de hoja y fragmentos epidermales permitió una sustracción virtual de los clones diferencialmente expresados. Usando este método se detectaron clones diferencialmente expresados, los cuales fueron confirmados en un 67% por análisis tipo Northern blot. Algunos de ellos codifican para proteínas con muy baja homología a productos conocidos. El análisis de los genes cuya función no es deducible por homología está siendo llevado a cabo mediante el uso de plantas transgénicas transformadas con construcciones que permiten anti o sobre expresión.

198 - PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO QUE SOBREENPRESAN FLAVODOXINA DE CIANOBACTERIA. (Transgenic tobacco plants overexpressing cyanobacterial flavodoxin). Tognetti, V., Palatnik, J., Poli, H. O., Valle, E. M. y Carrillo, N. IBER, Fac. Cs. Bioq. y Farm., UNR, CONICET.

La flavoproteína ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) transfiere electrones de manera reversible entre NADP(H) y los transportadores de electrones ferredoxina o flavodoxina. Las flavodoxinas son pequeñas proteínas con FMN. En *Escherichia coli*, flavodoxina y FNR pertenecen al regulón *SoxRS* de respuesta a radical superóxido, aunque su acción antioxidante aún no está clara. Se ha demostrado que en medios deficientes en hierro, las cianobacterias son capaces de reemplazar todas las funciones de la sulfoferroproteína ferredoxina induciendo la síntesis de flavodoxina. Las plantas superiores no poseen genes de flavodoxina y por lo tanto no son capaces de adaptarse a suelos deficientes en hierro. Por tal motivo, se generaron plantas de tabaco transgénicas que expresan flavodoxina de *Anabaena* PCC 7119 y la acumulan en cloroplastos. Las plantas transgénicas con niveles de flavodoxina detectables por Western blot no presentaron variaciones en el crecimiento autotrófico a 24°C y 200 $\mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con respecto a plantas controles sin transformar. El daño oxidativo medido como la conductancia de la solución donde flotan discos de hojas tratados con metil viológeno a 26°C y a una intensidad de luz de 300 $\mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ fue menor en todas las plantas transgénicas. Las líneas con menor daño corresponden a las que presentaron mayor grado de expresión de la flavodoxina. Estos datos estarían indicando una correlación entre tolerancia al daño oxidativo y nivel de expresión de flavodoxina.

199 - AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE POLEN QUE INTERACCIONAN CON LOS DOMINIOS CITOPASMATICOS DE LAS PROTEINAS RECEPTORAS QUINASAS LePRK1 Y LePRK2. (Isolation of pollen proteins that interact with the cytoplasmic domains of LePRK1 and LePRK2). Cabanas, ML; Valsecchi, I y Muschietti, J. INGEBI- FCEyN-UBA-CONICET. Obligado 2490. C. F. (1428). mcabanas@ingebi.dna.uba.ar.

En plantas han sido descriptas una gran variedad de proteínas receptoras quinasas que serían las encargadas de recibir la señal y transducirla al interior de la célula. A partir de polen de *Lycopersicon esculentum* VF36 (tomate cultivado) aislamos dos genes que codifican para proteínas receptoras quinasas (LePRK1 y LePRK2) (Muschietti et al., 1998), potencialmente involucradas en la comunicación polen-pistilo.

Con el fin de identificar proteínas que interaccionen con los dominios citoplasmáticos de ambas protein-quinasas, y aislar sus genes, utilizamos una combinación de dos técnicas: 1) Sistema de dos híbridos en levadura y 2) "Screening" de una biblioteca de expresión de cDNA.

Para la estrategia de dos híbridos utilizamos una biblioteca de cDNA de polen maduro en el vector HybriZAP-2.1 (Stratagene) cuyo DNA plasmídico se utilizó para transformar la cepa de levadura que contenía ya la sonda de LePRK1. Para la segunda estrategia generamos una biblioteca de expresión de polen maduro de tomate en el vector lambda-ZAP II (Stratagene). Como sonda para el "screening" expresamos "in vitro" el dominio citoplasmático de LePRK2 (TNT-Promega), utilizando Met-S³⁵ en la reacción como método de marcación.

200 - REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN *hahb-4* DE GIRASOL. (Expression analysis of the sunflower homeobox gene *hahb-4*). Gago, G.*; Almoguera C., Jordano, J., Gonzalez, D.* y Chan, R.*. *Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL. * Inst. de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC).

Los genes que codifican homeodomios han sido aislados de organismos eucariotas muy diversos y funcionarían como factores de transcripción regulando distintos aspectos del desarrollo. En plantas se ha descrito una familia de genes que tiene asociado al homeodominio un dominio de cierre de leucinas. Esta familia de genes, denominada Hd-Zip es particular de plantas y sus miembros estarían involucrados en la respuesta a factores ambientales y nutricionales.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la regulación de la expresión del gen *hahb-4*, perteneciente a la familia Hd-Zip, en respuesta a distintos tipos de estrés e identificar las secuencias reguladoras que podrían estar involucradas en estas respuestas. Nuestros resultados indican que la expresión de *hahb-4* se induce en respuesta al estrés hídrico en plántulas de 4 días, y en raíces, hojas y tallos de plantas adultas de girasol, lo que indicaría una respuesta ubicua. La respuesta observada en plántulas es reversible y mediada por ácido abscísico (ABA). La exposición a otros tipos de estrés, como altas y bajas temperaturas (4°C y 42°C) no modificó los niveles de expresión del gen. Por otro lado, utilizando la técnica de PCR inversa se logró aislar un fragmento de la región promotora de este gen, donde se identificó la secuencia correspondiente a un elemento de respuesta al ABA (ABRE). Nuestros resultados indican que *hahb-4* es un componente de la vía de transducción de señales dependiente de ABA involucrada en la respuesta al estrés hídrico en plántulas, raíces, hojas y tallos de girasol. Proponemos que la proteína codificada por el mismo podría actuar regulando la expresión de genes de defensa ante dicho tipo de estrés.

201 - INTERACCIONES TEMPRANAS Y COLONIZACION A LARGO PLAZO DE RAICES DE TOMATE POR *Pseudomonas fluorescens*. (Early interactions and long term colonization of tomato roots by *Pseudomonas fluorescens*). Vazquez, T.E.E.*; David Gara, P.M.*; López García, S.*; Aguilar, M.; Lodeiro, A. y Favelukes, G. IBBM Fac. Cs. Exactas, UNLP 47 y 115. 1900 La Plata.

Algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* son capaces de conferir a las raíces de tomate protección contra hongos patógenos del suelo a través de mecanismos de antagonismo. Para que las cepas otorguen una efectiva protección se requiere una temprana colonización de la rizosfera y el rizoplan, a la cual se llega a través de la adsorción a la superficie radical por las *Pseudomonas* protectoras, en competición con los otros componentes de la microbiota indígena. En esta comunicación se describen las características de adsorción temprana y colonización de raicillas de tomate por *Pseudomonas fluorescens* P190R (Rif^r), comparativamente con su parental P190 y con *P. fluorescens* T3RfC3. La adsorción, realizada en medio mineral Hoagland de pH7 (o 5 en algunos casos), dependió del tamaño de inóculo en forma no proporcional. La misma se desarrolló rápidamente, completándose esencialmente en 1 hora. La adsorción fue óptima en fase de crecimiento exponencial tardía. La presencia de iones divalentes Ca²⁺ y Mg²⁺ fue indispensable. La adsorción fue máxima a pH neutro. El estado de crecimiento influyó sobre la capacidad de cepas diferentemente marcadas, para competir en la adsorción. Estos resultados se compararon con el curso de la colonización de raíces a tiempos prolongados (21 días), en que se estudió la distribución en las fracciones rizosfera, rizoplan y endorizosfera.

* Apoyado por la UE, Contrato IC18 CT97 0180; * Becarios CONICET

202 - IDENTIFICACION DE UNA NUEVA PROTEASA DEL HONGO FITOPATOGENO *FUSARIUM EUMARTII*. (Identification of a new protease from a phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*). Olivieri, F., Zanetti, E. y Casalongué, C.; Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata. Patroc.: UNMDP, CONICET

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han indicado que las actividades proteolíticas extracelulares se incrementan considerablemente en el fluido intercelular de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) infectados con el hongo *Fusarium eumartii* y también nos han permitido sugerir el posible origen fúngico de dicha actividad proteolítica. En este trabajo se muestra la purificación y caracterización de una serin proteasa producida por *Fusarium eumartii* crecido en medio líquido. La serin proteasa purificada del medio de cultivo del hongo presentó características hidrofóbicas y un peso molecular nativo, determinado por cromatografía de filtración en gel de aproximadamente 60 kDa. Su comportamiento electroforético luego de desnaturalización mostró la presencia de una banda mayoritaria de peso molecular aproximado de 35kDa. Dicho péptido presentó reacción con un anticuerpo preparado contra la proteasa acumulada en los fluidos de tubérculos de papa infectados. La secuencia de la porción amino terminal del mismo resultó poseer una alta homología con las secuencias del extremo amino terminal de otras serin proteasas del tipo subtilisina, descritas en hongos. La caracterización a través de inhibidores específicos nos permitió incluir a la proteasa de *Fusarium eumartii* también dentro del grupo de las serin proteasas de tipo subtilisina. Con el fin de estudiar posibles sustratos biológicos para esta actividad enzimática, se enfrentó a la proteasa fúngica con extractos proteicos de tubérculos sanos tanto de fluido extracelular como de paredes celulares. La proteasa de fúngica degradó *in vitro*, específicamente algunos componentes de las fracciones proteicas extracelulares, y en particular se observó la degradación de quitinasas y glucanasas extracelulares, inducidas en los tubérculos de papa tratados con herida mecánica.

203 - METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS EN PLANTAS DE *LOTUS SPP*. SOMETIDAS A ESTRES SALINO (Metabolism of polyamines in *Lotus spp* plants under saline stress) Sanchez D., Pieckenstein F., Chornomaz E., Garriz A. y Ruiz O.A. IIB-INTECH (UNSAM-CONICET). CC 164. Chascomús. Pcia de BsAs. (7130). E-MAIL: Ruiz@intech.gov.ar

Por su reconocido rol en el crecimiento y diferenciación celular, las poliaminas son consideradas esenciales. Un objeto de investigación más reciente constituye su participación en la respuesta a estreses abióticos y bióticos. Muchos cereales responden al estrés con un incremento de putrescina (Pu) y arginina decarboxilasa (ADC) (Malmberg R.L et al -1998- *Crit. Rev. in Plant Sciences*, 17 (2): 199-224). Cultivares de arroz tolerantes a salinidad revelan que la ADC y su mRNA codificante permanecen altos por largos períodos de tiempo, ocurriendo lo contrario en los cultivares sensibles (Chattopadhyay M.K et al -1997- *Plant Molecular Biology*, 34: 477-483). Algunos vegetales poseen dos o mas genes de ADC (Watson M.B. et al -1998- *The Plant Journal*, 13(2), 231-239) algunos regulados por estrés y otros no. El *Lotus tenuis* es una leguminosa introducida en la Pampa Deprimida del Salado considerada actualmente como una especie "keystone". A pesar de su importancia son escasos los estudios sobre su fisiología de adaptabilidad a suelos alcalinos y salinos. Nosotros presentamos los resultados obtenidos en *Lotus corniculatus* var. *hirsutus* sometido a estrés salino. Las actividades de ADC y S-adenosil-metioninadecarboxilasa (SAMDC) incrementan entre 3 y 5 veces; la diaminoxidasa (DAO) duplica su actividad permaneciendo inalterada la ornitina decarboxilasa (ODC). Los niveles de Pu y espermidina, solubles libres y solubles e insolubles conjugadas, también se incrementan. Estas observaciones nos brindan fundamento bioquímico a la transformación de *Lotus tenuis* con ADC cuyos resultados preliminares también serán presentados.

Agradecimientos: CONICET, TWAS y AECL.

204 - MODIFICACION DE LA PERMEABILIDAD DE LIPOSOMAS POR UNA LTP ANTIFUNGICA (Modification in liposomes permeability by an antifungal LTP). Regente M.¹, Contreras L.², Villalán J.² & de la Canal L.¹. ¹Inst. de Invest. Biológicas - Univ. Nac. Mar del Plata-CC 1245- 7600 Mar del Plata, Argentina. ²BMC, Univ. Miguel Hernández, E-03206 Elche-España.

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó una proteína antifúngica de semillas de girasol (Ha-AP10) tipo lipid transfer protein (LTP). Originalmente se postuló que las LTPs participarían en el recambio intracelular de lípidos de membrana. Sin embargo, se demostró que algunos miembros de la familia pueden tener localización extracelular e inhibir el crecimiento de microorganismos.

Ha-AP10 podría participar de la primera línea de defensa debido a su localización extracelular y su fuerte potencia antifúngica. Resultados previos mostraron que en presencia de fosfolípidos Ha-AP10 modifica su actividad antimicrobiana, sugiriendo que podría ejercer su acción a nivel de la membrana fúngica. Para analizar esta hipótesis se realizaron estudios estructurales de la proteína por espectroscopía de IR demostrando que Ha-AP10 cambia su estado conformacional en presencia de fosfolípidos negativos mientras que su estructura no se modifica con fosfolípidos zwitteriónicos. Por otra parte, se prepararon liposomas de diferente constitución fosfolipídica conteniendo compuestos fluorescentes encapsulados y se ensayó la capacidad de Ha-AP10 para liberar el contenido de los mismos (leakage). Ha-AP10 produjo un 12 % de leakage sobre liposomas compuestos de fosfatidilglicerol (aniónico) mientras que no se observó ningún efecto sobre liposomas de ácido fosfatídico y fosfatidilcolina. Estos resultados y la naturaleza básica de la proteína sugieren que podría actuar *in vivo* mediante una interacción electrostática con la membrana del micro-organismo blanco modificando su permeabilidad.

205 - AMOVA: UNA HERRAMIENTA PARA EL ANALISIS DE FINGERPRINTS RAPDS (AMOVA: a tool for the analysis of RAPDs fingerprints). García, M.V., Galván, M.Z., Balatti, P.A. y Arturi, M.J. Departamento de Biología y Ecología. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

Los objetivos son: particionar la varianza molecular en sus componentes intra e interpoblacional y calcular la variabilidad detectada por cada "primer". El fin es establecer el menor número de "primers" que evidencie la variabilidad existente en el material en estudio.

El AMOVA (Analysis of Molecular Variance) consiste en el desarrollo de un análisis clásico de la varianza de manera de analizar los componentes de la varianza de los datos moleculares en diferentes niveles jerárquicos. En términos generales, la idea central del AMOVA es convertir una matriz de distancia entre individuos en su equivalente análisis de varianza.

Se analizaron genotipos de *Paspalum dilatatum* Poir. en una muestra de ocho individuos provenientes de ocho sitios de la provincia de Buenos Aires. Se utilizaron 10 "primers" que produjeron un total de 60 bandas polimórficas. Los patrones de bandas se utilizaron para construir una matriz básica de datos (MBD) sobre la que se construyó la matriz de distancia utilizando el índice métrico Euclidiano.

Con el análisis de AMOVA se particionó la varianza de los fenotipos RAPDs generados por cada cebador. Esta información permitió identificar el número de "primers", y por ende de patrones de amplificación, que es necesario analizar para establecer la diversidad genética dentro del material estudiado. Se demostró que en *Paspalum dilatatum* Poir la variabilidad intra e interpoblacional es significativa.

206 - MODIFICACIONES EPIGENETICAS DEL GENOMA DE ARABIDOPSIS ASOCIADAS A LA INDUCCION DE RESPUESTAS DE DEFENSA (Epigenetic modifications of the *Arabidopsis* genome associated to defense responses). Pavet, V y Alvarez, M.E. CIQUIBIC-CONICET, Dpto Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Ciudad Universitaria, 5000, Córdoba, Argentina. vpavet@dqf.fcq.unc.edu.ar

En plantas superiores la metilación del DNA modula la expresión génica regulando el imprinting de alelos por "paramutación", la "cosupresión" de genes duplicados y el silenciamiento de genes virales en el proceso de infección. Nuestros estudios se dirigen a caracterizar el comportamiento epigenético, mediado por metilación del DNA, del genoma de un huésped vegetal que responde a injurias bióticas y determinar su implicancia funcional en la ejecución de programas de defensa. Hojas expandidas de *Arabidopsis* fueron infiltradas con suspensiones bacterianas de cepas virulentas o avirulentas (causantes de enfermedad o resistencia, respectivamente), colectadas a distintos tiempos post-infección, y utilizadas para extraer DNA genómico. Las muestras de DNA fueron sometidas a ensayos de AFLP específicamente diseñados para identificar la presencia de residuos citosina o 5-metil-citosina en los entornos CCGG y GATC. Los fragmentos genómicos que exhibieron metilación diferencial en tratamiento con patógenos fueron aislados, amplificados por PCR, y utilizados como sondas en experimentos de Southern blot para confirmar su origen (patógeno o huésped) y su comportamiento epigenético en defensa. Describimos aquí la identidad y localización cromosomal de secuencias repetitivas y de copia única de *Arabidopsis* que modifican su estado de metilación en respuestas a injurias bióticas.

207 - CARACTERIZACION BIOQUIMICA E INMUNOLOGICA DE FENOLOXIDASA TIPO LACASA EN RAICES DE TOMATE. (Biochemical and immunological characterization of a laccase-like oxidase in tomato roots) Bricca M.*, Alba C., Talano M., M. de Forchetti S. Tigier H. A. Dpto de Biol Mol-FCEQ y N- Univ Nal Río Cuarto (Cba) Arg.

La fenoloxidasa tipo lacasa así como las peroxidasas están involucradas en el proceso de lignosubерización. La enzima en estudio es una metaloproteína con 4 átomos de cobre. En este trabajo se realizaron, caracterizaciones bioquímicas e inmunológicas de fenoloxidasa "tipo" lacasa en raíces de tomate (cv pera) de plantas crecidas en hidroponía y en cultivos de raíces transformadas de la misma especie y cultivar. Se discriminó de peroxidasas y se determinó el efecto del estrés salino sobre ambas enzimas y en los dos tejidos.

En raíces en hidroponía, la fenoloxidasa, tanto por determinación espectrofotométrica como por revelado en geles de poliácridamida, respondió al estrés salino con un incremento de su actividad especialmente a los 10 días de tratamiento. En cambio la actividad peroxidasa total no mostró cambios importantes por efecto de salinización.

En las raíces transformadas no hay cambios significativos en la actividad peroxidasa y la fenoloxidasa solo se determina bien en los primeros días de crecimiento.

La determinación de PM y pI de la fenoloxidasas permitió discriminarlas de las isoformas de peroxidasa. La estimación del PM de la fenoloxidasa fueron 202 KDa para las raíces en hidroponía (probable dímero) y 112 KDa para las raíces transformadas. Los pI fueron 6,2 y 9,6 respectivamente.

Las similitudes estructurales determinadas por el método de ELISA, utilizando la fenoloxidasa de raíces en hidroponía purificada, permitió un buen reconocimiento entre los dos tipos de fenoloxidasa estudiadas pero no hubo reconocimiento con la fenoloxidasa proveniente de endocarpo de durazno.

*Ayudante alumna de investigación, UNRC.

Ayoyo de CONICET, CONICOR y SECYT UNRC.

208 - EFECTO DEL ESTRES SALINO SOBRE ISOPEROXIDASAS DE CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* L.) (Effects of the salt stress on the isoperoxidasas of hairy roots cultures of tomato). **Talano M. A.**, Agostini E., Milrad S., Tigier H. Dpto de Biol Mol-FCEFQyN-Univ Nac de Río Cuarto (Cba) Arg.

La salinidad afecta el metabolismo vegetal inhibiendo en algunos casos el crecimiento de la raíz. Las peroxidadas constituyen un marcador bioquímico de la respuesta a estrés y se han visto cambios en los niveles y perfiles de isoenzimas bajo condiciones de estrés salino.

En raíces de tomate se ha observado acumulación post-estrés salino del transcripto TPX1 que codifica para una isoperoxidasa de pI 9,6 y ha sido localizado por hibridación *in situ* en zonas donde se produce lignosubерización.

Se establecieron cultivos de raíces transformadas de tomate del mismo cultivar. Estos cultivos constituyen un sistema ideal para el estudio de respuesta a estrés ya que son estables genéticamente, permanecen metabólicamente activos por sucesivos subcultivos y ofrecen abundante material radical en cortos tiempos.

Se ha evaluado la variación del peso fresco de los cultivos, actividad peroxidasa total y perfil de isoenzimas luego de tratamientos con 100mM de NaCl aplicados en plena fase exponencial. El peso fresco disminuyó un 50% por acción del NaCl durante los primeros 5 días de tratamiento pero igualó al control a los 10 días. El tejido mostró un aumento en la actividad peroxidasa 24 hs post-shock salino mientras que 9 días después, la actividad fue similar al control. El modelo de distribución de isoperoxidasas en el tejido durante el tratamiento no mostró cambios cualitativos importantes. En cambio, en el medio de cultivo se detectó secreción de una isoforma catiónica con un pI superior a 9,6 a partir de las 24 hs del tratamiento, en tanto, se observó represión de la expresión de algunas isoenzimas aniónicas. Apoyo de CONICOR, CONICET y SECyT UNRC

209 - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL GEN DE MAIZ *px2* IMPLICADO EN ESTRES HIDRICO (Identification and Characterization of the *px2* gen implicated in hydric stress). **Talano M. A.**, Lumbreras V., Goday A., Pagés M. Centre d'Investigació i Desenvolupament CSIC-Barcelona-ESPAÑA - Patrocinado por Dr. Tigier H. y Milrad S.

El déficit de agua afecta el metabolismo vegetal provocando cambios moleculares, fisiológicos y de desarrollo en las plantas. Las semillas representan un sistema natural en donde el tejido sufre desecación por lo que han sido utilizadas para aislar mRNAs y proteínas relacionadas con la respuesta al déficit de agua.

En el trabajo presentado se ha llevado a cabo el aislamiento y caracterización de un nuevo gen de maíz, denominado *px2*, identificado mediante un *screening* diferencial de proteínas de embrión maduro e inducibles por ABA en embrión joven.

El gen *px2* codifica para una proteína altamente básica de 20 kDa sin homología con otras proteínas presentes en los bancos de datos. Sin embargo, su patrón de expresión sugirió inicialmente podría tratarse de una proteína de tipo LEA. Este gen forma parte de una pequeña familia multigénica y se acumula en el embrión maduro de maíz, embrión joven tratado con 100 µM ABA y en tejidos vegetativos.

La inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Px2 de una traducción de RNA poli A(+) de embriones de 40 dap detecta dos proteínas: una de 20 kDa y otra adicional de 40 kDa que correspondería a otro miembro de esta familia multigénica. Por marcaje *in vivo* se vió expresión de Px2 en embrión de 30 días e inducción en E30+ABA.

La localización subcelular se ha estudiado utilizando construcciones quiméricas de fusión de la proteína Px2 a GFP. Estas construcciones muestran que Px2 se localiza de forma generalizada en el núcleo y el citoplasma, con una co-localización bastante definida en el citoesqueleto de la célula.

Apoyo Min. de Educ. y Cultura Bs. As.-Centro de Investigación y Desarrollo del CSIC.

210 - RELACION ENTRE HIERRO Y ESTRES EN HOJAS DE PAPA (Relationship between iron and stress in potato leaves). **Fernandez-Maillot, V.**, Lamattina L. y Cassia, R. Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata, CC1245 (7600) Mar del Plata, Argentina. Email: rocassia@mdp.edu.ar

El hierro, además de ser un nutriente esencial, puede tener una participación activa tanto en el establecimiento de infecciones como en procesos de estrés oxidativo. Por lo tanto, plantas que contengan baja disponibilidad de hierro libre serían resistentes a estrés biótico y abiótico. Para comprobar esto, hojas de papa mantenidas en soluciones conteniendo diferentes niveles de hierro fueron sometidas al ataque del hongo *Phytophthora infestans* o a un estrés oxidativo generado por el herbicida diquat. Las plantas mantenidas en bajos niveles de hierro mostraron una importante reducción de los daños causados por ambos tipos de estrés. Esta respuesta se compone de varias partes. Por un lado el bajo contenido de hierro sería un impedimento para el crecimiento del hongo, como fue comprobado al crecer *Phytophthora infestans* en medios conteniendo DFO, un quelante de hierro. Por otra parte, las plantas con bajos niveles de hierro mostraron una acumulación de los transcriptos correspondientes a quitinasa y glucanasa, involucrados en la respuesta de defensa. Las plantas con bajos niveles de hierro presentaron una importante reducción en el daño provocado por diquat (medido como ion leakage), lo cual fue coincidente con una reducción en los niveles del radical hidroxilo, especie oxidativa cuya producción es catalizada por la presencia de hierro.

Estos resultados demuestran que plantas conteniendo bajos niveles de hierro libre presentan mayor resistencia a la infección y al estrés oxidativo.

Subsidiado por IFS, Conicet, UNMDP y ANPCyT.

211 - EFECTOS CITOPROTECTORES DEL OXIDO NITRICO EN PLANTAS (Cytoprotective Effects of Nitric Oxide in Plants). **Lamattina, L.** Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata. CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. E-mail: lolama@mdp.edu.ar

El óxido nítrico (NO) es un radical libre formado endógenamente en diversos sistemas biológicos. En animales, el NO está involucrado en procesos tan diferentes como neurotransmisión, vasodilatación y respuesta inmunológica. En plantas, donde las funciones fisiológicas del NO están muy poco documentadas, se lo ha visto implicado en: 1) transducción de señales, 2) regulación de procesos de adaptación a situaciones de estrés, bióticos y abióticos y 3) metabolismo de la clorofila y respuestas que son dependientes de la luz. En nuestro laboratorio hemos estudiado la capacidad antioxidante del NO frente a situaciones generadoras de estrés oxidativo. Los cloroplastos, en presencia de herbicidas metilviológenos (diquat o paraquat) y luz, generan un poder oxidativo por la reducción continua del O₂ a superóxido. Aplicaciones exógenas de NO sobre hojas de papa tratadas con diquat lograron disminuir la peroxidación de lípidos, la pérdida de clorofila, RNA y proteína y el escape de iones al espacio extracelular. El efecto protector del NO también se observó en el mantenimiento de los niveles de la subunidad mayor de la rubisco (LSU) y la proteína D1 del fotosistema II. Por otro lado, el tratamiento con NO logró revertir el incremento en la velocidad de transporte fotosintético de electrones generado por diquat. Financ. por ANPCyT, Conicet, UNMDP, F. Antorchas, Unesco.

212 - EL OXIDO NITRICO REVIERTE EL FENOTIPO "YELLOW STRIPE" EN HOJAS DE MAIZ. (Nitric oxide reverts the yellow stripe phenotype in maize leaves). Graziano M., Beligni M. V. y Lamattina L.. Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB), FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. Fax: (54)-223-4753150; E-mail: lolama@mdp.edu.ar

El óxido nítrico (NO) es una molécula bioactiva con múltiples funciones conocidas en animales. En plantas, el NO es capaz de atenuar efectos deletéreos del estrés oxidativo tales como clorosis, pérdida de iones y fragmentación del ADN causados por patógenos o herbicidas, regular la expresión de proteínas relacionadas con el estrés y estimular procesos mediados por luz.

En este trabajo se describe el rol de NO en la reversión de la clorosis internerval que desarrollan plantas de maíz (cv Canner) creciendo a temperaturas de 25/30°C y baja intensidad lumínica (PAR 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). El tratamiento con dadores de NO, nitroprusiato de sodio (NPS) o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) produce un 40% de aumento en el contenido de clorofila en la región internerval y 28% en la región adyacente a nervaduras. El aumento en el contenido de clorofila es dosis-dependiente para la concentración de NO. El tratamiento con NO produce aumento en la expresión de genes de proteínas relacionadas con la fotosíntesis, tales como la subunidad mayor de Rubisco (LSU) y la proteína D1 del PSII. Microfotografías electrónicas revelan diferencias morfológicas y estructurales en cloroplastos de plantas tratadas con NO y controles. Por otro lado, el NO también revirtió el fenotipo "yellow-stripe" en el mutante de maíz ys-3.

Financ. por CONICET, UNMDP, ANPCyT y Fund. Antorchas

213 - ALTO CONTENIDO DE ARNr MITOCONDRIAL EN ZOOSPORAS DE PHYTOPHTHORA INFESTANS. (High level of mitochondrial rRNA in *Phytophthora infestans* zoospore) París R. y Lamattina L.. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, UNMDP, CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. E mail: lolama@mdp.edu.ar

Phytophthora infestans (Pi) es el Oomicete causal de la enfermedad del tizón tardío en plantas de papa. Pi, como otros parásitos tiene su ciclo de vida fuertemente relacionado con su ciclo infectivo. La reproducción de Pi es principalmente asexual, produciendo esporangios que liberan zoosporas móviles. Las zoosporas cumplen con una función de búsqueda y selección del sitio de infección y constituyen el principal agente infectivo. El ciclo continúa con el enquistamiento, germinación y crecimiento de micelio que finalmente, invade la planta. El correcto desarrollo de este ciclo está acompañado por cambios finamente regulados en la expresión génica, cuya caracterización se ha fijado como objetivo para el presente trabajo.

Utilizando la técnica de "RNA differential display" sobre ADNc de micelio, zoosporas y quistes de Pi; se identificó un fragmento que, en experimentos de northern blot, se acumuló en el estadio de zoospora. Análisis de la secuencia del ADNc revelaron una homología del 97% con ARN ribosomal (ARNr) mitocondrial de la subunidad mayor. Por otro lado, amplificando regiones del gen correspondiente al ARNr, se evidenció un mayor número de copias de ADN mitocondrial en zoosporas de Pi. Estos resultados no solo podrían indicar una mayor cantidad de mitocondrias en el estadio de zoospora, sino también una elevada actividad transcripcional. Estos cambios en la actividad mitocondrial de la zoospora serían necesarios para mantener los altos requerimientos energéticos de dicho estadio.

Financiado por ANPCyT, CONICET y UNMDP.

214 - AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN INHIBIDOR DE POLIGALACTURONASAS DE HOJAS DE PAPA. ACUMULACION EN RESPUESTA A DAÑO MECANICO, ACIDO SALICILICO E INFECCION (Isolation and characterization of a polygalacturonase inhibiting protein from potato leaves. Accumulation in response to salicylic acid, wounding and infection). Machinandiarena M., Olivieri F., Tonon* C. V., Daleo G. y Oliva C. Instituto de Investigaciones Biológicas. FCEyN. UNMDP. CC 1245 (7600) Mar del Plata, Argentina.

*Prof. Asistente de la CIC.

Los inhibidores de poligalacturonasas (PGIPs) son proteínas con secuencias repetitivas ricas en leucina asociadas con la pared celular de todas las plantas dicotiledóneas analizadas hasta la fecha. Algunas observaciones sugieren una correlación entre la presencia de PGIPs y la resistencia a hongos patógenos de plantas. Hemos purificado un PGIP de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L. cv Spunta). La proteína tiene un peso molecular de 41 kDa determinado por PAGE-SDS y filtración en gel, indicando la naturaleza monomérica del PGIP de papa. Esta proteína tiene actividad inhibitoria frente a preparaciones de poligalacturonasas de varios hongos, indicando el amplio espectro de especificidad. Mediante ensayos de actividad y western blot se determinó que el nivel de PGIP se incrementa en las hojas de papa en respuesta al daño mecánico, al tratamiento con ácido salicílico (molécula implicada en la inducción sistémica de la respuesta de defensa) y por infección con *Phytophthora infestans* durante una interacción incompatible. Nuestros resultados avalan la hipótesis que la síntesis de PGIP constituye un mecanismo de defensa activo en plantas de papa.

215 - EFECTO DEL Cd(II) SOBRE EL METABOLISMO DEL NITROGENO EN RAICES Y NODULOS DE PLANTAS DE SOJA (Effect of Cd(II) on nitrogen metabolism in roots and nodules of soybean plants). Gardey, L., Balestrasse, K.B., Benavides, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Poliaminas, prolina y contenido total de amonio fueron medidos en raíces y nódulos de soja tratados con diferentes concentraciones de Cd(II) (50 a 200 μM Cl_2Cd) durante 48 hs. En raíces de plantas controles, cadaverina (Cad) fue la poliamina dominante. Los niveles de Cad se redujeron entre un 50% y 70% respecto de los controles de acuerdo a las concentraciones de Cd(II) ensayadas. Putrescina (Put) y espermidina (Spd) fueron también disminuidas por incremento de las concentraciones de Cd(II) hasta aproximadamente 95% respecto de los controles, a 200 μM Cd(II). El nivel de espermina (Spm) fue reducido 70% solo a 200 μM Cl_2Cd . En nódulos, los niveles de poliaminas en controles fueron superiores a los de raíces y el perfil de las mismas varió, siendo la Spd la más abundante. Los tres tratamientos con Cd(II) aumentaron los niveles de Put 5 veces respecto de los controles. En cambio las otras poliaminas se afectaban en forma diferente de acuerdo a la concentración ensayada. La variación de prolina mostró un comportamiento similar al de las poliaminas en ambos tejidos, mientras que la concentración de amonio total fue dependiente de la dosis de Cd(II) solo en raíces, no observándose diferencia en el contenido del mismo en nódulos, a ninguna de las concentraciones de cadmio ensayadas. Estos resultados permiten concluir, que ante el estrés inducido por cadmio, el metabolismo del nitrógeno fue más preservado en nódulos que en raíces. Sin embargo, el estudio de los cambios enzimáticos en el ciclo del nitrógeno se hace necesario para clarificar la implicancia de los metabolitos estudiados en respuesta a dicho estrés.

216 - CARACTERIZACION DE LA POBLACION NATIVA DE MICROSIMBIOTES DE MANI REPRESENTATIVOS DEL AREA MANISERA DE CORDOBA, ARGENTINA (Characterization of peanut microsymbiont isolates from the peanut production area in Córdoba, Argentina) Taurian, T., Aguilar, O*, Fabra, A. Fac. de Cs. Exactas, Físico-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba)-*IBBM, Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires), Argentina

INTRODUCCION: Un desafío para el desarrollo de la agricultura sustentable es el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno, capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico y cederlo a la planta en la simbiosis rizobio-leguminosa. Entre éstas se encuentra el maní (*Arachis hypogaea* L.) cuyo cultivo está ampliamente difundido en la Provincia de Córdoba.

OBJETIVOS: Caracterizar fenotípica y genotípicamente la población nativa de microsimbiontes de maní del área manisera de Córdoba.

RESULTADOS: Se analizaron 38 aislamientos de los cuales 21 mostraron un crecimiento lento y los restantes fueron de crecimiento rápido. La caracterización fenotípica permitió diferenciar ambos grupos sobre la base del grado de tolerancia a CINA, altas temperaturas, antibióticos así como la utilización de diferentes fuentes de carbono. Su capacidad de nodular eficientemente maní y otras leguminosas fue determinada en ensayos de inoculación. Los resultados de la caracterización genotípica, obtenidos a partir de ERIC-fingerprint e identificación de polimorfismos del gen 16S rADN (RFLP) usando las endonucleasas *HinfI*, *MspI*, *HaeIII*, *CfoI*, *RsaI* y *AluI*, permitieron revelar heterogeneidad en las dos poblaciones. Se detectó una mayor diversidad entre los aislamientos rápidos.

Agradecimientos: SECyT-UNRC, ANPCyT, CONICET, CONICOR

217 - EFECTOS DE LA ACIDEZ DEL MEDIO EN LA SIMBIOSIS MANI-RIZOBIO (Acidic stress effects on the peanut-rhizobia symbiosis). Angelini, J., Castro, S. Fabra, A. Fac. de Ciencias, Exactas, Físico-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba), Argentina.

INTRODUCCION: El 98% del total de la producción nacional de maní se obtiene en la zona central de la provincia de Córdoba, donde se concentra su cultivo, comercialización, selección como maní confitería e industrialización. Dada la importancia regional y nacional de este cultivo, es importante conocer los factores abióticos y bióticos que podrían afectar el proceso de simbiosis. Se ha descrito que algunos factores abióticos no sólo afectan a la población de rizobios que se asocian con las leguminosas sino que también pueden producir alteraciones en la planta. Entre estos factores, está cobrando importancia la acidificación de los suelos.

OBJETIVOS: Determinar el efecto de la acidez del medio (pH 5,5) en la colonización de raíces de maní (mediante la utilización de bacterias marcadas con la proteína GFP) así como sobre la nodulación de dicha leguminosa.

RESULTADOS: La colonización se ve severamente afectada por el pH ácido del medio. También se observa una disminución significativa en el número de nódulos de plantas crecidas a pH 5,5 y 10 mM de calcio con respecto a plantas crecidas a pH 7 y 10 mM de calcio. No se observan cambios significativos en el número de nódulos a pH 7 o 5,5 y 0,7 mM de calcio.

Agradecimientos: SECyT-UNRC, ANPCyT, CONICET, CONICOR.

218 - INFLUENCIA DEL pH Y EL CALCIO SOBRE LA INTERACCION SINORHIZOBIUM MELILOTI - ALFALFA. (influence of pH and calcium on *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa interaction). Delavechia, C., Hampp, E., Macció, D., Fabra, A., Castro, S. Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia Postal 3. 5800 - Río Cuarto-Córdoba-Argentina. Email scastro@exa.unrc.edu.ar

Los suelos ácidos limitan la nodulación y la fijación biológica del nitrógeno en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa. Una alternativa de solución es el encalado del suelo mediante el agregado de calcio. Los objetivos del trabajo han sido estudiar el efecto del pH ácido y el calcio sobre el crecimiento y la sobrevivencia de *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116, las moléculas bacterianas involucradas en el reconocimiento de la planta como lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (EPS) y evaluar si la adición de calcio mejora la interacción planta-bacteria en suelo ácido.

El crecimiento y la sobrevivencia de la bacteria se encontró afectada a pH 5,5 y 0,14 mM de calcio pero se observó una recuperación del 66% a elevadas concentraciones de calcio (5 mM), con un incremento significativo en el contenido de EPS y LPS y además variaciones en la hidrofobicidad celular. En suelo de pH 5,5 no se observó formación de nódulos pero el encalado del suelo con la adición de 1 Tn/ha de cal dolomita mejoró la nodulación de la alfalfa. Estos resultados evidencian que la disponibilidad de elevadas concentraciones de calcio en un medio ácido favorece el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* y mejora la capacidad de nodular las raíces de alfalfa.

219 - PURIFICACION DE PEROXIDASAS VEGETALES POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD. (Plant peroxidase purification by affinity chromatography). Miranda, M. V., Magri, M.L., Navarro del Cañizo, A., Cascone, O. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA.

Las peroxidasas de cáscara de semilla de *Glycine max* (SBP) y de raíz de *Armoracia rusticana* (HRP) constituyen un interesante insumo para la fabricación de kits de diagnóstico. Numerosos trabajos describen procesos de purificación que comprenden varias etapas, siendo la última de ellas una cromatografía de afinidad con Concanavalina A (ConA) como ligando. Este procedimiento permite obtener preparaciones enzimáticas de alta pureza. Sin embargo, en dichas publicaciones las condiciones de adsorción a la matriz cromatográfica (pH, concentración de iones) y de elución (pH, concentración de NaCl y de metil α -D-manopiranosas) son dispares. En este trabajo describimos las isotermas de adsorción de ambas enzimas a una matriz de ConA agarosa en diferentes condiciones. Los resultados mostraron para la SBP una constante de disociación del orden de 10^{-6} en todos los casos (pH 5-7, iones Mg/Mn/Ca 1 y 5 mM, NaCl 0-0,75M), mientras que para la HRP la constante varió entre 10^{-5} y 10^{-6} . Valores de 10^{-6} se obtuvieron en presencia de 25 mM de iones (NaCl 0-0,75M) y con 5 mM de iones y no más de 0,25M de NaCl. Por otra parte los valores de q_{max} en todos los casos variaba entre 11 y 29 mg/ml matriz. Se cromatografiaron estándares de peroxidasa en un equipo FPLC en las condiciones seleccionadas y se eluyeron con un gradiente de metil α -D-manopiranosas (MP). Como resultado, se recuperó 84,35% de SBP (0,45M de MP y 0,22M NaCl) y 75% de HRP (0,20M de MP).

220 - ORGANIZACION GENOMICA DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN TOMATE (Genomic organization of glutamate dehydrogenase in tomato). Bortolotti, S.; Valle EM. IBR, Fac. Cs. Bioq. y Farm.-UNR. Suipacha 531, 2000 Rosario.

La glutamato deshidrogenasa (GDH), cataliza la aminación reductiva del α -cetoglutarato o la desaminación oxidativa del glutamato. En plantas superiores, el rol fisiológico de GDH es controvertido. Puesto que la principal vía de asimilación de amonio en plantas es el ciclo GS/GOGAT, GDH podría operar en la asimilación o reasimilación de amonio y jugaría un rol complementario al del ciclo GS-GOGAT en la síntesis de glutamato, especialmente bajo condiciones de estrés. En frutos de tomate, tanto la actividad como el contenido de proteína de GDH se incrementan durante la maduración, coincidentemente con la desaparición de GS.

Para estudiar la regulación de GDH durante la maduración del fruto, aislamos un fragmento de ADNc codificante para GDH a partir de fruto rojo mediante RT-PCR utilizando cebadores degenerados. Este fragmento de 379 pb correspondió al del ADNc codificante para GDH aislado de plántulas de tomate¹. Por análisis tipo RT-PCR-Southern blot, se evidenció la presencia de GDH en frutos verdes y rojos y en raíces. Con el propósito de aislar el/los gen/es completos codificantes para GDH, se realizó el muestreo de una biblioteca genómica de tomate, empleando como sonda el fragmento aislado. Se plaquearon un total de $3,3 \times 10^5$ fagos recombinantes, y se aisló sólo un clon positivo. Se realizó una purificación de ADN del fago recombinante y subclonado de los fragmentos de ADN genómico en distintos vectores plasmídicos. Se estudió la organización genómica de este gen. La distribución, el número y longitud de los exones e intrones fue comparable con los de una secuencia genómica parcial del gen *gdhB* de *Nicotiana glauca* recientemente depositada en el GeneBank. Se caracterizó la secuencia promotora e identificaron las regiones responsables de la expresión fruto-específica.

¹ Purnell M. P., Stewart G. R., Botella J. R. (1997). *Gene* 186: 249-254.

221 - IDENTIFICACION DE UNA LECTINA DE HOJAS DE SAMBUCUS PERUVIANA CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA SINTESIS PROTEICA. (Identification of a *Sambucus peruviana* leaf lectin with protein synthesis inhibitory activity). Aguilera, A. C. Isla, M.I., Sampietro A. R. y Vattuone, M. A. Cátedra de Fitoquímica, Instituto de Estudios Vegetales "Dr. Antonio R. Sampietro". Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471 (4000) San Miguel de Tucumán. ARGENTINA. E-mail: fitoqui@unt.edu.ar

Una característica de la familia Sambucaceae es su contenido en lectinas y RIPs no tóxicas. Utilizando hojas de *Sambucus peruviana* Kunth se aisló una nueva proteína inactivadora de la síntesis proteica (RIP) de Mr 65000 constituidas por dos subunidades iguales (Mr 31500) unidas por puentes disulfuros. Se trata de una glicoproteína de carácter ácido (PI = 4.8) que contiene 24,27 % de azúcares neutros en su estructura. La capacidad eritroaglutinante es inhibida según la secuencia: lactosa > N-acetil-galactosamina > galactosa. No presenta especificidad de reconocimiento de grupo sanguíneo humano y no aglutina glóbulos rojos de conejo. Una unidad de hemoaglutinación contiene 1,65 µg de proteína.

La nueva RIP exhibe una fuerte capacidad inhibitoria de la síntesis proteica utilizando como sistema traduccional lisado de reticulocitos de conejo (IC₅₀ = 200 pg/ml). No afecta la síntesis proteica vegetal, ensayada en un sistema de traducción preparado a partir de germen de trigo. Se discuten los ensayos de biotoxicidad, citotoxicidad y de actividad rRNA N-glicosidasa. Los resultados obtenidos indican que se trata de una glicoproteína con propiedades de aglutinina y que inhibe la síntesis proteica *in vitro*. Se trataría de una RIP de tipo II con características muy particulares aún no descriptas debido a que se trata de un homodímero.

222 - EL ESTRÉS OXIDATIVO CAMBIA LAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE PROTEÍNAS APOPLÁSTICAS DE TRIGO. (The oxidative stress changes the biological activities of wheat apoplastic proteins). Maringolo C., Ronchi V., Conde RD, Pinedo ML. Instit. Invest. Biológicas, FCEN, Univ.Nac. Mar del Plata. CC1245-7600MdP, Argentina. mpinedo@mdp.edu.ar. Patrocinios: UNMdP, CONICET, F. Antorchas, IFS.

Las respuestas de defensa de las plantas sometidas a diferentes tipos de estrés incluyen la modificación del estado redox de sus células. Por otra parte, en la última década se ha demostrado que las reacciones iniciales de defensa de las plantas contra patógenos o agentes contaminantes como el ozono transcurren en la matriz extracelular de sus tejidos denominada apoplasto. Previamente, hemos descripto que el apoplasto de hojas de trigo contiene dos serín proteasas y un inhibidor de tripsina cuyos niveles cambian en respuesta a estrés biótico o abiótico. En este trabajo examinamos el efecto del estrés oxidativo causado por el herbicida diquat sobre plántulas del cultivar Pigüé. En las dosis usadas para su aplicación *in vivo*, este agente no modificó el peso fresco de las plántulas. Sin embargo, luego de 48 horas, duplicó la permeabilidad de las membranas e indujo la formación de especies reactivas de oxígeno detectadas por su reacción con diaminobencidina. Además, elevó las actividades apoplásticas de superóxido dismutasa (500%) y caseinasa (250%) y redujo el nivel del inhibidor de tripsina. Por lo tanto, el estrés oxidativo generado por diquat causa cambios dramáticos en las actividades biológicas de proteínas apoplásticas que ejercen funciones muy relevantes.

223 - INTERACCION DE CHAPERONES MOLECULARES HSP70 CON PEPTIDOS TRANSITO CLOROPLASTICOS. (Interaction of Hsp70 molecular chaperones with chloroplast transit peptides). Rial, D.V., Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Almará, A.M. y Ceccarelli, E.A. IBR, CONICET-UNR, Suipacha 531, (2000) Rosario, Argentina. Fax: 0341-4390465. E-mail: rial@arnet.com.ar

Los chaperones Hsp70 intervienen en el proceso de importación de proteínas a cloroplastos, encontrándose homólogos en el citoplasma celular, en la envoltura y en el estroma de la organela. Estos constituirían el motor para la translocación mediante la interacción con el péptido tránsito del precursor importado. Se estudió la interacción de DnaK (Hsp70 de *E. coli*) y Hsp70 de plantas con el péptido tránsito del precursor de la ferredoxina-NADP⁺ reductasa de arveja. Mutantes del péptido tránsito en los cuales se anuló la capacidad putativa de unión a DnaK o a Hsp70 del retículo endoplasmático (BiP) (obtenidas anteriormente) fueron estudiados en experimentos de fijación de Hsp70 *in vivo* e *in vitro*. Se observó que tanto el péptido tránsito silvestre como los mutantes mostraban similar capacidad de fijación de DnaK *in vivo*. Por el contrario, la anulación de los sitios de unión a BiP producía una leve disminución en la capacidad de fijar chaperones de plantas respecto del péptido tránsito silvestre, mientras que la eliminación de sitios de unión a DnaK originaba una reducción drástica de la interacción con chaperones del citoplasma y del estroma de cloroplastos. Sugerimos que los sitios de fijación de DnaK encontrados en el péptido tránsito participarían de las interacciones propuestas para la importación de polipeptidos a organelas.

224 - LAS PROTEASAS APOPLASTICAS DE HOJAS DE TRIGO INHIBEN LA GERMINACION DE CONIDIOSPORAS DE *Septoria tritici*. (Wheat leaf apoplastic proteases inhibit *Septoria tritici* conidiospores germination). Segarra CI, Cordero C, Pinedo ML, Casalongué CA, Conde RD. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEN, Univ. Nac. Mar del Plata. CC 1245 7600 Mar del Plata. Area Fitopatología, F. Cs Agrarias Univ. Nac. La Plata. 60 y 119, 1900LP. Argentina. segarra@mdp.edu.ar. Patrocinio: UNMDP, CONICET, F. Antorchas, IFS.

Previamente, hallamos dos endoproteasas en el apoplasto de hojas de trigo y postulamos su participación en la respuesta de defensa frente a la infección causada por *Septoria tritici*. Este hongo estimula en un 300% a las actividades proteolíticas del cultivar Pigüé e inhibe 10-40% a las del cultivar Isla Verde. El primero es resistente a la enfermedad causada por este agente y el segundo es susceptible. También, observamos que el apoplasto de ambos cultivares contiene un inhibidor de tripsina (Mr 71.000, termoestable) que regula las actividades de las proteasas nombradas. En este trabajo se evaluó si las proteasas y/o el inhibidor de tripsina del apoplasto inhiben la germinación de conidiosporas de *S. tritici*. Para ello, las conidiosporas se incubaron con fluido apoplástico, en ausencia y presencia de PMSF (inhibidor de serín proteasas). El fluido del cultivar Pigüé inhibió en un 58% la germinación de las esporas. Este efecto fue anulado cuando la incubación se realizó en presencia de PMSF. Las conidiosporas se incubaron, también, con el inhibidor endógeno de proteasas parcialmente purificado (sobrenadante del fluido apoplástico calentado 30min, 70°C). Este no inhibió la germinación. Estos resultados sugieren que las enzimas proteolíticas apoplásticas actúan como proteínas antifúngicas frente a *S. tritici*.

225 - MECANISMOS DE ADAPTACION DE SIMBIOTES DEL MANI SOMETIDOS A ESTRÉS (Adaptation mechanisms of peanut symbiont under stress). Dardanelli M, González P, Bueno M, Ghittioni N. Dpto. B. Molecular, UNRC. Río Cuarto- Córdoba. Argentina. Patrocinante: Dra. N. Ghittioni. 1- Conicet 2- Conicor 3- UNRC.

Se ha observado que frente a distintos tipos de estrés ambiental, ciertos microorganismos son capaces de acumular solutos compatibles, entre ellos trehalosa. Para poder conocer si esto también se cumple en rhizobios simbiotes del maní, disidimos estudiar el comportamiento de dos cepas, frente a estrés iónico y no iónico, con el fin de analizar sus mecanismos de adaptación en suelos con características similares. Se trabajó con *Rhizobium* ATCC 10317 y *Bradyrhizobium* USDA 3187, crecidos en medio control, medios hipersalinos (NaCl) e hiperosmóticos no salinos (PEG-8000). Se observó acumulación de potasio en las dos cepas estudiadas en hipersalinidad y una disminución con PEG-8000. El contenido de oligosacáridos periplásmicos varió según la cepa analizada y el estrés aplicado. Se observó acumulación de trehalosa, en ambas cepas en las dos situaciones de estrés. Esto nos indicó un mecanismo activo de las enzimas involucradas tanto en la síntesis como en la degradación de trehalosa. En hipersalinidad, ambas cepas presentaron aumento de la actividad de síntesis en etapas tempranas de crecimiento, mientras que la actividad de trehalasa fue constante en ATCC 10317, pero aumentó en las etapas finales de crecimiento en USDA 3187. Con PEG-8000, las enzimas tuvieron un comportamiento similar al de hipersalinidad en ATCC 10317, pero USDA 3187 tuvo el comportamiento inverso. Podemos concluir que en hipersalinidad, se observó como respuesta una acumulación de K⁺ y de trehalosa posteriormente. Con PEG-8000 solamente se observó acumulación de trehalosa, la cual sería necesaria para la adaptación de estos microorganismos en suelos sometidos a estos tipos de estrés.

226 - CLONADO DE UNA ISOFORMA DE CDPK INDUCIBLE POR DAÑO MECANICO EN PLANTAS DE TOMATE *LYCOPERSICON ESCULENTUM* (Molecular cloning of a CDPK isoform from tomato plants that is induced in response to mechanical wounding). Chico JM, Raíces M, Téllez-Iñón MT y Ulloa RM. INGEBI-CONICET y FCEyN, UBA. Vta. de Obligado 2490 2do piso. (1428) Buenos Aires. Argentina.

En extractos solubles de plantas de tomate se determinó una actividad de quinasa de proteínas dependiente de calcio. Ensayos de Western blot revelaron la presencia de una CDPK en los mismos. A partir de una biblioteca de expresión de células de tomate infectadas con elicitores del hongo *Cladosporium fulvum*, se clonó la secuencia completa de una CDPK. El rastreo se realizó usando como sonda un fragmento del gen obtenido por RT-PCR a partir de ARN de plantas de tomate.

El clon denominado *LeCDPK1* codifica para una proteína de 522 aminoácidos, con un PM de 58 kDa. La secuencia presenta todos los dominios característicos correspondientes a este grupo de quinasa y una secuencia consenso de miristoilación en su extremo N-terminal. En un sistema de transcripción y traducción *in vitro* se obtuvo la proteína recombinante del peso esperado. La expresión de *LeCDPK1* se observó en todos los tejidos de la planta: raíces, tallos, hojas y flores. Estudios de Southern blot realizados con DNA genómico sugieren la existencia de más de una isoforma para esta CDPK.

Se estudió la expresión de *LeCDPK1* en hojas de plantas dañadas mecánicamente. El ARNm específico se induce a la hora de producido el daño y se mantiene durante al menos 24 hrs. Las plantas de tomate sintetizan inhibidores de proteasas (*Pin*) en respuesta al ataque por insectos y al daño mecánico. Anterior a la inducción de los genes *Pin2* aumentó el ARNm de *LeCDPK1* sugiriendo una participación temprana de esta quinasa en la transducción de las señales que median la respuesta defensiva de la planta.

227 - ANALISIS DE LA EXPRESION DE DOS GENES DE TOMATE EN RESPUESTA A LOS ACIDOS SALICILICO Y JASMONICO (Analysis of the expression of two tomato genes in response to salicylic and jasmonic acids). Milanesio P, Tigier H, Medina MI. Dpto de Biol. Mol-FCEyN. Univ. Nac. de Río Cuarto (Arg).

El ácido Salicílico (SA) ha sido sugerido como una molécula señal responsable de activar mecanismos de defensa. Otra molécula involucrada en la expresión de genes de defensa es el ácido Jasmónico (JA), que se lo implica en respuestas de las plantas al estrés por heridas, en especial por insectos.

Los genes *TPX1* y *TPX2*, de tomate codifican para peroxidasas de pared celular. El gen *TPX1* se expresa constitutivamente en raíces y por daño mecánico en hojas. Estudios de hibridación *in situ* mostraron su expresión en zonas donde ocurre lignosuberculosis. El gen *TPX2* se expresa débilmente en raíces.

Se analizó la expresión de *TPX1* y *TPX2*, en raíces y hojas tratadas exógenamente con SA y JA a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. La expresión de la peroxidasa codificada por el gen *TPX1* se estudió por isoelectroenfoque.

Los estudios realizados no revelaron expresión de éstos genes en hoja. En raíces, el JA produjo inhibición de la expresión de los transcritos. El SA produjo inhibición a concentraciones de 1 y 2 mM y a 0,5 mM provocó el incremento de *TPX1* y un aumento en las proteínas totales de los extractos iónicos. Los isoelectroenfocos mostraron un incremento de la peroxidasa codificada por *TPX1*.

Estos resultados indicarían, que la peroxidasa inducida por el SA a 0,5 mM podría estar involucrada en la lignificación de la pared celular en respuesta de defensa y que este proceso sería independiente de la vía del JA.

Apoyos de CONICET y SECYT-UNRC.

228 - CARACTERIZACION DE LA POBLACION NATIVA DE MICROSIMBIOTES DE MANI REPRESENTATIVOS DEL AREA MANISERA DE CORDOBA, ARGENTINA (Characterization of peanut microsymbiont isolates from the peanut production area in Córdoba, Argentina). **Taurian, T.**, Aguilar, O*, Fabra, A. Fac. de Cs. Exactas, Físico-Qcas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba)-*IBBM, Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires), Argentina

INTRODUCCION: Un desafío para el desarrollo de la agricultura sustentable es el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno, capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico y cederlo a la planta en la simbiosis rizobio-leguminosa. Entre éstas se encuentra el maní (*Arachis hypogaea* L.) cuyo cultivo está ampliamente difundido en la Provincia de Córdoba.

OBJETIVOS: Caracterizar fenotípica y genotípicamente la población nativa de microsimbiontes de maní del área manisera de Córdoba.

RESULTADOS: Se analizaron 38 aislamientos de los cuales 21 mostraron un crecimiento lento y los restantes fueron de crecimiento rápido. La caracterización fenotípica permitió diferenciar ambos grupos sobre la base del grado de tolerancia a CINA, altas temperaturas, antibióticos así como la utilización de diferentes fuentes de carbono. Su capacidad de nodular eficientemente maní y otras leguminosas fue determinada en ensayos de inoculación. Los resultados de la caracterización genotípica, obtenidos a partir de ERIC-fingerprint e identificación de polimorfismos del gen 16S rADN (RFLP) usando las endonucleasas *HinfI*, *MspI*, *HaeIII*, *CfoI*, *RsaI* y *AluI*, permitieron revelar heterogeneidad en las dos poblaciones. Se detectó una mayor diversidad entre los aislamientos rápidos.

Agradecimientos: SECYT-UNRC, ANPCyT, CONICET, CONICOR

229 - TAGL11 y TAGL6: DOS GENES MADS DE TOMATE INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DEL OVULO Y LA SEMILLA. (*TAGL11 y TAGL6: Two tomato MADS box genes involved in ovule and seed development*). **D'Angelo M.C.**, Busi M.V. y Zabaleta E. IIB-INTECH, cc 164, 7130, Chascomús, Argentina.

Los genes con dominios MADS son factores de transcripción que participan en varios procesos de desarrollo en plantas. Estos genes se encuentran en la cima de la cascada regulatoria, determinando la identidad de órganos y tejidos. En tomate, se aislaron genes MADS involucrados en el desarrollo de la flor. Recientemente, hemos identificado siete genes MADS que se expresan preferencialmente durante las primeras etapas del desarrollo del fruto. Dos de ellos, *TAGL11* y *TAGL6* (Tomato Agamous Like 11 y 6) se expresan en el tegumento interno del óvulo en desarrollo. Esto sugiere que están involucrados en el desarrollo de este tejido. *TAGL11* y *TAGL6* son inducidos luego de la *anthesis*, teniendo un pico máximo 10 días después. Su expresión está circunscripta al tegumento interno (origen materno) mientras el embrión está en desarrollo. Experimentos de doble híbrido indican que *TAGL6* forma dímeros y contiene un Dominio de Activación (AD), característico de factores de transcripción. Sin embargo, *TAGL11* no parece contener un AD ni interactuar con *TAGL6*. Es probable que *TAGL11* requiera de un tercer factor para activar genes corriente abajo. Así, los resultados sugieren que ambos genes cumplen funciones tanto en óvulo como durante el desarrollo de la semilla maternalmente controlado. Sin embargo, podrían cumplir estas funciones independientemente.

230 - PAF 1, UN FACTOR DE TRANSCRIPCION NUCLEAR QUE INTERACTUA CON PROTEINAS DIRIGIDAS A LA MITOCONDRIA EN ARABIDOPSIS. (PAF1, a nuclear transcription factor interacting with proteins imported to the mitochondria in *Arabidopsis*). **Perales, M.**, Kudla J. y Zabaleta E. IIB-INTECH (CONICET/UNSAM) cc 164, 7130 Chascomús, Argentina.

La células para adaptarse a ciertas condiciones deben coordinar la expresión de los genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. En plantas, si bien varios de estos genes nucleares son inducidos en ciertos tejidos, el mecanismo por el cual ocurre y la señal a que responden son poco conocidos. Recientemente hemos identificado un factor de transcripción de *Arabidopsis*, PAF 1 (Pollen Anther Factor 1), involucrado en la expresión de genes nucleares del complejo I mitocondrial en anteras y granos de polen, tejidos en donde el número de mitocondrias por célula aumenta. PAF 1 posee un dominio N-terminal 70% homólogo a un gen de *Rickettsia* y un dominio C-terminal 70% homólogo al dominio receptor de PhoB, un regulador de respuesta bacteriano. Utilizando un sistema de doble híbrido, se identificaron tres nuevos genes: PAF 2, 3 y 4. Mientras que PAF 4 no presenta homología, PAF 2 y 3 muestran un 80% de homología con PAF 1. Sin embargo, tanto el N-terminal como el C-terminal son divergentes. Análisis informáticos sugieren que PAF 2 y 3 serían importadas a las membranas de la mitocondria. Dado que la región central de estas proteínas muestra semejanzas con proteínas implicadas en oxido-reducción, sugerimos que PAF 2 y 3 podrían representar sensores redox.

231 - DESARROLLO DE PLANTAS TRANSGENICAS DE PAPA QUE SOBREENPRESAN UNA ISOFORMA DE LA PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO (StCDPK1). (Development of transgenic potato plants that overexpress a calcium dependent protein kinase (CDPK) isoform). **Gargantini PR.** Raíces M, Chico JM, Téllez-Iñón MT y Ulloa RM. INGEBI-CONICET Y FCEyN, UBA. Vuelta de Obligado 2490 2do (1428) Buenos Aires. Argentina.

La tuberización de la planta de papa *Solanum tuberosum* es un complejo proceso de desarrollo en el cual a partir de un tallo subterráneo, el estolón, se forma un órgano de reserva, el tubérculo. Dicho proceso se dispara en respuesta a diversas señales ambientales tales como el fotoperíodo, la temperatura y la cantidad de nutrientes. Numerosos genes involucrados en el desarrollo del tubérculo son inducidos durante la tuberización, sin embargo no se ha determinado aún, cual es el transductor de la señal ambiental.

En nuestro laboratorio se caracterizó una actividad de quinasa de proteínas dependiente de calcio (CDPK) en plantas de papa. Dicha actividad varía en los distintos estadios del proceso de tuberización siendo máxima al inicio del mismo (MacIntosh *et al.*, 1996).

A partir de una biblioteca de expresión de estolón se clonó el gen completo que codifica para una isoforma de CDPK que se expresa diferencialmente al inicio del proceso de tuberización. En un sistema de transcripción y traducción *in vitro* se demostró que dicha secuencia codifica para una proteína de 59 kDa con actividad de CDPK capaz de miristoilarse en su extremo amino terminal. Posiblemente esta modificación post-traduccional regule su localización *in vivo*.

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que la CDPK es un transductor de señales ambientales que inducen a la planta de papa a tuberizar. Para confirmarla, se están desarrollando plantas transgénicas que sobreexpresan el gen de *StCDPK1*.

232 - AZOSPIRILLUM IRAKENSE INDUCE UN AUMENTO EN LA BIOMASA Y CAMBIOS EN EL PATRON DE FOSFORILACION DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE Ca^{2+} EN PLANTULAS DE ARROZ. (*Azospirillum irakense* induces a rise in biomass and modifies the Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation pattern). Ribaudó, C.M.; Castilla¹, R.; Delacre, M.; Gori, J.I.; Cantore¹, M.L. y Curá*, J.A. Cátedra de Bioquímica y Cátedra de Microbiología (IBYF-CONICET)¹. Facultad de Agronomía, UBA. *UBA-CONICET.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* viven en asociación con las raíces de cereales, y son promotoras del crecimiento vegetal. En los últimos años se ha propuesto la utilización de estas bacterias como una alternativa o suplemento a la fertilización química.

Hemos estudiado la actividad promotora del crecimiento de *A. irakense* sobre plántulas de arroz y hemos encontrado que el contenido de N de la planta entera, la masa radicular y la densidad de los pelos absorbentes están aumentados. Asimismo, se detectó un aumento de la actividad nitrogenasa (medida por reducción de acetileno). Estos resultados indican una interacción beneficiosa entre la planta y la bacteria.

La inoculación produjo un aumento de la fosforilación total de proteínas endógenas que resultó dependiente de la presencia de Ca^{2+} . Asimismo la actividad de histona quinasa sensible a Ca^{2+} , medida en la fracción particulada, aumentó sensiblemente y en forma transiente alcanzando el valor máximo a las 24 h de la inoculación.

Se obtuvo el mismo efecto sobre el patrón de fosforilación de proteínas endógenas cuando se reemplazó la inoculación bacteriana por tratamiento de las plántulas con las hormonas vegetales AIA y BA.

Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Programación UBACyT 1998-2000 a J.A.C.

233 - MIRISTOILACION DE UNA PROTEIN KINASA CALCIO-DEPENDIENTE DE ARROZ (OSCPK2) EXPRESADA EN *Escherichia coli*. (Myristoylation of a rice calcium-dependent protein kinase, OSCPK2, expressed in *Escherichia coli*). Avalos, A.M.[^] y Busconi, L.**. **Azcuénaga 792-Mar del Plata lbusconi@hotmail.com. ^ IIB-UNMDP anaavalos@yahoo.com.ar

Las CDPKs (proteín quinasas calcio-dependientes) son las proteínas quinasas más abundantes en plantas. Se localizan en citoplasma, membranas o ambos compartimentos. Se ha sugerido que la miristoilación, una modificación post-traduccionnal que incorpora ácido mirístico en la Gly N-terminal, permitiría su asociación a membranas y regularía su interacción con sustratos y efectores.

En bacterias no se produce este tipo de modificación a menos que se transformen con un plásmido con el cDNA de una N-Miristoiltransferasa (NMT). OSCPK2, una CDPK de arroz que presenta una secuencia consenso para miristoilación (MGSCS) se clonó en un vector adecuado y se expresó en *Escherichia coli* junto NMT de levaduras o sola. OSCPK2 coexpresada con NMT debería comportarse como la quinasa WT y la expresada sola sería equivalente a una mutante puntual de miristoilación (myr). Se estudió la localización subcelular y la actividad de OSCPK2 expresada en ambas condiciones. La quinasa coexpresada con NMT se localiza fundamentalmente en fracción particulada, mientras que la quinasa expresada en ausencia de la NMT (myr-) localiza en la fracción citosólica. Ambas quinasas, WT y myr- muestran similar actividad contra un péptido sintético, respuesta al calcio e inhibidores. Estos resultados sugieren que la miristoilación sería necesaria para la localización en membranas pero no tendría un rol esencial para la actividad enzimática.

234 - METODO DE SCREENING DE LA ACTIVIDAD FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA. SU APLICACION PARA LA EVOLUCION DIRIGIDA. (Screening of fructose-1,6-bisphosphatase activity. A novel method for using in directed evolution.) Senn, A.M. y Wolosiuk, R.A., Instituto de Investigaciones Bioquímicas-F.C.E.N.-UBA- Antonio Machado 151, 1405 Buenos Aires, Argentina.

La relación existente entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas es un tema sujeto a intenso estudio. Sin embargo el conocimiento disponible no es suficiente para encerrar de manera racional la modificación de propiedades funcionales. La evolución dirigida es una manera de variar las características de las enzimas sin la necesidad de dicho conocimiento. Para ello se requiere la generación de una biblioteca de mutantes al azar del gen de interés y una posterior selección o screening de la proteína con la propiedad buscada. Esto puede ser usado tanto en estudios estructurales como en la generación de nuevas enzimas con aplicación comercial.

En este trabajo reportamos un método de screening para detectar actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa en diferentes condiciones de catálisis. Para ello utilizamos la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa de los cloroplastos de colza (*Brassica napus*), clonada y expresada funcionalmente en una cepa de *E. coli*. Básicamente, las bacterias son plaqueadas sobre papel de nitrocelulosa y la actividad enzimática de cada colonia es sensada *in situ* detectando el fosfato liberado con la solución de Chen. Este procedimiento hace posible monitorear la actividad de gran cantidad de colonias sin requerir la replicación de las placas de cultivo ni el crecimiento en un medio líquido.

Este estudio fue subvencionado por FONCYT.

235 - MUTACIONES QUE AFECTAN LA ADQUISICION DE HIERRO EN *Sinorhizobium meliloti* 242 SE UBICAN EN GENES SIMILARES A *rhtA*, *rhrA*, *sitC* y *sitD*. (Mutations involved in iron acquisition in *Sinorhizobium meliloti* 242 are located in *rhtA*, *rhrA*, *sitC* and *sitD* like genes). Platano, R., Battistoni, F., Arias, A. y Fabiano E. Div. Bioquímica. IIBCE. Montevideo, Uruguay. rufo@iibce.edu.uy

Los rizobios (bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno) poseen sistemas de alta afinidad que les permiten utilizar el hierro a partir de su sideróforo, de sideróforos férricos exógenos o de compuestos con grupos hemo. Con la finalidad de caracterizar estos sistemas, hemos obtenido mutantes de la cepa 242 de *Sinorhizobium meliloti* defectuosas en la adquisición de hierro.

Las mutantes H21, H26, H36 y H38 se obtuvieron mediante una única inserción genómica del transposón Tn5-1063a. De acuerdo a su fenotipo se clasificaron como defectuosas en: la utilización de su propio sideróforo (H21), la utilización de mas de un compuesto como fuente de hierro (H26 y H36) y la producción o liberación de sideróforos al medio (H38). En H21 la mutación se ubicó en una región del ADN idéntica a parte del gen *rhtA*. En *S. meliloti* 1021 *rhtA* codifica para el receptor de la Rizobactina 1021. En H38 la región genómica interrumpida se identificó como *rhrA*, gen que codifica para un activador del tipo AraC, posiblemente involucrado en la regulación del operón de la Rizobactina 1021. Las mutantes H26 y H36 no fueron capaces de utilizar diversos sideróforos ni compuestos con grupos hemo como fuentes de hierro. Las regiones mutadas mostraron un alto nivel de similitud con proteínas pertenecientes al grupo de importadores ABC-3 implicados en otras bacterias, en el transporte de hierro y otros metales.

Agradecimientos: IFS, PEDECIBA y CONICYT-FONDO C.E.

236 - CARACTERIZACION GENOTIPICA Y FENOTIPICA DE RIZOBIOS FOTOSINTETICOS (Genotypic and phenotypic characterization of photosynthetic rhizobia) Montecchia, M.; Perticari, A.; Pucheu, N.; Kerber, N.; García, A. Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, UBA. IBYF-CONICET Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires, Argentina.

Entre las bacterias simbióticas que inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en los tallos y raíces de leguminosas tropicales, algunos aislamientos de especies de *Aeschynomene* tienen la habilidad de producir pigmentos fotosintéticos, una propiedad inusual entre los rizobios. El grado de diversidad taxonómica de los microsimbiontes asociados a las leguminosas indígenas de la Argentina que nodulan el tallo no ha sido determinado. En este trabajo se presentan los resultados de la identificación y caracterización de aislamientos de *A. rudis*. Los rizobios se aislaron a partir de nódulos de tallo o raíz cosechados en el noreste argentino. Se evaluaron características culturales en medio YEM sólido a 28°C y mediante análisis espectrofotométrico se determinó la producción de bacterioclorofila (Bchl) y carotenos. La caracterización genotípica se realizó por medio de rep-PCR y ARDRA, dos técnicas de *fingerprinting* genómico basadas en PCR que poseen distintos niveles de resolución taxonómica, y además permiten inferir relaciones filogenéticas entre las cepas estudiadas. El análisis de los *fingerprints* de DNA reveló una gran variabilidad intraespecífica entre los aislamientos y una menor heterogeneidad a nivel de especie. Todos presentaron crecimiento lento y la mayoría, bajo condiciones fotoperiódicas, fueron capaces de producir Bchl a y carotenos. Se observaron dos tipos de espectros de absorción, que indicaría la presencia de cantaxantina o espiriloxantina como pigmento principal. La diversidad encontrada a nivel de subespecie o cepa pero no al de género o especie, sugiere que la especificidad de la relación simbiótica es a nivel de especies.

237 - LA FOSFORILACION DE LHII α EN *Rb capsulatus* DURANTE LA SINTESIS DEL APARATO FOTOSINTETICO. (The phosphorylation in *Rb. capsulatus*, of the LHII α subunit, during the synthesis of its photosynthetic apparatus). Barbieri, R.; Pucheu, N.; Kerber, N.; García, A. Cátedra de Microbiología, Fac. Agronomía, UBA y Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Fisiológicas (IBYF-CONICET). Av. San Martín 4453, 1417 Buenos Aires, Argentina. Patrocinante: Norma Pucheu

El aparato fotosintético de las bacterias fototrofas tiene tres complejos pigmento-proteína: el centro de reacción y los complejos antena LHI y LHII. En estos complejos dos polipéptidos de bajo peso molecular (α y β), con propiedades hidrofóbicas se unen a los pigmentos y atraviesan la membrana una sola vez. Los tres complejos están codificados en dos operones: *puc* y *puf* y la regulación de su expresión es ejercida fundamentalmente por la presión parcial de oxígeno. En este trabajo mostramos que en *Rb. capsulatus* los polipéptidos α y β son extraídos de la membrana de una manera secuencial y selectiva por una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo/metanol/acetato de amonio). Las dos subunidades β se extrajeron en sucesivos lavados mientras que LHII α se extrajo primero y LHI α se concentró en los últimos lavados. Las formas fosforiladas de las subunidades α mostraron diferencias en su solubilidad. Mientras que LHI α fosforilada fue totalmente insoluble, permaneciendo en la membrana exhaustivamente extraída, LHII α fue extraída aproximadamente en un 50%. Esta extracción parcial de LHII α fosforilada demuestra la existencia de poblaciones coexistentes que difieren en su característica de hidrofobicidad, provocado por el grado de fosforilación. Estas características permitieron diseñar un método de purificación de las formas solubles en solventes orgánicos de las subunidades α LHII, tanto fosforiladas como no fosforiladas.

238 - LA EXPRESION DEL GEN DE LA MAP KINASA ATMPK3 EN ORIENTACION ANTISENTIDO EN CELULAS DE LA GUARDA DE *ARABIDOPSIS THALIANA* RETARDA LA FLORACION (The expression of the MAP kinase ATMPK3 in antisense orientation in *Arabidopsis thaliana* guard cells delays flowering) Gudesblat, G. E.; Morris P. C.; Hetherington, A. M. y Iusem, N. D. Lab. de Biolog. y Fisiol. Molecular. FCE y N. Cdad. Universitaria, Un. de Buenos Aires, Argentina CP 1428 - Herriot - Watt University, Edinburgh, UK - Lancaster University, Lancaster, UK. E-mail: ggudes@bg.fcen.uba.ar.

Las MAP kinasas participan en la transducción de estímulos extracelulares en eucariotas. Las células de la guarda responden a diversos estímulos ambientales que determinan la apertura o cierre del poro estomático foliar.

Para estudiar el rol de la MAP kinasa de *A. thaliana* ATMPK3 en la apertura y cierre de los estomas, se transformaron plantas de *A. thaliana* con un vector que contiene un fragmento del gen que codifica la MAP kinasa en orientación antisentido río abajo del promotor del gen de papa *kst1*, específico de células de la guarda. Siete de veinte clones independientes presentan floración retardada y un mayor tamaño de las hojas. En cuatro de esos siete clones analizados en detalle, al cabo de 24 días florece solo 1/3 de las plantas. En igual tiempo florece desde 3/4 a la totalidad de los controles transformados con vector sin inserto. Se está analizando la expresión del transgén y el comportamiento de los estomas de las transformantes.

Agradecim.: Fund. Antorchas, R. Staneloni, B. Müller-Röber.

239 - SEÑAL DE TRANSDUCCION EN PLANTAS. CAMBIOS INDUCIDOS POR GA₃ SOBRE FOSFOINOSITIDOS Y ACIDO FOSFATIDICO EN CELULAS DE ALEURONA DE CEBADA (*Hordeum vulgare* L.). (Signal transduction in plant. GA₃-induced changes in phosphoinositides and phosphatidic acid in barley aleurone layers.) Villasuso, A. L.; Molas, L.; Abdala, G. y Machado-Domenech, E. Química Biológica FCEQON UNRC. Río Cuarto. Argentina. E-mail: emachado@exa.unrc.edu.ar.

Las células de aleurona constituyen un modelo que permite el estudio de la señal celular en vegetales a partir de estímulos como el ácido giberélico (GA₃).

Con el objetivo de conocer la participación de los fosfolípidos en células de aleurona de cebada estimuladas con GA₃, en este trabajo se evaluó la acción de la fitohormona sobre la síntesis y número de recambio de PLs; además, se determinó los cambios inducidos en las actividades lípido quinasa. El metabolismo fosfolipídico se estudió mediante la incorporación [³²P]Pi. Las actividades de las diferentes lípido quinasas se determinaron a través de la transferencia del fosfato desde el [³²P]ATP al sustrato endógeno correspondiente.

A lo largo del periodo de estímulo, el ácido giberélico indujo un aumento en la síntesis de los fosfolípidos estudiados. A los 7.5 min. la respuesta fue específica para PA y PIP₂. Las actividades de las lípido quinasas DAG-k y PA-k aumentaron en presencia de la fitohormona mientras que la actividad PIP-k disminuyó. Los resultados obtenidos sugieren que el ciclo del inositol fosfato participa en la vía de transducción de giberelina.

Apoyo de: CONICET-CONICOR-FONCYT-SECYT(UNRC).

240 - LA ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL DE GENES TEMPRANOS POR ACIDO SALICILICO EN TABACO INVOLUCRA SEÑALES OXIDATIVAS (Transcriptional activation of early genes by salicylic acid in tobacco involves oxidative signals). Garretón V., González L., Carpinelli J. y Holuigue L. Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

En nuestro grupo nos interesa dilucidar el mecanismo por el cual el ácido salicílico (AS) activa la transcripción de genes tempranos en plantas. Para esto utilizamos como modelo genes que poseen una secuencia promotora (denominada *as-1*), que confiere activación temprana por AS. En este trabajo mostramos una serie de evidencias que indican la participación de señales oxidativas en el mecanismo de activación de *as-1* por AS en tabaco. Primero, la inducción por AS de la expresión de genes controlados por secuencias *as-1* fue revertida por antioxidantes. Asi mismo, la activación por SA de la unión de proteínas nucleares a la secuencia *as-1* también es revertida por antioxidantes. Segundo, el compuesto metil viológeno (MV) -que genera estrés oxidativo *in vivo*- provoca la activación de la transcripción de genes controlados por *as-1* y en aumentar la unión de proteínas nucleares a esta secuencia. Ambos efectos de MV fueron revertidos por antioxidantes, de la misma manera como se revierte el efecto de AS. Por último, expresamos en *E. coli* el factor de transcripción TGA1a de tabaco, que se sabe reconoce la secuencia *as-1*. Ensayos *in vitro* muestran que la unión de TGA1a a *as-1* es inhibida con diamida, un oxidante de grupos SH, y esta inhibición es revertida por diversos agentes reductores como DTT, glutatión y tioredoxina. Estos resultados sugieren que la activación transcripcional de *as-1* mediada por AS involucra señales oxidativas que modifican la actividad de unión del factor TGA1a u otros de la misma familia y que posiblemente antioxidantes endógenos modulan esta vía.

Financiado por Fondecyt (8980005, 2980065, 3000042)

241 - IDENTIFICACION DE UN TRANSPORTADOR DE UDP-GALACTOSA EN ARABIDOPSIS THALIANA. (Identification of UDP-galactose Transporter from *Arabidopsis thaliana*). Norambuena L., Nilo R. y Orellana A. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

En el aparato de Golgi se realiza la síntesis de polisacáridos de la pared primaria de células vegetales. Las enzimas responsables de este proceso son glicosiltransferasas que se localizan en el lumen del aparato de Golgi. Estas enzimas, utilizan como sustratos nucleótidos-azúcar sintetizados en el citoplasma, por lo que se requiere de un mecanismo de transporte al lumen del aparato de Golgi. Este mecanismo estaría mediado por proteínas transportadoras localizadas en este organelo, similar a lo que ocurre en otros organismos. El interés de nuestro laboratorio es identificar las proteínas involucradas en el transporte y hemos encontrado, en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, un gen homólogo al que codifica para el transportador de UDP-galactosa humano. Con el objeto de determinar si este gen codifica para una proteína transportadora, lo hemos clonado en un vector de expresión de levaduras con una etiqueta de c-Myc, lo que nos permite detectar la expresión de esta proteína. Fracciones enriquecidas en vesículas de Golgi provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*, que expresan esta proteína, son capaces de transportar UDP-galactosa sobre los niveles de levaduras control.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1000675

FISIOLOGIA MICROBIANA

242 - ACCION DIFERENCIAL DE ENTEROCINA CRL35 SOBRE DOS ESTADOS FISIOLOGICOS DE *Listeria innocua* 7. (Differential action of Enterocin CRL35 on two physiological states of *Listeria innocua* 7) Minahk CJ y Morero RD Dpto de Bioquímica de la Nutrición del INSIBIO, CONICET/ UNT e Instituto de Qca Biológica "Dr. B. Bloj" UNT. Chacabuco 461, 4000 S.M. de Tucumán. Argentina

Enterocina CRL35 es una bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* CRL35, una cepa aislada de quesos de Tafi. Este péptido es activo contra patógenos del género *Listeria*. Trabajos anteriores muestran que Enterocina CRL35 produce la muerte de células sensibles induciendo pérdida de iones que conducen al colapso de la fuerza protón motriz.

En este trabajo estudiamos la influencia del estado fisiológico de las bacterias sensibles sobre la actividad antibacteriana de Enterocina y el efecto que ejercen el pH, temperatura y fuerza iónica del medio. *Listeria innocua* 7 fue crecida en TSB y cosechada en la mitad de la fase exponencial o en fase estacionaria. Las células fueron resuspendidas en diferentes búferes. Se tomaron alícuotas y luego de la adición de Enterocina se determinó la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias cosechadas en fase exponencial son notablemente más sensibles a este péptido antibiótico que las bacterias cosechadas en fase estacionaria. En ambas condiciones se obtuvieron similares respuestas a cambios de pH, fuerza iónica y temperatura. La actividad se incrementó a pH ácido y a baja fuerza iónica, presentando óptima actividad en un amplio rango de temperatura.

243 - CARACTERIZACION MOLECULAR DE *Bacillus* sp. O9 PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTE. (molecular characterization of *Bacillus* sp O9, a biosurfactant producing strain). Barengo, N. G., Morán, A. C., Martínez, M. A. y Siñeriz, F. PROIMI-Biotecnología-CONICET. Av. Belgrano y Pje Caseros, (4000), Tucumán, Argentina.

Bacillus sp. O9 fue aislada del medioambiente y estudiada por su capacidad de producir un biosurfactante y un bioemulsificante. Para caracterizar la misma, se realizaron 55 ensayos bioquímicos y morfológicos, se calcularon los coeficientes de similitud S_j y S_{SM} de la cepa O9 con cepas de referencia de diferentes especies de *Bacillus*. Con ambos coeficientes, se encontró una alta similitud con las especies *subtilis* y *amyloliquefaciens*. Para definir a cuál especie pertenece la cepa O9, se analizaron, mediante amplificación por PCR, el gen ADNr 16S y los espaciadores ribosomales intergénicos transcripts 16S-23S o ITS. El ADNr 16S es uno de los genes más utilizados como cronómetros moleculares, ya que está presente en todos los organismos vivos y su función se ha conservado a través del tiempo. A los productos de amplificación se los sometió a la digestión con la endonucleasa de restricción *Alu I* y los patrones de restricción fueron comparados. Los ITS son hipervariables con relación a los genes adyacentes. Los productos de amplificación muestran polimorfismo de longitud en los distintos operones ADNr del genoma bacteriano. Posteriormente el ADNr 16S de la cepa O9 fue clonado, secuenciado y la secuencia comparada con bases de datos disponibles en internet. El análisis de estos datos en conjunto nos permite concluir que la cepa O9 pertenecería a la especie *subtilis* del género *Bacillus*.

244 - EFECTO DE LA DISRUPCION DEL GEN *mutS* EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (Effect of disrupting *mutS* gene in *P. aeruginosa*) Smania A., Saavedra Pons A., Becerra C., Pezza R., Albesa I. y Argaraña C. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. 5000 CORDOBA, ARGENTINA asmania@dqbfqc.uncor.edu

MutS participa en la reparación de errores producidos durante la replicación del ADN y bloquea los eventos de recombinación entre secuencias divergentes. En bacterias, la alteración de *mutS* produce cepas mutadoras y permitiría una adaptación a ambientes heterogéneos y cambiantes. En *P. aeruginosa*, especie ubicua y patógena oportunista, *mutS* ha sido poco estudiada si bien trabajos recientes demuestran que el 20% de *P. aeruginosa* aisladas de fibroquísticos son mutadoras, indicando una posible relación entre mecanismos de reparación y de patogenicidad. Para determinar el papel de *mutS* en la fisiología y patogenicidad de *P. aeruginosa*, construimos una mutante en *mutS* (Δ *mutS*). La misma fue sometida a varios análisis y se comparó su fenotipo en relación a la cepa parental (wt). La cepa Δ *mutS* fue resistente al "heat shock" a 50°C, medianamente resistente a altas concentraciones de H₂O₂, aunque mostró sensibilidad a la alta osmolaridad. Al comparar la velocidad de crecimiento en distintos medios de cultivo, Δ *mutS* mostró un mayor "lag time" en medio rico y en hexadecano 1% y no se observó diferencia en glucosa 10 mM. Los cultivos Δ *mutS* contenían 5 veces más piovirdina y 200-700 veces más piocianina que la wt y no se observó una diferencia significativa en la actividad elastasa. Δ *mutS* mostró una marcada competitividad frente a otras especies bacterianas, algunas de importancia clínica como *S. aureus*. A su vez, se observó una mayor resistencia a distintos antibióticos con respecto a la wt. Los resultados obtenidos indican que la disrupción de *mutS* en *P. aeruginosa* conduciría a un fenotipo de características ventajosas para desarrollarse en condiciones ambientales adversas.

245 - MECANISMO DE REGULACION MEDIADO POR Citi DEL OPERON CITRATO EN *Leuconostoc paramesenteroides* J1. (Regulation mechanism mediated by Citi of the citrate operon in *Leuconostoc paramesenteroides* J1). M. Martín, P. Sender, P. López(*), D. de Mendoza y Ch. Magni. IBR, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR), Dpto. de Microbiología, (FCByF-UNR). (*)CIB, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España.

Los genes involucrados en el metabolismo de citrato en *Lc. paramesenteroides* (actualmente denominada *Weissella*) J1, se encuentran formando un operón inducible por citrato. Dentro de la región 5' adyacente a este operón y ubicado en la orientación contraria se observa la presencia de un gen denominado *citI*, homólogo a reguladores bacterianos (familia de *SorC*). Por ensayos de actividad β -galactosidasa realizados en *E. coli* hemos demostrado que este regulador es un activador transcripcional. Con el objeto de profundizar nuestro conocimiento sobre este mecanismo de regulación, el gen *citI* fue sobreexpresado en *E. coli*. Su producto fue purificado a partir de cuerpos de inclusión, replegado a la estructura nativa y utilizado para estudios de interacción ADN proteínas. Mediante estos estudios observamos que *CitI* es capaz de reconocer específicamente la región de ADN intergénica comprendida entre el gen *CitI* y el operón citrato.

Sin embargo, a diferencia de los otros miembros de la familia *SorC*, *CitI* no presenta un motif HTH consenso. Mediante un programa de predicción de estructuras secundarias (Threader) se identificaron tres dominios estructurales de los cuales el dominio amino terminal presenta un motif de unión a ADN del tipo HTH. Experimentos de unión a ADN realizados sólo con este dominio y experimentos de mutagénesis sitio dirigida sobre la postulada hélice de reconocimiento han confirmado estos estudios de predicción.

246 - EFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA-A SOBRE TRNA EN *Enterobacter cloacae*. (Effect of ultraviolet-A radiation on tRNA in *Enterobacter cloacae*). Oppezzo O.J. y Pizarro R.A. Comisión Nacional de Energía Atómica. Departamento de Radiobiología. Argentina. oppezzo@cnea.gov.ar

Muchas moléculas de tRNA de *E. coli* contienen 4-tiouridina (s⁴U) en la posición 8 y citidina en la posición 13. La radiación UVA (320-400 nm) produce una unión covalente entre esos residuos, reduciendo la capacidad de carga de algunos tRNA. Esto dificulta la síntesis de proteínas, desencadena la síntesis de ppGpp, y hace que las bacterias pierdan transitoriamente la capacidad de crecer sin perder la viabilidad. Hemos descrito previamente que este efecto, llamado retraso de crecimiento (RC), también se produce en *E. cloacae* y que en células de *E. cloacae* pretratadas con UVA el RC se acorta notablemente. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el mecanismo de este último fenómeno.

Células de *E. cloacae* originadas en un mismo cultivo, crecidas luego de una exposición a UVA (365 nm, 100 kJm⁻²) o de permanecer en la oscuridad en iguales condiciones, se irradiaron simultáneamente con UVA (365 nm, 150 kJm⁻²). Los RC producidos fueron 9 y 47 min respectivamente. Por espectroscopia de absorción UV, se advirtió un bajo contenido de s⁴U y de su fotoderivado en tRNA total extraído de bacterias irradiadas antes de crecer, cualquiera fuera el tratamiento aplicado luego de crecer. La ausencia del fotoderivado de s⁴U en estos materiales se confirmó analizando hidrolizados de tRNA por HPLC. En las bacterias crecidas sin exposición previa a UVA, se hallaron niveles normales de s⁴U en los controles y de fotoderivado de s⁴U en células irradiadas.

Los resultados indican que luego de una exposición a UVA hay un bajo contenido de s⁴U en el tRNA de *E. cloacae*. En esas condiciones el tRNA no sería blanco de UVA y no desencadenaría el RC. Podrían estar afectadas enzimas involucradas en la formación de s⁴U.

247 - DnaJ Y CbpA EN LA PROTECCION CONTRA EL ESTRES POR CALOR EN BACTERIAS. (DnaJ and CbpA in the protection against thermal stress in bacteria). Blanco Rivero, M.C. y Viale, A. M. IBR (CONICET). Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, Rosario, Argentina. E-mail: amviale@infovia.com.ar. Fax: 54-341-4390465.

Durante la respuesta al estrés por calor en bacterias se inducen una serie muy conservada de proteínas (Hsps), la mayoría de las cuales participa en el plegado y degradación de otros polipéptidos. Una de éstas es DnaJ, que junto con DnaK y GrpE, forman el sistema Hsp70 en *Escherichia coli*. CbpA es una proteína con elevada homología de secuencia a DnaJ, presente en esta bacteria, que se induce en fase estacionaria, pero no por estrés térmico. Con el fin de estudiar el rol de DnaJ y CbpA en situaciones de estrés utilizamos mutantes de *E. coli* en los genes de estas proteínas.

En cepas carentes de DnaJ o CbpA, la termotolerancia intrínseca durante temperaturas extremas disminuyó respecto a la correspondiente cepa parental. Esta disminución fue aún mayor cuando ambas proteínas estuvieron ausentes, alcanzando valores correspondientes a la ausencia total de DnaK. La expresión de DnaJ y/o CbpA desde plásmidos multicopia recuperó la resistencia térmica intrínseca. Estos datos muestran que el sistema DnaK completo es requerido en el proceso de termotolerancia. DnaJ y CbpA fueron además capaces de actuar como cochaperones de DnaK en el plegado asistido de polipéptidos. Nuestros resultados sugieren que la bacteria ha evolucionado funciones redundantes de cochaperones como reaseguro de la resistencia contra situaciones de estrés.

248 - MULTIPLES PERMEASAS MEDIAN EL TRANSPORTE DE FENILALANINA EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. (Multiple permeases mediate the phenylalanine transport in *Saccharomyces cerevisiae*). Chianelli, M.; Sáenz, D y Ramos, E.H. Dpto. Bioquímica Humana, Fac. Medicina. (UBA-CONICET). Buenos Aires, Argentina.

Numerosas permeasas median el transporte activo de aminoácidos en *S. cerevisiae*. La información concerniente al transporte de fenilalanina en *S. cerevisiae* es fragmentada y escasa. Además de la permeasa general de aminoácidos (Gap1p), no se identificó aún para fenilalanina a nivel molecular una permeasa específica. El objetivo del trabajo es la identificación del (los) gen(es) que codifican transportadores de fenilalanina. La investigación se realizó en cepas Y294 y sus derivadas *bap2* y *agp1*. Las cinéticas de transporte de L-¹⁴C-fenilalanina se determinaron en células crecidas en medios sintéticos con amonio (SAm), glutamina (SGln) o prolina (SPro). Los resultados obtenidos demuestran: 1) en células crecidas en medio SAm la mayor actividad de transporte de fenilalanina es mediada por Bap2p ($K_m = 22 \mu M$ y $V_{max} = 0.83 \mu mol/min/g$); 2) en la mutante *bap2*, sin embargo, el transporte residual de fenilalanina es mediado por dos sistemas de baja capacidad, uno de ellos corresponde a la permeasa Agp1 ($K_m = 0.62 mM$), el cual desaparece en la mutante *agp1* y el otro es de alta afinidad ($K_m = 70 \mu M$); 3) el transporte de fenilalanina por este último sistema no se debe a una actividad residual de la Gap1p; 4) para conocer la identidad de este sistema, la mutante *bap2* creció en medio SGln, condición en la que las permeasas Gap1 y Agp1 sufren represión catabólica por nitrógeno, un único sistema media el transporte de fenilalanina de similar afinidad y capacidad, inhibible por leucina, isoleucina, tirosina, triptofano y valina (50-30%) especificidad sugerida para la permeasa Bap3; 5) resultados preliminares en células crecidas en medio SPro confirman que el transporte de fenilalanina se realiza a través de la permeasa Gap1.

250 - ANALISIS DE GumE, UNA PROTEINA QUE PARTICIPA EN LA SINTESIS DEL EXOPOLISACARIDO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS. (Analysis of GumE, a protein involved in *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide biosynthesis) Vilas, G.L. y Ielpi L. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Comar. Patricias Argentinas 435. (1405) Buenos Aires, Argentina.

Xanthomonas campestris produce un exopolisacárido formado por unidades repetitivas de cinco azúcares. Los genes necesarios para la síntesis de la unidad pentasacáridica han sido identificados en un operón denominado gum. Las funciones de 4 genes del operón no están aclaradas, pero participarían en procesos comunes tales como la polimerización y exportación. Aquí mostramos los estudios sobre la función de uno de estos genes, denominado *gumE*. La proteína muestra baja homología con otras, es muy hidrofóbica y parecería estar asociada a la membrana. Resultó imposible inactivar este gen en la cepa salvaje. Logramos obtener mutantes de *gumE* en cepas defectivas en la síntesis de nucleótido-azúcares precursores. El análisis *in vitro* de una mutante mostró síntesis de la unidad repetitiva pero no produjo polímero, sugiriendo la participación de esta proteína en la reacción de polimerización. La sobreexpresión de GumE en la cepa salvaje afectó la morfología celular, observándose células elongadas formando cadenas, indicando la importancia de un correcto nivel de expresión y balance. Evaluamos el rol de algunos aminoácidos conservados con otras probables polimerasas. Análisis de proteínas mutantes obtenidas por mutación sitio dirigida reveló que alguno de estos aminoácidos juegan un papel importante, siendo uno de ellos, la glicina 181.

249 - EL ROL DE LA ESTREPTOMICINA EN LA GENERACION DE MUTACIONES RIBOSOMALES (The role of streptomycin in the generation of ribosomal mutants) Caruso, C., Chan A., Algranati, I. y Nagel, R., CEFYBO, CONICET e Instituto Investigaciones Bioquímicas, Buenos Aires, Argentina.

Un significativo aumento en la frecuencia de revertantes Arg⁺ se observó con una cepa de *Escherichia coli* arg⁻ Str^r (auxótrofa para arginina y resistente a la estreptomycin) en placas de medio mínimo sin arginina con estreptomycin (Fastame y col. SAIB, 1997). El objetivo de este estudio fue la caracterización de estas mutantes Arg⁺ supernumerarias y la determinación del rol de la estreptomycin en su generación.

Los resultados obtenidos indican que un alto porcentaje de las mutantes que aparecen en las placas selectivas (Arg⁺ St-D) son dependientes de la estreptomycin para expresar el fenotipo Arg⁺. Estas mutantes no se generan en mutantes *recA*⁻ y presentan un alto grado de traducción errónea, en particular en la fase estacionaria de cultivos crecidos con estreptomycin. La mutación responsable mapea próxima a los 72 minutos, en la región del genoma que codifica las proteínas ribosomales. Las condiciones fisiológicas y la composición del medio de precultivo inciden en el número y tiempo de aparición de las mutantes Arg⁺ St-D; de ello se infiere que estas mutantes pre-existen y que la estreptomycin actúa como agente selectivo permitiendo su crecimiento, aún cuando no se puede excluir que ejerza además un rol inductor en su generación por un mecanismo de stress traduccional *recA*-dependiente SOS-independiente. Este trabajo fue financiado por ANPCyT.

251 - EFECTOS DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CONTENIDO, COMPOSICION Y MARCACION DE LIPIDOS EN BACILLUS SUBTILIS (Temperature effects on the content, composition and labeling of lipids in *Bacillus subtilis*) Díaz, A. R.J., de Mendoza, D.I y Avelaño, M.2 IIBR, UNR-CONICET, 2000 Rosario e 2INIBIBB, UNS-CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina. E-mail:cordiaz@infovia.com.ar

La mayoría de los organismos poiquiloterms altera la composición lipídica en respuesta a cambios en la temperatura ambiental con el fin de mantener las propiedades físicas de su membrana. En este trabajo mostramos que en un rango de temperatura relativamente estrecho *B. subtilis* produce profundos cambios en el contenido y composición de sus lípidos. A 37°C, los lípidos mayoritarios fueron cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y diglucosildiacilglicerol (CL>PG>PE>DGDG). A 20°C, disminuyó CL y aumentó PG (PG>PE>DGDG>CL). El contenido de fosfolípidos (PL)/mg proteína disminuyó significativamente a 20°C, pero el más afectado fue CL. Las diferencias se observaron tanto en la fase exponencial como en la estacionaria. Los ácidos grasos mayoritarios en todos los lípidos fueron los ramificados (C15 y C17) seguidos de los saturados de cadena recta. La composición de ácidos grasos en lípidos se mantuvo similar entre las 2 temperaturas, con un pequeño aumento de monoinsaturados. Los cambios composicionales se correlacionaron con modificaciones en la incorporación de [¹⁴C]palmitato. A 37°C, el PL más marcado fue PG y 20% de la radioactividad total incorporada estaba en CL. A 20°C, disminuyó la marca en CL y aumentó en PG. Una parte del [¹⁴C]16:0 esterificado en lípidos se recuperó como ácidos grasos monoinsaturados a 20°C, lo que concuerda con la inducción de la desaturasa de PL reportada por nuestro grupo.

252 - EXPRESION Y LOCALIZACION DE UNA GLUCURONIL TRANSFERASA BACTERIANA (Expression and subcellular localization of a bacterial glucuronosyltransferase). Barreras, M. y Ielpi, L. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar. Patricias Argentinas 435. (1405) Buenos Aires. Argentina.

La biosíntesis de las unidades repetitivas de los polisacáridos y glicoproteínas se lleva a cabo por la transferencia secuencial de azúcares a partir del dador correspondiente a un aceptor mediante la acción de glicosil transferasas específicas. Las bases moleculares del agregado de azúcares no están aclaradas. En la última década se han aislado numerosos genes correspondientes a glicosiltransferasas bacterianas. La función de la proteína correspondiente se asigna sobre la base de la caracterización de intermediarios formados in vitro por cepas mutantes o por semejanza de secuencia de aminoácidos. Este es el caso del producto del gen *gumK*, una posible $\beta(1-2)$ glucuronil transferasa que participa en la biosíntesis del exopolisacárido xantano producido por *Xanthomonas campestris*. Para establecer la función de esta proteína, el gen *gumK* fue clonado en un vector de expresión, formando una proteína de fusión con el S-tag. Ensayos de sobreexpresión mostraron una proteína insoluble en la forma de cuerpos de inclusión. Variaciones en las condiciones de cultivo e inducción permitieron solubilizar parcialmente la proteína Stag-GumK. El ORF *stag-gumK* fue clonado en un vector de amplio rango de hospedadores, el cual restableció la síntesis de xantano en una cepa de *X. campestris* mutante en el gen *gumK*. Utilizando anticuerpos contra S-tag se determinó que la proteína se encuentra en la fracción de membranas totales.

253 - ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y RANGO DE HUESPED DEL PLASMIDO pLL1212 DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL1212. (Stability and host range of pLL1212, a plasmid from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL1212) Vilte, D. A., Azcárate Peril, M. A., Sesma, F. y Raya, R. CERELA-CONICET. Chacabuco 145 (4000) S. M. de Tucumán. e-mail: daniel@cerela.org.ar

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* (*Lb. lactis*) es ampliamente utilizado en la fabricación de productos fermentados, particularmente como cultivo iniciador en la manufactura de quesos tipo suizo e italiano. El estudio de plásmidos nativos de *Lb. lactis* para desarrollar vectores de grado alimentario que permitieran el mejoramiento de esta especie de importancia tecnológica, nos llevó a la caracterización de pLL1212, un plásmido críptico de *Lb. lactis* CRL1212. pLL1212 tiene 8713 pb y un contenido en G+C de 43,3%. Estudios previos demostraron que su origen de replicación se encuentra en un fragmento de 1,24 kb, que fue clonado en pSA34 (vector sonda para orígenes de replicación) originando el plásmido recombinante pAS12. No se detectó una proteína de replicación en la secuencia de pLL1212 pero se observó la presencia de intermediarios de cadena simple que indicarían que este plásmido replica mediante círculo rodante. En este estudio se presenta el rango de huésped de pLL1212 y estudios de estabilidad plasmídica. Utilizando diferentes protocolos de electrotransformación se demostró la replicación de pAS12 en: *Lb. johnsonii* (frecuencia de transformación: 10^3 transformantes/ μ g de ADN plasmídico), *Lb. gasserii* (10^2), *Lc. lactis* (10^2), *Lb. helveticus* (10^2), *Enterococcus faecium* (10^2), *Leuconostoc lactis* (10^2) y *Pediococcus acidilactici* (10^4). Las frecuencias de transformación obtenidas fueron comparadas con las frecuencias de transformación de pGK12. Las pruebas de estabilidad plasmídica llevadas a cabo en *Pediococcus acidilactici* CRL949 y *Lb. johnsonii* NCK65 demostraron una estabilidad de pAS12 de más de quince generaciones en ausencia de antibiótico.

254 - EFECTO DE VANADATO Y NUCLEOTIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE MUTS. (Effect of vanadate and nucleotides on the activity and stability of MutS). Pezza, R. J. y Argaña, C. E. CIQUIBIC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC. 5000 Córdoba, República Argentina rpezza@dqbfcq.uncor.edu

El sistema de reparación de bases apareadas incorrectamente es uno de sistemas más importantes de reparación de ADN en procariotas y eucariotas. La proteína MutS forma parte de este sistema y se caracteriza por reconocer y unirse al heteroduplex de ADN. Además posee una actividad ATPasa asociada a una secuencia de aminoácidos carboxilo terminal de tipo "Walker A" que la relaciona a la superfamilia de proteínas "NTP-asa 4". Esta secuencia ha sido descripta como el sitio de unión de nucleótidos y probablemente de Vanadato. En nuestro laboratorio hemos clonado, expresado y caracterizado bioquímicamente MutS de *Pseudomonas aeruginosa*. Recientemente hemos detectado que Vanadato es un inhibidor no competitivo de la actividad ATPasa y es capaz de modificar la unión de la proteína a heteroduplex de ADN (G/T). Por otra parte encontramos que MutS de *P. aeruginosa* y *E. coli* son inactivadas rápidamente a 37°C. La cinética de inactivación indicó que la actividad ATPasa es afectada a tiempos más cortos y a menor temperatura que la actividad de unión a ADN. Se observó además que estas actividades se preservan si durante la preincubación a 37°C se adiciona Vanadato, ATP, ADP o heteroduplex de ADN. Finalmente se detectó mediante proteólisis controlada de MutS, que la presencia de Vanadato, ATP o ADP producen diferentes alteraciones en el patrón de digestión de la proteína, lo cual sugeriría que los efectores mencionados producen diferentes cambios conformacionales en la proteína.

255 - IDENTIFICACION DEL BLANCO DE ACCION DE LA MICROCINA J25. (identification of the microcin J25 target) Delgado, M. A., Rintoul, M. R., Fariás, R. y Salomón, R. Dpto de Bioqca. de la Nutrición-INSIBIO (CONICET-UNT) e Inst. de Qca Biológica "Dr. Bernabé Bloj", (UNT). Chacabuco 461, (4000) Tucumán. Argentina. E-Mail: monica@d@unt.edu.ar

La microcina J25 (MccJ25) es un antibiótico peptídico cíclico que consiste en 21 aminoácidos no modificados, producido por *Escherichia coli*. En comunicaciones anteriores informamos sobre el aislamiento y caracterización de cinco clases de mutantes de *E. coli*. En cuatro de ellas, que eran resistentes a MccJ25 exógena, estaban afectadas proteínas de la envoltura celular necesarias para la penetración del antibiótico. La mutación restante, localizada en los 90 minutos del mapa genético de *E. coli*, confería resistencia a MccJ25 exógena y endógena. Esto sugería que el gen afectado especificaba el blanco de acción del antibiótico. En el presente trabajo localizamos con precisión esta última mutación. En primer lugar, determinamos que el plásmido pDJJ12, conteniendo los genes *rpoB* y *rpoC* (que codifican las subunidades β 'y β ', respectivamente, de la RNA polimerasa de *E. coli*) y *htrC* (que especifica una proteína de shock térmico), complementa totalmente la mutación restaurando el fenotipo de sensibilidad a la MccJ25. La introducción de plásmidos conteniendo sólo *rpoB*, *htrC*, o con una delección de *rpoC* no complementa la mutación. Estos resultados sugieren que la alteración responsable de la resistencia a MccJ25 reside en *rpoC*. Por otro lado, la mutación fue transferida desde el cromosoma al plásmido pDJJ12 mediante homogenización. El plásmido mutante, designado pMADC2, induce resistencia al antibiótico en una cepa sensible. Finalmente, la determinación de la secuencia nucleotídica de *rpoC* en pMADC2 demostró que la mutación reside en este gen.

256 - ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL Br-TETRADECILTRI-METILAMONIO (TDTMA) Y SU INTERACCION CON FOSFOLIPASA C DE *Pseudomonas aeruginosa*. (Antimicrobial activity of tetradecyltrimethylammonium bromide and its interaction with *P. aeruginosa* phospholipase C). García, V., Lisa, A. y Lucchesi, G. Dpto. Biología Molecular, FCEFQyN. UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Las sales de amonio cuaternario sintéticas, entre ellas TDTMA, ejercen una acción antimicrobiana. En *P. aeruginosa* ha sido descrito que estos compuestos, a concentraciones subinhibitorias, reducen la producción de algunos factores de virulencia producidos por esta bacteria. En este trabajo se examinó el efecto de concentraciones subinhibitorias de TDTMA sobre la expresión de tres factores de patogenicidad producidos por *P. aeruginosa*: acetilcolinesterasa, fosfatasa ácida y fosfolipasa C (PLC). A pesar de su naturaleza catiónica, el TDTMA no ejerce una acción permeabilizante sobre la membrana externa de *P. aeruginosa* ya que, en presencia del mismo, enzimas periplásmicas mantienen su localización. De las actividades estudiadas, sólo la que se excreta al medio, PLC, se vio afectada por concentraciones de TDTMA que no inhiben el crecimiento bacteriano (40% de actividad remanente con 10mg/l de TDTMA). La exposición continua de cultivos de *P. aeruginosa* durante 10 días a niveles equivalentes a 1/10 de la CIM de TDTMA (150mg/l), mantienen el efecto supresor sobre la actividad PLC. Estudios cinéticos demuestran que: a) Entre 5 y 20 mg/l, TDTMA es un inhibidor competitivo y a mayor concentración se comporta como inhibidor no competitivo. b) Propionil, butiril y fosfatidilcolina protegen a PLC del efecto del TDTMA. c) Modificando la concentración de enzima en presencia de diferentes concentraciones de TDTMA, se detecta enzima inactivada que no puede recuperarse. Estos resultados confirman que el TDTMA ejerce una acción directa sobre PLC y apoyan la alta afinidad de la enzima por grupos amonio cuaternarios.

257 - REGULACION DE LA EXPRESION DEL LOCUS REGULADORIO GLOBAL SAE EN STAPHYLOCOCCUS AUREUS. (Regulation of the expression of global regulatory locus *sae*). Raspani, C., Monquaut, L., Cane, M., Giraudo, A., Nagel, R. Dpto. Microbiol. e Inmunol., UNRC, Río Cuarto y CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

El locus regulatorio *sae*, que induce la síntesis de factores de virulencia en *S. aureus*, fue identificado, clonado y secuenciado por este equipo de trabajo. Esta constituido por dos genes, *saeR* y *saeS* (687 y 1062 pb) que codifican una proteína efectora y una histidin-proteína quinasa señal. Se estudió la regulación de la expresión de *sae*. Experimentos de Northern blot revelaron tres transcritos de diferente tamaño, el mayor de ellos de 2.4 kb, que se expresan en la fase post-exponencial. Fusiones transcripcionales de distintos tamaños (180, 400 y 1100 pb) de la zona promotora del locus *sae* con el gen reportero *xylE* mostraron una expresión muy débil con la fusión de 180 pb y buena expresión con las otras dos regiones. La expresión de *sae* se maximiza en las fase post-exponencial y estacionaria temprana y es regulada positivamente por el gen regulatorio global *agr*. Estudios de complementación en mutantes *sae-* y *agr-* con plásmidos portadores de los genes codificantes *saeR-saeS* unidos a estas tres regiones promotoras coinciden con estas conclusiones. Este trabajo revela una interesante regulación en cascada que involucra los genes regulatorios globales *agr* y *sae* y evidencia la complejidad de la regulación de la expresión de la virulencia en *S. aureus*.

Financiado por ANPCyT y UNRC.

258 - *Bacillus* sp S-86 RESISTENTE A SOLVENTES ORGANICOS. CARACTERIZACION MOLECULAR. (Organic solvent resistant *Bacillus* sp S-86. Molecular characterization). Torres S., Martínez A., Castro G. R. PROIMI - Biotecnología. Av. Belgrano y Pje. Caseros. (4000). Tucumán, Argentina.

El género *Bacillus* produce enzimas de importancia industrial. Entre ellas, las esterasas despiertan un gran interés, aumentado recientemente por su uso en solventes no acuosos. Como resultado de una búsqueda de microorganismos resistentes a solventes orgánicos y con actividad esterasa, fue seleccionada la cepa de *Bacillus* S-86, la que fue capaz de crecer en presencia de metanol, etanol, n-propanol, 1,3-propanodiol, 1-butanol y alcohol isoamílico. La caracterización morfológica y bioquímica de la misma la ubicaron preliminarmente en el género *Bacillus* grupo *subtilis* (Torres y col., 2000). Con el objeto de identificar el microorganismo al nivel de especie, se realizó la caracterización molecular del mismo con el uso de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fueron realizados el *fingerprint* de genoma completo con el uso de *random amplified polymorphic* ADN PCR o RAPD, amplificación de espaciadores ribosomales intergénicos transcritos 16S-23S o ITS, cuyos productos muestran polimorfismo de longitud de los espaciadores intergénicos de los distintos operones ARNr del genoma bacteriano, y el aislamiento del gen ADNr 16S usando *primers* universales. La presencia de plásmidos fue evaluada por distintos procedimientos, no detectándose elementos extracromosomales.

Finalmente, los resultados obtenidos del *fingerprint* de genoma completo y del análisis del operón ADNr, permitieron definir la relación de *Bacillus* sp S-86 a la especie *B. licheniformis*.

259 - DIFERENCIAS EN EL SISTEMA DE REPARACION DE BASES NO APAREADAS DEL ADN ENTRE *E. coli* Y *P. aeruginosa*. (Differences in the DNA mismatch repair system between *E. coli* and *P. aeruginosa*). Barra, J.L., Saavedra Pons, A., Jacuquin, D.K., Argaraña, C.E. Depto. de Quím. Biológica, CIQUIBIC - CONICET, Fac. de Cs. Quím. UNC, 5000, Cba. Argentina. jlbarr@dq.b.fcq.unc.edu.ar Subsidiado por Fund. Antorchas, CONICOR y SECYT-UNC.

La deficiencia del sistema de reparación de bases no apareadas del ADN ha sido asociada con la adquisición de patogenicidad y resistencia a distintos antibióticos en bacterias. En *E. coli* la reparación del ADN se inicia con la unión de MutS al heteroduplex. Posteriormente MutL y MutH interaccionan con MutS formando un complejo. MutH es una endonucleasa que degrada la hebra que contiene la mutación, la cual es discriminada de la hebra molde mediante la hemi-metilación de adeninas en las secuencias GATC (metilación "dam"). Nuestro interés es investigar este sistema de reparación en *Pseudomonas* debido a que son conocidos patógenos de plantas, animales y humanos, adquieren con facilidad resistencia a antibióticos y poseen una amplia versatilidad metabólica. Utilizando enzimas de restricción observamos que *P. aeruginosa* no posee metilación del tipo "dam" y además, en su genoma no hay secuencias con homología a MutH. La incorporación de un plásmido conteniendo el gen MutS de *P. aeruginosa* (clonado en nuestro laboratorio) complementa el fenotipo hipermutador de una cepa de *P. aeruginosa*, pero no de *E. coli*, en las cuales este gen fue eliminado. La proteína producida a partir del plásmido es de mayor peso molecular que el de la proteína endógena en la cepa WT, y su expresión en la cepa WT resulta en la desaparición de la proteína endógena. Estos resultados preliminares sugieren que al menos algunos aspectos del funcionamiento y regulación de este sistema de reparación del ADN son particulares de *Pseudomonas*.

260 - CLONADO DEL GEN DE UNA HEMOLISINA DE *VIBRIO CHOLERA* NO-O1 CODIFICADO EN UN PLASMIDO. (Cloning of a plasmid-encoded hemolysin gene from *Vibrio cholerae* no-O1). Bidinost C., Cortés P., Saka A. y Bocco J.L. Facultad Cs Químicas UNC, Córdoba, Argentina.

Vibrio cholerae no-O1 es una bacteria capaz de producir un cuadro clínico de gastroenteritis indistinguible del cólera. Si bien los factores de virulencia de estas cepas no productoras de toxina colérica, aún no han sido dilucidados, se han descrito diferentes toxinas como posibles elementos de patogenicidad. Dada la gran variabilidad genética de esta bacteria, los aislamientos en diferentes lugares geográficos podrían tener importantes variaciones en sus factores de virulencia. En nuestro laboratorio estamos estudiando cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas de pacientes de la ciudad de Córdoba, Argentina. Estas cepas son portadoras de un plásmido de 6 Kpb con número de copias intermedio, no replicativo en *E. coli* y no descripto hasta el momento. El clonado del plásmido demostró la presencia de un gen que codifica una hemolisina, detectable en *E. coli* por halo de lisis en agar-sangre, pero no en ensayos de hemólisis in tubo. Sin embargo, el análisis electroforético de las proteínas secretadas por el clon en *E. coli* permitió la detección de un polipéptido diferencial de aprox. 70 kDa, presente en *V. cholerae* no-O1 en similar intensidad. Estos resultados indicarían que el producto secretado en *E. coli* tiene menor actividad que el correspondiente de *V. cholerae*. El tamaño molecular encontrado se encuentra dentro del rango descripto para otras hemolisinas de *V. cholerae*. La secuencia del gen permitirá conocer la identidad de este probable factor de patogenicidad. La presencia del mismo en un plásmido de *V. cholerae* aún no descripto podría indicar un proceso de transferencia horizontal de genes de virulencia entre diferentes cepas de *V. cholerae*.

261 - IDENTIFICACION MOLECULAR DE UN NUEVO CLON EPIDEMICO DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM) EN CORDOBA, ARGENTINA. Molecular surveillance of nosocomial infections identifies a novel methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) epidemic clone. Sola C., Gribaudo G. y Bocco J.L. Dpto. Bioquímica Clínica. Fac. Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina.

En los últimos 20 años se observó un marcado incremento de las infecciones producidas por SAMR en todo el mundo ocasionando serios inconvenientes de diseminación intrahospitalaria. En nuestro país el porcentaje de resistencia a meticilina entre cepas hospitalarias fue del 62% en 1998. Estas cepas se han transformado en endémicas en numerosos hospitales y a partir de ellas ocasionalmente pueden surgir clones epidémicos. Con el fin de conocer las características moleculares de los clones epidémicos de SAMR con respecto a los clones esporádicos y/o endémicos de esta bacteria se analizaron 53 aislamientos clínicos de SAMR en 6 hospitales de la ciudad de Córdoba durante los meses de mayo a julio de 1999. Los resultados de la tipificación fenotípica indicaron que el 75% de las cepas fueron multi-resistentes, lo cual resalta su importancia como patógeno nosocomial, perteneciendo al grupo lítico III en la Fagotipia (64% de tipabilidad). Con el fin de indagar la similitud genética de estos aislamientos, el DNA cromosomal fue analizado por electroforesis en campo pulsado. Se logró clasificar a las cepas en 6 tipos clonales principales (A - F) y 25 subtipos, siendo los tipos A (38%) y B (34%) los más frecuentes. Los resultados de estos estudios permiten concluir que se ha identificado un nuevo clon epidémico (A), con elevada prevalencia en Córdoba (38%) que coexiste con el clon causante de brotes epidémicos y de mayor prevalencia en toda Sudamérica (B). Así, la identificación molecular de cepas de SAMR es un instrumento fundamental para el adecuado uso de las medidas de control de Infecciones nosocomiales (Financiado por: CONICET, FONCYT y SECYT-UNC)

262 - EL METABOLISMO DE GALACTOSIDOS EN *LACTOBACILLUS PLANTARUM*: CARACTERIZACION DE UN TRANSPORTADOR PUTATIVO. (Galactosides metabolism in *Lactobacillus plantarum*: Characterization of a putative transporter). Silvestroni A., Sesma F., Piard JC¹, and de Giori GS. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), 4000 S. M. de Tucumán, ARGENTINA. ¹: INRA Recherches Laitières et Génétique Appliquée, Jouy-en-Josas, France. E-mail: aurelio@cerela.org.ar.

Lactobacillus plantarum es una bacteria láctica homo-fermentativa que puede utilizar α -galactósidos de difícil digestibilidad presentes en alimentos de soja, rafinosa y estaquiosa, como fuente de carbono. Con la intención de desarrollar alimentos probióticos que disminuyan este problema, en nuestro laboratorio se estudia el metabolismo de los α -galactósidos en *Lactobacillus*. Se amplificó, clonó y expresó en *Escherichia coli* el gen (*melA*) que codifica para la enzima α -galactosidasa (α -gal) de *L. plantarum* ATCC8014. Se demostró también en el mismo "cluster", la presencia de otros genes relacionados al metabolismo de galactósidos, como los que codifican para las dos subunidades de la enzima β -galactosidasa (β -gal: *lacL* y *lacM*), y una región carboxilo terminal de un transportador putativo. En este trabajo, se describe el clonado y la secuencia completa del transportador putativo y sus características deducidas. Es una proteína de 70 kDa (652 aminoácidos), que no presenta péptido señal indicando que no se trata de una proteína de secreción. Tiene una identidad superior al 50% con transportadores de lactosa, galactosa, melibiosa y rafinosa de otras bacterias. La presencia de dominios transmembranares bien caracterizados sugieren que se trata de una proteína integral de membrana (programa TMAP). Actualmente se están llevando a cabo experimentos de expresión para precisar la especificidad del mismo. La homología observada y la ubicación en el mismo "cluster" indican que se trataría de un mismo transportador para diferentes azúcares.

263 - CARACTERIZACION GENETICA PRELIMINAR DE CEPAS BACTERIOCINOGENICAS DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*. (Preliminary Genetic Characterization of Bacteriocinogenic Strains of *Enterococcus faecium*). Saavedra, M.L., Fontana, C.; Ruiz Holgado A. Y Sesma F. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA). Chacabuco 145-4000 S.M.de Tucumán, Argentina. E-mail: lucila@cerela.org.ar

Algunas cepas de *E. faecium* son usadas como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos artesanales y productos probióticos. Una característica importante que presentan las mismas es su acción biopreservante debida a la formación de metabolitos con actividad antimicrobiana tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y principalmente bacteriocinas. Ensayos en nuestro laboratorio demostraron que *E. faecium* CRL10 y CRL35, producen una bacteriocina activa frente a patógenos alimentarios como *Listeria monocitogenes*.

Debido a que antecedentes previos indicaban que los determinantes genéticos de estas bacteriocinas se encontraban a nivel plasmídico, se realizó el clonado del plásmido pCRL35-1 de 30 kb de una de las cepas y se inició su secuenciación. Se analizaron las secuencias nucleotídicas de fragmentos obtenidos de diferentes genotecas de ADN plasmídico y se compararon con secuencias disponibles en base de datos (GeneBank) utilizando el programa Blast. Este análisis permitió identificar diferentes marcos de lectura abiertos codificantes para proteínas relacionadas con la replicación y movilización del plásmido, enzimas involucradas en la síntesis de EPS, enzimas de degradación de polisacáridos como pectato liasa la cual aun no fue descripta en bacterias lácticas.

Dado que los proyectos de secuenciación genómica en curso no involucran a los plásmidos nativos y estos fermentos probióticos se caracterizan por presentar un alto contenido de los mismos, estos resultados permitirán conocer la biología de los elementos extracromosomales y detectar nuevas propiedades de importancia biotecnológica.

264 - EFECTO DE DI-, TRI- Y OLIGOPEPTIDOS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE *Lactobacillus helveticus* CRL 1062 (Influence of di-, tri- and oligopeptides on the proteolytic activity of *L. helveticus* CRL 1062). Hébert EM, Raya RR, Sesma F, and de Giori GS. Centro de Referencia para Lactobacilos, 4000 S. M. de Tucumán, Argentina. E-mail: chebert@cerela.org.ar.

Lactobacillus helveticus CRL 1062 es una bacteria láctica termófila que presenta múltiples requerimientos nutricionales. Para su crecimiento en leche necesita la presencia de un sistema proteolítico completo, siendo la proteinasa (PrTH), asociada a la membrana celular, la enzima clave para la hidrólisis de la caseína. La síntesis de esta enzima es inhibida por la presencia de Casitona en el medio de cultivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto de 8 dipéptidos, 2 tripéptidos y 2 fracciones peptídicas provenientes de la Casitona (LMWP, péptidos de peso molecular inferior a 3000 Da y HMWP, péptidos de peso molecular superior a 3000 Da) sobre la actividad PrTH.

La máxima actividad PrTH se observó luego del crecimiento de *L. helveticus* CRL 1062 en un medio químicamente definido (SCDM). El agregado de LMWP a SCDM produjo una inhibición (90%) de la actividad PrTH, similar a la observada en presencia de Casitona. Por el contrario, PrTH no fue afectada por la presencia de HMWP en el medio de cultivo. Ninguno de los di- y tripéptidos analizados afectaron la actividad PrTH, con excepción de leucilprolina (5 mM), el cual redujo en un 25% la síntesis de PrTH. La formación de PrTH, a diferencia de la bien caracterizada actividad PrtP de *Lactococcus lactis*, fue insensible a la presencia de prolileucina en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos permiten señalar que dipéptidos específicos participan en la regulación de la síntesis de PrTH en *L. helveticus* CRL 1062.

265 - MODO DE ACCION DE LA BACTERIOCINA LACTOCINA 705 (Mode of action of lactocin 705). Castellaño, P¹; Minahk, C²; Palacios, J¹; Sesma, F¹ y Vignolo, G¹. ¹ Centro de Referencias para Lactobacilos (CERELA). Chacabuco 145, ²INSIBIO Chacabuco 463 - 4000 SM de Tucumán, Argentina.

Lactobacillus casei CRL705 produce una bacteriocina, lactocina 705, activa contra diferentes microorganismos, y particularmente patógenos alimentarios como *Listeria monocytogenes*. Su actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos catiónicos (α y β) de 33 residuos de aminoácidos cada uno. Recientes estudios demostraron que *L. casei* CRL705 es capaz de producir más de un tipo de bacteriocina, ya que cuando se utilizaron los péptidos (α y β) sintetizados químicamente, estos no mostraron actividad frente a *Listeria* y sí frente a otros organismos indicadores relacionados a la cepa productora. En este trabajo se presenta una caracterización preliminar del mecanismo de acción de la bacteriocina 705 purificada y de los péptidos sintéticos. Se estudió el mecanismo de acción sobre células enteras de *Listeria* y liposomas, utilizando bacteriocina purificada, comprobándose que en las primeras se produjo un inmediato eflujo de iones K^+ y Pi en ausencia de lisis. En liposomas de PC/PG indujo la pérdida de material fluorescente de hasta 60% en la máxima concentración ensayada. Además actuó en forma semejante a valinomicina, aunque con menos intensidad en liposomas cargados con KCl generando una hiperpolarización menos pronunciada. Cuando estos estudios se realizaron utilizando péptidos sintéticos se observó la pérdida de CF en liposomas artificiales, particularmente cuando contenían lípidos aniónicos. Sin embargo ningún efecto se observó utilizando células enteras de *Listeria*.

En base a estos resultados podríamos concluir que lactocina 705 posee una acción bactericida atribuible a la pérdida de iones a través de la membrana celular, generando la disipación del potencial de membrana. No obstante no se descarta la posibilidad de que otros procesos contribuyan a promover la muerte celular.

266 - EFECTO DE LA FRAGARINA SOBRE LA MEMBRANA CITOPLASMATICA DE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-) (Effect of Fragarin on the cytoplasmic membrane of Gram + and Gram - bacteria). Filippone, M.P., Farías, R., Díaz Ricci, J., Mamán, A. y Castagnaro, A. Dpto. de Bioquímica de la Nutrición del INSIBIO, UNT-CONICET. Argentina.

La Fragarina es un compuesto antimicrobiano de frutilla (*Fragria ananassa* cv. Chandler). Fue aislado en nuestro laboratorio a partir de la fracción soluble de hojas de plantas sanas y posee actividad antibiótica contra bacterias y hongos. Del análisis de curvas dosis-respuesta en bacterias fitopatógenas y aislados clínicos, se determinó que la EC_{50} es independiente del carácter gram (+) y gram (-). Con el objeto de determinar posibles mecanismos de acción antibiótica de la Fragarina, se evaluó su efecto sobre membranas bacterianas y liposomas. Ensayos realizados *in vivo* con *Enterococcus faecium* CRL35 que expresa una β -galactosidasa intracelular, mostraron que la Fragarina altera la permeabilidad de la membrana permitiendo detectar actividad de β -galactosidasa por el ingreso de ONPG. En experimentos realizados en bacterias gram (+) y gram (-) cargadas con el fluorescente DiSC3(5), se observó un aumento de fluorescencia por disipación de potencial y aumento de permeabilidad de la membranas proporcional a la concentración de Fragarina. Análisis del potencial de transmembrana en liposomas preparados con lípidos aislados de la bacteria Gram (+) *Clavibacter michiganensis* mostraron que la fragarina, produce la disipación del potencial inducido con valinomicina. Estos resultados permiten concluir que la fragarina altera la permeabilidad de la membrana causando la disipación del potencial, sugiriendo así, que el blanco de acción primario de este compuesto sería la membrana citoplasmática, afectando como consecuencia la viabilidad celular.

267 - ESTUDIO BIOQUIMICO Y MOLECULAR DE UNA MUTANTE DE *Pseudomonas aeruginosa* DEFICIENTE EN ACTIVIDAD BETAINA HOMOCISTEINA METILTRANSFERASA (BHMT). (Betaine Homocysteine Methyltransferase mutant of *P. aeruginosa*). Mariscotti, J., López, F., Serra, A., Lucchesi, G. y Lisa, A.T. Departamento Biología Molecular. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto. Argentina. e-mail: tlisa@exa.unrc.edu.ar

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo patógeno capaz de utilizar colina y algunos de sus metabolitos derivados como fuente de carbono y de nitrógeno. En estas condiciones se demostró que dimetilglicina (DMG), producto de la actividad betafina homocisteína metiltransferasa (BHMT), es el responsable de la inducción de actividades enzimáticas como colinesterasa, fosfolipasa C y fosforilcolina fosfatasa, involucradas en la patogenicidad de este microorganismo. Para determinar la importancia de DMG en el metabolismo de *P. aeruginosa*, se obtuvo una mutante transposicional (ALS-96) afectada en el gen que codifica para la BHMT. Mediante estudios moleculares se identificó el fragmento cromosómico interrumpido por Tn5-751 responsable de la síntesis de la BHMT y se localizaron sitios de corte para diferentes enzimas de restricción.

Se clonaron los fragmentos génicos localizados corriente arriba y abajo del transposón Tn5-751. Se obtuvieron plásmidos recombinantes por ligación entre fragmentos *SalI* de aproximadamente 5-8 kb del DNA adyacente a los brazos IS50L e IS50R del transposón. El vector utilizado fue pBluescript, digerido con la misma enzima. Los estudios bioquímicos llevados a cabo con la cepa mutante y la silvestre demuestran la importancia de DMG en la regulación de: i) proteínas relacionadas al metabolismo de colina, como las involucradas en el transporte o en la síntesis de DMG (BHMT), y, ii) proteínas relacionadas al metabolismo de Pi sensibles a la presencia en el medio de cultivo de estos compuestos nitrogenados.

268 - MODIFICACION DE LA FUNCION DE UN ION ZN(II) EN LA METALO- β -LACTAMASA DE *B.CEREUS*.

(Modification of the function of a Zn(II) ion in the metallo- β -lactamase of *B.cereus*). Rasia,R.M., Vila,A.J. Area Biofísica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

Las metalo- β -lactamasas son enzimas bacterianas que hidrolizan antibióticos β -lactámicos, confiriendo resistencia contra los mismos a los microorganismos que las producen. La actividad de estas enzimas depende de la presencia de Zn(II) en su sitio activo. La metalo- β -lactamasa de *Bacillus cereus* (β LII) es activa en presencia de un equivalente de Zn(II) por molécula de enzima y su actividad se incrementa por la unión de un segundo equivalente de Zn(II). El residuo Arg91 de β LII participa en la conformación de su sitio activo pero no es ligando de los metales. Hemos mutado Arg91 por His y por Glu. Las enzimas mutantes son activas en forma mononuclear, pero son inhibidas por la incorporación de un segundo equivalente de Zn(II). La estructura del sitio activo de las enzimas mutantes se caracterizó por métodos espectroscópicos. Los espectros de XANES para Zn(II) muestran que el primer sitio de unión a Zn no se ve alterado. El espectro UV-visible de los derivados de Co(II) evidencia una alteración en el sitio de unión del segundo equivalente de metal. Estos datos y el análisis de la estructura de enzimas homólogas, sugieren que el residuo introducido se comportaría como ligando del segundo ion Zn(II), lo que explicaría el efecto inhibitorio observado en las mutantes.

269 - PERFILES COMUNES DE *S. AUREUS* AISLADOS DE HUMANOS Y BOVINOS POR RAPD-PCR Y PFGE

(Similarity of RAPD-PCR and PFGE patterns of *S. aureus* isolated from cows and humans) Reinoso E.¹, Bettera S.¹, Bogno C.¹, Toledo A.¹, Calzolari A.^{1,2} (1) Universidad Nacional Río Cuarto TE/FAX 54(0)358-467-6238 (2) Universidad Nacional Villa María, Argentina - e-mail: ereinoso@exa.unrc.edu.ar.

Staphylococcus aureus es productor de infecciones en humanos y animales, destacándose en Argentina la mastitis bovina. En este trabajo se utilizaron técnicas de tipificación molecular (RAPD-PCR y PFGE) para analizar las posibles interrelaciones epidemiológicas entre cepas de *S. aureus* de origen bovino (n=76) y humano (n=48) de casos clínicos (n=86) y no clínicos (n=38). Al ensayar las cepas por separado (RAPD-PCR) con un primer, tanto las cepas de origen humano como bovino de casos clínicos, mostraron un patrón de bandas semejante (6 comunes de 9 totales, 66%). En contraste, ese patrón fue diferente al de las cepas aisladas de casos no clínicos (6/8, 75%). Estos datos fueron corroborados mediante el análisis de grupos ("pools") de DNA de 10 cepas al azar de cada población. Los resultados indicaron que las cepas de *S. aureus* de casos clínicos mostraron un patrón de bandas comunes, distinto al del patrón mostrado por las cepas de casos no clínicos. Además, las cepas de casos clínicos, humanas y bovinas, mostraron un perfil de bandas comunes al ser analizadas por gradiente en campos pulsantes (PFGE) (11/15, 73%). Estos resultados son alentadores para la búsqueda de marcadores moleculares en *S. aureus*.

270 - SELECCION *IN VIVO* DE GENES DE *BRUCELLA ABORTUS* RELACIONADOS CON LA VIRULENCIA.

(In vivo selection of *Brucella abortus* genes related with virulence). Briones^{1,2}, G. Roset¹, M., Ciochini A.¹, Iñón de Iannino¹, N. y Ugalde¹ R. A. (1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-UNSAM. (2) Grupo Brucelosis CNEA.

Brucella abortus S19 es una mutante bacteriana atenuada espontáneamente, ampliamente utilizada como vacuna en el control de la brucelosis. No se conocen aún los genes afectados que dan el fenotipo avirulento. Con el objeto de aislar estos genes, se conjugó en masa (de a cien clones) la cepa vacunal con una biblioteca genómica de *B. abortus* 2308 (cepa salvaje). Las cepas transconjugantes se inyectaron por vía subcutánea en ratones BALB/c y se estudió su recuperación en bazo a las dos semanas posinfección. De la selección *in vivo* se aislaron cinco cósmidos distintos, los que incrementaron significativamente la virulencia de la cepa vacunal en ratón. El cósmido pPat3 que incrementó en mayor grado el recuento en bazo (6×10^7) fue secuenciado íntegramente (5,3kb). Por homología de secuencia se encontraron genes de la vía del cetoácido para el metabolismo de los catecoles, un gen con similitud a *fipA* de *Fusobacterium nucleatum*, involucrado en la inmunosupresión de linfocitos T y algunos genes de vías biosintéticas universales. Se discute su posible participación en la virulencia de *B. abortus*.

271 - LAS MUTANTES *cgs* DE *B. abortus* FRACASAN EN ALCANZAR SU NICHO REPLICATIVO EN CELULAS HELA.

(*B. abortus* *cgs* mutants are unable to reach successfully their replicative niche in HeLa cells). Briones, G.^{1,2}, Iñón de Iannino, N.¹, Gorvel, J.P.³ y Ugalde R.A.¹. (1) Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-UNSAM. (2) Grupo Brucelosis CNEA. (3) Centre d'Immunologie du Marseille-Luminy

Brucella abortus replica eficientemente en células fagocíticas no profesionales (células HeLa). El fagosoma que transporta a *Brucella*, interactúa con la vía endocítica en los primeros minutos posteriores a la entrada de la bacteria, adquiriendo EEA1 y el receptor de transferrina, marcadores específicos de endosomas tempranos. Posteriormente *Brucella* evita la fusión de su fagosoma con endosomas tardíos y lisosomas, alcanzando el nicho replicativo, en el retículo endoplásmico. Mutantes de *B. abortus* para la síntesis de glucanos β 1-2 cíclicos (mutantes *cgs*) tienen disminuida la capacidad de replicar intracelularmente en células HeLa, además de encontrarse afectada su virulencia en ratones BALB/c. Mediante la técnica de inmunofluorescencia contra marcadores específicos de distintos compartimientos celulares y microscopía confocal, se estudió el tránsito intracelular de la mutante *cgs*. Pudo observarse que las mutantes *cgs* infectan las células en igual medida que la bacteria salvaje pero que a diferencia de ésta, su capacidad de alcanzar el nicho replicativo se encuentra fuertemente afectada, hecho sugerido por la ausencia de colocalización de los marcadores de *B. abortus* (LPS), con los marcadores de RE (calreticulina, calnexina). La colocalización con los marcadores CathepsinA y LAMP2 indica que las vesículas que contienen las mutantes *cgs* se fusionan masivamente a los lisosomas.

272 - LA DEGRADACION DE POLIHIDROXI-ALCANOATOS (PHAs) ESTA ASOCIADA A LA ACUMULACION DE NUCLEOTIDOS Y AUMENTA LA RESISTENCIA A ESTRES EN *Pseudomonas oleovorans*.

(Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance in *P. oleovorans*). Ruiz, J.¹, López, N.^{1,2}, Fernández, R.³ y Méndez, B.¹. ¹Departamento de Química Biológica and ² Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1428 Buenos Aires y ³ Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina. Subvencionado por UBA y ANPCYT.

P.oleovorans GPO1 y su mutante de depolimerización de PHA, GPO500 *phaZ*, residiendo en microcosmos de aguas naturales, se utilizaron para estudiar el efecto de los PHAs en la sobrevivencia y la resistencia a agentes de estrés. La cepa salvaje mostró una sobrevivencia aumentada, una demora en la aparición de una forma celular redonda, y mayor porcentaje de sobrevivencia luego de los tratamientos térmicos o con etanol con respecto a la mutante. En base a estos resultados y a experimentos germinales que sugerían una relación entre utilización de PHA y la fosforilación oxidativa investigamos la acumulación de ATP y ppGpp en condiciones de cultivo que permitían observar la depolimerización del PHA. Un aumento en los niveles de ATP y ppGpp apareció en concordancia con la degradación del polímero. Este fenómeno no se observó en la mutante, mas la complementación de la mutación *phaZ* restauró el fenotipo original.

Agrad.: B. Witholtz y A. Steinbüchel por cepas y plásmidos.

273 - RELEVAMIENTO Y CINETICA DE PRODUCCION DE H₂O₂ EN LACTOBACILOS VAGINALES BOVINOS.

(H₂O₂ screening and production kinetics in bovine vaginal lactobacilli). Otero, C.¹, Ruiz Holgado A.^{1,2} y Nader-Macías, M.E.¹ 1. CERELA-CONICET. Chacabuco 145. 4000. Tucumán. 2. Fac. de Bioqca. Qca y Fcia. U.N.T. E-mail: mmacias@cerela.org.ar

En trabajos previos se realizó la caracterización de la microflora vaginal bovina durante el crecimiento y ciclo estral de vaquillonas. Se aislaron 73 cepas de lactobacilos en los que se estudiaron propiedades probióticas (hidrofobicidad, hemaglutinación y producción de sustancias inhibitorias frente a patógenos bovinos), con el propósito de seleccionar aquellas que puedan ser incluidas en un producto probiótico de uso veterinario. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento de la producción de H₂O₂, en los lactobacilos aislados y su cinética de producción en dos de las cepas seleccionadas. Se usó como método de relevamiento la formación de colonias coloreadas en MRS agar con peroxidasa y TMB (3,3',5,5' tetrametil benzidina), incubadas en microaerofilia a 37°C (48 hs) y luego expuestas al aire. Los resultados indican que el 23% de los lactobacilos aislados son fuertemente productoras (colonias marrón o azul oscuro), 34% productoras (azul o marrón), 38% débilmente productoras (marrón claro) y 5% no productoras (sin cambio de color al aire). La cinética de producción se estudió en *L. acidophilus* 1012 y 2014, en 4 condiciones diferentes: MRS y LAPTg, con y sin agitación. Ambas cepas muestran mayor crecimiento en condiciones estáticas, pero la producción de H₂O₂ es superior en ambos medios en agitación con un incremento en la fase exponencial (en Laptg) y estacionaria (en MRS).

Trabajo subsidiado por Academia Nacional de Agronomía y veterinaria, CONICET y CIUNT.

274 - ESTIMACION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO DE LACTOBACILOS VAGINALES PRODUCTORES DE H₂O₂.

(Estimation of growth parameters of vaginal H₂O₂-producing lactobacilli). Juárez Tomás, M.S.¹, Bru, E.¹, Ruiz Holgado, A.^{1,2}, Nader-Macías, M.E.¹ 1. CERELA-CONICET Chacabuco 145. 4000. Tucumán. Argentina 2. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. U.N.T. E-mail: mmacias@cerela.org.ar.

En trabajos previos, se caracterizaron cuatro cepas de lactobacilos vaginales productoras de H₂O₂: *Lactobacillus crispatus* CRL 1266, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* CRL 1333, *L. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 1251 y CRL 1289. Debido a su potencial aplicación tecnológica en productos farmacéuticos, el objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de crecimiento en diferentes medios de cultivo: MRS, LAPTg, M17 (adicionado con glucosa al 1%) y BHI (pH6.5), a 37°C, empleando inóculos de 2 y 5%. El crecimiento se evaluó por espectrofotometría (540 nm) y medición de pH. Los parámetros de crecimiento se estimaron por mínimos cuadrados utilizando el algoritmo de Rosenbrock-quasi-Newton y aplicando el modelo de Gompertz modificado por Zwietering y col. *L. crispatus* CRL 1266, *L. delbrueckii* CRL 1333 y *L. paracasei* CRL 1251 mostraron buen crecimiento en MRS o LAPTg, pero no en BHI o M17-glucosa. Sólo *L. paracasei* CRL 1289 alcanzó una mayor densidad óptica en LAPTg que en MRS. La fase lag estuvo inversamente relacionada al inóculo inicial. Para cada microorganismo, las velocidades de crecimiento y los tiempos de generación variaron según el medio de cultivo empleado. Nuestros resultados indican que se obtienen buenos rendimientos en LAPTg, un medio más económico, usando un inóculo al 2%.

Trabajo subsidiado por CIUNT y CONICET.

275 - PROTECCION DE LACTOBACILLUS FERMENTUM FRENTE AL DESAFIO CON STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE EN EL TRACTO RESPIRATORIO DE RATONES.

(Protection of *L. fermentum* against *S. pneumoniae* challenge in the respiratory tract of mice). Cangemi R.¹, Santos V.¹, y Nader-Macías M.E.² 1. Fac. de Bioquímica, Química y Farmacia. U.N.T. 2. CERELA-CONICET. Chacabuco 145. 4000. Tucumán. Argentina. E-mail: mmacias@cerela.org.ar.

En trabajos previos se seleccionaron lactobacilos probióticos de la flora indígena del tracto respiratorio murino. Se determinó la dosis óptima de *L. fermentum* administrado intranasalmente, para colonizar el tracto respiratorio hasta el 7mo día. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la administración intranasal de *L. fermentum* protege frente al desafío con *S. pneumoniae* inoculado por esa misma vía. Para ello, ratones BALB/c fueron inoculados con *L. fermentum* (4 dosis de 1x10⁷ UFC) cada 12 horas, y luego desafiados con *S. pneumoniae* (1x10⁹ UFC). Los animales se sacrificaron en diferentes días post-inoculación, determinándose el número de microorganismos en homogenatos de órganos respiratorios, los niveles de anticuerpos séricos anti-*S. pneumoniae* (por aglutinación), y los cambios celulares cuali y cuantitativos en improntas de pulmón. Los resultados muestran que en los animales protegidos con *L. fermentum* se obtiene a) un menor número (3 U log menos) del patógeno en el tracto respiratorio (día 4), b) un incremento de los niveles de anticuerpos anti-*S. pneumoniae* séricos (5 veces mayor título en los días 5 y 7) y c) un mayor número de macrófagos activados (1,5 a 2 veces) en improntas de pulmón (días 5 y 7). Estos resultados demuestran que *L. fermentum* inoculado intranasalmente actúa como probiótico, protegiendo frente al desafío con *S. pneumoniae* en este modelo experimental

Trabajo subsidiado por CIUNT y CONICET

276 - ENZIMAS DE DETOXIFICACION EN *S. mansoni*
(Detoxification enzymes in *S. mansoni*). Girardini, J.E.*; Amirante, A.*; Dissous, C.† y Serra, E.C.*. *Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR). UNR. Suipacha 531. Rosario. Argentina. †Instituto Pasteur de Lille. Francia. jgirardi@fbioyf.unr.edu.ar

Los helmintos presentan sistemas de detoxificación basados en actividades reductoras e hidrolíticas, en contraste con los mamíferos que poseen sistemas oxidativos. *S. mansoni* cuenta con una variedad de actividades implicadas en procesos de detoxificación, como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST). No se ha detectado la presencia de enzimas del tipo de citocromo P450 ni de catalasas. GST cataliza la conjugación de compuestos con glutatión y puede representar hasta el 5 % del contenido proteico del parásito. Se ha detectado la presencia de actividades reductoras dependientes de NADP⁺ capaces de metabolizar carbonilos citotóxicos generados en condiciones de stress. Otra actividad detoxificante de posible existencia de estos organismos es la reducción no enzimática de compuestos tóxicos mediante moléculas reductoras como el ácido ascórbico.

Se identificó y se subclonó un ADN copia (ADNc) que codifica un polipéptido con homología a ferredoxina-NADP⁺ reductasas mitocondriales (SmFNR). Se estudió la expresión del gen mediante RT-PCR y western blot. Se analizó la presencia de actividad diaforasa en extractos de distintos estadíos. A partir de ADNc de *S. mansoni* se aisló una secuencia con homología a dihidroascorbato reductasa dependiente de glutatión (GDHAR). Se construyó un plásmido de expresión y se expresó la proteína recombinante (SmGDHAR) en *E. coli*. Utilizando plásmidos de expresión generados para las GSTs de 26 y 28 kDa (SmGST 26 y 28), para SmFNR y para SmGDHAR se transformaron mutantes de *E. coli* sensibles a stress oxidativo y se analizaron sus características de crecimiento en diferentes condiciones.

Panels IV

METABOLISMO MICROBIANO

277 - MUTANTES *cgt* DE BRUCELLA ABORTUS NO AFECTAN LA INVASION NI LA REPLICACION EN CELULAS HELA. (The invasion and replication of HeLa cells by *Brucella abortus* *cgt* mutants are not affected). Roset, M., Ugalde, R. A. y Iñón de Iannino, N. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, IIB-UNSAM - INTECH-CONICET. Av. Gral Paz entre Albarellos y Constituyentes, INTI, Edif 24 (1650).

B. abortus es una bacteria facultativa intracelular que infecta animales y humanos. Los mecanismos por los cuales dicho patógeno se adhiere e infecta células no se conocen aún. *Brucella* sintetiza glucanos β -1,2 cíclicos al igual que *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Mutantes en la síntesis (*chvB/ndvB*) y/o transporte (*chvA/ndvA*) de los glucanos en *Agrobacterium* y *Rhizobium* están afectadas en su interacción con las plantas. En *Brucella* hemos demostrado la localización de los glucanos en el periplasma sugiriendo la presencia de un transportador. Recientemente encontramos en *Brucella* un gen homólogo al *chvA/ndvA* el cual complementó una mutante *chvA* de *Agrobacterium*. Mutantes de *B. abortus* en la síntesis de glucanos β -1,2 cíclicos (*cgs*) tienen disminuida la virulencia. Se estudió si mutantes en el transporte de glucanos al espacio periplásmico (*cgt*) afectan la virulencia de *Brucella*. Se obtuvo por introducción de distintos cassettes y posterior recombinación homóloga mutantes en el gen aislado previamente y en dos nuevos genes que presentarían también alta similitud con *cgt* obteniéndose una simple, doble y triple mutante. Se estudió el efecto de dichas mutaciones sobre la virulencia de *Brucella*. Se evaluó el rol que cumplen los glucanos en la infectividad estudiando las mutantes en ratones Balb/c y en células HeLa. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos modelos estudiados. Estos resultados sugieren la existencia en *Brucella* de transportadores redundantes para los glucanos cíclicos.

278 - ADHESION A ENTEROCITOS COMO FACTOR DE VIRULENCIA DE *BACILLUS CEREUS* (Adhesion to enterocytes as a virulence factor for *Bacillus cereus*). Minnaard, J.^{1,2,3}; Pérez, P.F.^{1,2,3,4}. CIDCA¹-Cátedra de Microbiología General, Facultad de Ciencias Exactas UNLP². -ANPCyT³-CONICET⁴. 47 y 116 (1900), La Plata, Argentina.

La capacidad de los microorganismos de interactuar con las células del hospedador está relacionada con la virulencia. Los esporos de *Bacillus cereus* son capaces de adherirse a enterocitos humanos *in-vitro*, pero la adhesión de células vegetativas no ha sido estudiada.

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la interacción entre *Bacillus cereus* y enterocitos humanos en cultivo.

Microorganismos crecidos en BHI se coinubaron con células Caco-2 diferenciadas, se efectuaron observaciones microscópicas (óptica y electrónica de barrido) y recuentos microbianos. La interacción entre células vegetativas de *Bacillus cereus* y enterocitos dependió de la edad del cultivo. La eliminación por lavados de material superficial débilmente unido, condujo a una disminución de la adhesión. La microscopía electrónica mostró un estrecho contacto entre los microorganismos y las microvellosidades. La adhesión de ciertas cepas de *Bacillus cereus* sobre las células Caco-2 dio lugar a un marcado efecto citopático que condujo al desprendimiento de la monocapa celular. Esto se hizo particularmente evidente con cultivos en fase exponencial de las cepas 2 y 3.

El presente estudio demuestra que células vegetativas de *Bacillus cereus* son capaces de establecer interacciones con células de epitelio intestinal humano en cultivo. Dichas interacciones conducen a cambios importantes de la anatomía celular y podrían considerarse como factores de virulencia adicionales de este microorganismo.

Este trabajo fue financiado por la ANPCyT PICT 1154.

279 - EFECTO DE ACIDOS DE CADENA CORTA SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA DE *Streptococcus bovis*. (Effect of short-chain acids on aminopeptidase activity of *Streptococcus bovis*). Paggi, R.A. y Martone, C.B. IIB, FCEyN-UNMDP. CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina. E-mail: paggi@mdp.edu.ar

S. bovis es un componente normal de la comunidad microbiana ruminal. La contribución de esta bacteria a la actividad proteolítica ruminal es importante, ya que su actividad constitutiva de aminopeptidasa es endopeptídica siendo ésta la etapa limitante en la degradación proteica ruminal. Las concentraciones de ácidos de cadena corta, productos finales de la fermentación ruminal, varían en el rumen con la composición o tipo de alimentación. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de los ácidos de cadena corta sobre la actividad proteolítica de *S. bovis*. Para la determinación de la actividad proteolítica de esta bacteria los ensayos realizados fueron: a) zimogramas con gelatina como sustrato y medio de cultivo libre de células precipitado con etanol como fuente de enzimas; b) ensayos *in vitro* con péptidos sintéticos fluoro-génicos como sustrato y célula entera o extractos como fuente enzimática. Los tratamientos utilizados fueron los ácidos acético, propiónico, butírico y láctico, y mezclas de los mismos. NaCl y etilenglicol (EG) fueron usados como controles para los cambios de la fuerza iónica y/o osmolaridad. Los zimogramas mostraron que la actividad proteolítica de *S. bovis* estaba presente en los medios de cultivo y que no fue inhibida totalmente por los tratamientos. Los ensayos sobre sustrato sintético demostraron que es indistinto usar extracto o célula entera como fuente enzimática. Ninguno de los tratamientos, ya sea los ácidos de cadena corta, NaCl o el EG, produjeron inhibición de la actividad aminopeptidasa de *S. bovis*. Sólo los tratamientos con los ácidos acético y propiónico incrementaron significativamente la actividad en 14,5 y 9,0 %, respectivamente, con respecto al control sin agregados. Estos tratamientos no son significativamente diferentes entre sí.

280 - ROL DEL LIPOPOLISACARIDO DE *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* EN LA PATOGENESIS Y PERSISTENCIA DE LA BACTERIA EN EL HOSPEDADOR. (Role of bacterial lipopolysaccharide in *Bordetella bronchiseptica* pathogenesis and persistence within the host). Sisti, E. (1), Fernández, J. (1,2), Lagares A. (1), Rodríguez, M.E. (2) y Hozbor, D.(1,2). (1) IBBM (2) CINDEFI. (1) y (2) Fac. Cs. Exactas, UNLP 47 y 115. 1900 La Plata.

B. bronchiseptica, agente causal de enfermedades respiratorias, posee la capacidad de persistir en forma indefinida en el hospedador estableciendo infecciones asintomáticas. En general la sobrevivencia de la bacteria requiere de un continuo monitoreo de las condiciones externas y de la capacidad de emplear esta información para desarrollar una respuesta adaptativa. Si bien la variabilidad estructural del lipopolisacárido (LPS) frente a diferentes señales externas y en curso de la infección ha sido reportado, al presente queda aún por establecer la contribución del LPS y su variabilidad estructural en la patogénesis y persistencia en el hospedador. Para esclarecer estos aspectos hemos construido y caracterizado tanto *in vitro* como *in vivo* un mutante en *B. bronchiseptica* que presenta un fenotipo de LPS deep rough (*BbwaaC*). El mutante *Bb waaC* produce niveles detectables pero disminuidos de los principales factores de virulencia. Estudios *in vitro* de invasión y sobrevivencia empleando células epiteliales de pulmón mostraron una significativa reducción de la capacidad de invasión y sobrevivencia de la cepa mutante. Este resultado se corrobora con lo observado en el modelo de infección de *Bordetella* en ratones. En este modelo se observó que cuando se administra intranasalmente una suspensión de *Bb waaC* en dosis subletales, el valor de CFU en pulmón decae significativamente a los cinco días post infección. Estos resultados ponen de manifiesto que la aparición de la mencionada alteración del LPS sería una respuesta adaptativa a largo plazo pero no representa un mecanismo bacteriano de optimización de los estadíos iniciales de colonización y persistencia.

281 - ULTRASENSIBILIDAD EN LA VIA DE SINTESIS DE GLUCOGENO EN CIANOBACTERIAS. (Ultrasensitivity in the glycogen synthetic pathway in cyanobacteria). Gomez Casati, D., Aon, M.A., Cortassa, S. e Iglesias, A.A. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH/CONICET) C.C. 164, 7130 - Chascomús, Buenos Aires, ARGENTINA. E-mail: iglesias@criba.edu.ar

Cianobacterias del género *Anabaena* PCC 7120 fueron permeabilizadas con una mezcla de tolueno:etanol (1:4 v/v). Cuando estas células permeabilizadas se incubaron con los sustratos de la ADPGlc PPasa, ATP y [14C]Glc1P, o [14C]ADPGlc (sustrato de la glucógeno sintasa) la marca radiactiva se recuperó cuantitativamente en el α -1,4-glucano sintetizado. Los parámetros cinéticos y las propiedades regulatorias de ambas enzimas determinados en *Anabaena* PCC 7120 permeabilizada ("in situ") fueron similares a los medidos in vitro con las respectivas enzimas purificadas. Previamente hemos reportado que en presencia de un medio superpoblado molecularmente, elicitado por polietilenglicol, la ADPGlc PPasa exhibe una respuesta ultrasensible hacia el activador alostérico 3-fosfoglicerato (3PGA). De manera similar a lo que ocurre in vitro en condiciones de superpoblamiento molecular, se determinó en células permeabilizadas que bajo ciertas condiciones fisiológicas la síntesis de glucógeno exhibe una respuesta ultrasensible en presencia de 3PGA.

Los datos obtenidos experimentalmente y por modelización matemática sugieren que la ADPGlc PPasa puede funcionar como un dispositivo tipo "switch" para la síntesis de polisacáridos durante la transición día-noche.

282 - LA O-ACETILSERINA ES UN INDUCTOR DE LA EXPRESION DEL OPERON *cysH* DE *Bacillus subtilis*. (O-acetylserine is an inducer of expression of *Bacillus subtilis* *cysH* operon). Mansilla, M. C., Albanesi, D. y de Mendoza, D. IBR-CONICET y Dpto. de Microbiología, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR. Suipacha 531 (2000) Rosario. Fax: 0341-4390465. E-mail: cmansil@infovia.com.ar.

En nuestro laboratorio hemos determinado que la expresión del operón *cysH* de *B. subtilis*, el cual incluye seis genes involucrados en la biosíntesis de cisteína, está regulado a nivel del inicio de la transcripción. La expresión del operón *cysH* es inducida por privación de azufre y fuertemente reprimida en presencia de cisteína. En *Escherichia coli* la transcripción del regulón cisteína también está regulada a nivel de la iniciación, y su inducción requiere limitación de azufre, la presencia de *N*-acetilserina (NAS) y del activador transcripcional CysB. Para probar el efecto de la NAS y la *O*-acetilserina (OAS) sobre la expresión del operón *cysH* de *B. subtilis*, realizamos estudios transcripcionales con una fusión *cysH-lacZ* en la cepa 1A3, auxótrofa para OAS, y en la cepa salvaje JH642. Nuestros resultados indican que la OAS incrementa la expresión del operón *cysH*, aun en presencia de cisteína. El efecto de la OAS sobre la transcripción de *cysH* es independiente de la limitación de azufre e insensible a la represión por cisteína. Proponemos entonces, que el efecto negativo de la cisteína sobre la transcripción de este operón se debe a una interferencia con la síntesis de OAS, modulando la concentración del inductor.

283 - CLONADO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DEL COMPLEJO DE LA CITRATO LISAS DE *Lactococcus lactis* CRL264. (Cloning and Molecular Characterization of the Citrate Utilization Cluster of *Lactococcus lactis* CRL264). S. Peiru, M. Martin, C. Marcozzi, D. de Mendoza, Ch. Magni. IBR, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR), Dpto. de Microbiología (FCByF-UNR). Suipacha 531 (2000) Rosario.

El metabolismo de citrato en bacterias lácticas requiere de un sistema específico de transporte (CitP), un complejo enzimático que permite su degradación a oxaloacetato y acetato (Citrato Liasa) y una oxaloacetato decarboxilasa. Estudios previos realizado en la cepa de *L. lactis* CRL264 demostraron que el sistema de transporte de citrato (de codificación plasmídica) se induce a pH ácidos mientras que el transporte y degradación de citrato en *Leuconostoc* J1 (de codificación plasmídica) es inducido por citrato.

Para obtener mayor información sobre la estructura y regulación de los genes involucrados en el metabolismo de citrato en *L. lactis* se procedió a su clonado y caracterización molecular. Se observó que en la cepa en estudio, los genes codificantes para la citrato liasa forman un cluster de localización cromosómica en una organización molecular diferente a las ya conocidas. Dentro de la región 5' adyacente a este grupo de genes y ubicado en la orientación contraria se observó la presencia de un gen que presentó homología a reguladores bacterianos SorC. Mediante análisis transcripcionales se demostró que, a diferencia de lo que ocurre en otras cepas, los niveles de transcritos tanto para la citrato liasa como para el putativo regulador incrementan a pH ácidos independientemente del citrato. Estos resultados fueron confirmados por medida de la actividad citrato liasa en idénticas condiciones.

284 - FOSFOLIPASA FOSFATIDILINOSITOL ESPECIFICA EN *LACTOBACILLUS* (Phosphatidylinositol-specific PLC in *Lactobacillus*). Rodriguez, A.V.¹, Baigori, M.D.², Alvarez, S.¹, Castro, G.R.² y Oliver, G.¹ CERELA. Chacabuco 145, 4000-Tucumán, ARGENTINA. ² PROIMI. Av. Belgrano y Caseros, 4000 Tucumán, ARGENTINA. E-mail: anavirt@cerela.org.ar.

La selección de microorganismos para uso probiótico requiere la realización de tests in vivo e in vitro, entre los que se destaca la capacidad de translocar de un microorganismo. El papel de las fosfolipasas en mecanismos de agresión bacteriana ha sido estudiado en numerosos microorganismos, pero no existen referencias previas de actividad fosfolipasas en bacterias lácticas (BL). El objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de actividad fosfolipasa en BL con capacidad de translocar. Se construyeron liposomas formados por fosfatidilinositol (PI, 20 mg/ml) en buffer TRIS 20 mM (pH 7.2). Actividad fosfolipasa C PI-específica (PI-PLC) fue detectada en 44% de las cepas estudiadas. Para establecer la capacidad de translocar de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, el mismo fue administrado a ratones BALB/c en una dosis diaria de 1.5-2.0 x 10⁹ microorganismos/ratón de 2 a 7 días. Se detectó translocación en hígado y bazo a los 7 días. Los resultados expresados en log UFC/g órgano fueron: 4.23±1.01 en hígado y < 2.0 en bazo. Los microorganismos translocados que mostraron propiedades bioquímicas (Gram, catalasa, crecimiento a 45°C, fermentación de azúcares, etc) semejantes a la cepa ATCC 7469 fueron identificadas mediante RAPD. Empleando diferentes primers se obtuvieron dos patrones de amplificación diferentes. De las seis cepas testeadas dos compartían el mismo perfil, idéntico al de la cepa ATCC 7469, indicando la presencia de la misma en hígado. La actividad PI-PLC no se modificó por el proceso de translocación. Estos resultados demuestran por primera vez la presencia de actividad fosfolipasa en bacterias lácticas asociadas a procesos de translocación. Proyecto subsidiado por CONICET, Fundación Antorchas, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina).

285 - MUTACIONES QUE AFECTAN LA ADQUISICION DE HIERRO EN *Sinorhizobium meliloti* 242 SE UBICAN EN GENES SIMILARES A *rhtA*, *rhrA*, *sitC* y *sitD*. (Mutations involved in iron acquisition in *Sinorhizobium meliloti* 242 are located in *rhtA*, *rhrA*, *sitC* and *sitD* like genes). Platero, R., Battistoni, F., Arias, A. y Fabiano E. Div. Bioquímica. IIBCE. Montevideo. Uruguay. rufo@iibce.edu.uy

Los rizobios (bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno) poseen sistemas de alta afinidad que les permiten utilizar el hierro a partir de su sideróforo, de sideróforos-férricos exógenos o de compuestos con grupos hemo. Con la finalidad de caracterizar estos sistemas, hemos obtenido mutantes de la cepa 242 de *Sinorhizobium meliloti* defectuosas en la adquisición de hierro. Las mutantes H21, H26, H36 y H38 se obtuvieron mediante una única inserción genómica del transposón Tn5-1063a. De acuerdo a su fenotipo se clasificaron como defectuosas en: la utilización de su propio sideróforo (H21), la utilización de más de un compuesto como fuente de hierro (H26 y H36) y la producción o liberación de sideróforos al medio (H38). En H21 la mutación se ubicó en una región del ADN idéntica a parte del gen *rhtA*. En *S. meliloti* 1021 *rhtA* codifica para el receptor de la Rizobactina 1021. En H38 la región genómica interrumpida se identificó como *rhrA*, gen que codifica para un activador del tipo AraC, posiblemente involucrado en la regulación del operón de la Rizobactina 1021. Las mutantes H26 y H36 no fueron capaces de utilizar diversos sideróforos ni compuestos con grupos hemo como fuentes de hierro. Las regiones mutadas mostraron un alto nivel de similitud con proteínas pertenecientes al grupo de importadores ABC-3 implicados en otras bacterias, en el transporte de hierro y otros metales.

Agradecimientos: IFS, PEDECIBA y CONICYT-Fondo C. E.

286 - GLUTAMATO Y METIONINA: DOS AMINOACIDOS QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA DE *Sinorhizobium meliloti* 242 A LA FALTA DE HIERRO. (Glutamate and methionine: two aminoacids that influence the response of *Sinorhizobium meliloti* 242 to iron-limitation). Fabiano E., Battistoni, F., Platero, R. y Arias, A. Div. Bioquímica. IIBCE. Montevideo. Uruguay. efabiano@iibce.edu.uy.

El hierro es un metal esencial para la vida pero puede resultar un potente tóxico; su presencia es muy abundante en la corteza terrestre pero está poco disponible para los organismos. Estas aparentes paradojas han forzado a los seres vivos a desarrollar refinados sistemas para su adquisición los cuales se encuentran bajo un complejo mecanismo de regulación. En bacterias se han descrito al menos tres niveles de regulación transcripcional para los sistemas de biosíntesis y/o transporte de sideróforos y de otras fuentes de hierro: represión, activación de sistemas de transporte y/o biosíntesis de sideróforos e inactivación de los reguladores positivos. Los mecanismos de regulación descritos hasta el presente, responden a la presencia de hierro intracelular o de fuentes extracelulares de hierro. En el presente trabajo se describe la respuesta fisiológica de una bacteria fijadora de nitrógeno (*Sinorhizobium meliloti* 242) y de cuatro mutantes defectivos en la adquisición de hierro, crecidas en medios suplementados con hierro o con un quelante de hierro, frente a la presencia de dos aminoácidos: glutamato y metionina. Sobre la base de: 1) medidas de crecimiento celular y 2) determinación de la producción de sideróforos; concluimos que la presencia conjunta de glutamato y metionina estimulan la producción de sideróforos y el crecimiento en medios limitados en hierro suplementados o no con diferentes fuentes utilizables de hierro. El mecanismo de estimulación ejercido por estos aminoácidos es actualmente desconocido.

Agradecimientos: IFS, PEDECIBA y CONICYT-Fondo CE.

287 - CARACTERIZACION MOLECULAR DE UNA MUTANTE DE *BACILLUS SUBTILIS* RESISTENTE A CERULENINA. (Molecular characterization of a *Bacillus subtilis* mutant resistant to cerulenin). Schujman, G.E., Altabe S., de Mendoza D. Area Microbiología, IBR-CONICET, Fac. Cs. Biquímicas y Farmacéuticas, UNR. e-mail: schujman@infovia.com.ar

La enzima condensante o 3-cetoacil-ACP sintasa (KAS) cataliza una reacción crucial en la síntesis de ácidos grasos: la condensación de un grupo acilo unido a la proteína transportadora de acilos (ACP) con malonil-ACP. La cerulenina, una toxina fúngica, inhibe en forma específica e irreversible a la enzima condensante por unión covalente al sitio activo de la misma. La inhibición de esta enzima por cerulenina y otros compuestos se está utilizando actualmente en ciertos tipos de cáncer y en tratamientos antimicrobianos.

Actualmente no se conocen enzimas condensantes resistentes a cerulenina en procariotas, por lo que se caracterizó una cepa de *Bacillus subtilis* capaz de crecer en presencia del antibiótico. Mediante estudios genéticos se determinó que la resistencia se debe a una mutación en el gen *fabF*. Se secuenció el gen de las cepas mutante y silvestre y se encontró una mutación que cambia la Isoleucina 108 de la enzima condensante silvestre por una fenilalanina en la enzima resistente. Se sobreexpresaron y purificaron las proteínas mutante y silvestre como fusiones a colas de Histidina y se determinó actividad condensante midiendo la incorporación de [2-¹⁴C]-malonil-ACP a miristoil-ACP, comprobándose que esta enzima es una 3-oxoacil-ACP-sintasa. Se determinó la CI_{50} de ambas enzimas para cerulenina, siendo 0,1 µg / ml para la enzima silvestre y 5 µg / ml para la resistente. El modelado de la estructura tridimensional de la enzima indica que la presencia de la fenilalanina en la posición 108 dificultaría el ingreso de la cerulenina al sitio activo de la enzima, siendo esta la primera enzima condensante resistente a cerulenina descrita en procariotes.

288 - MECANISMO DE RESISTENCIA A MECILINAM DE MUTANTES MUCOIDES *rscM* DE *Salmonella typhimurium*. (Mechanism of resistance to mecillinam of *rscM* mutants of *Salmonella typhimurium*). Costa, C.S. y Antón, D.N. Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, Avda. Gral Paz 1499, 1650 San Martín, Argentina. e-mail: costa@cnea.gov.ar.

La cápsula de muchas Enterobacterias está constituida por ácido colánico (AC), polímero sintetizado por un grupo de 19 genes denominados *cps*. La expresión de los genes *cps* está regulada por un sistema de dos componentes: RcsB (efector) y RcsC (sensor), y un regulador positivo RcsA cuyo nivel es limitado por la proteasa Lon. Asimismo, RcsB actúa estimulando a uno de los promotores del gen de división celular *ftsZ*. La mayor parte de los mutantes mucoides (hiperproductores de AC) aislados por resistencia al antibiótico mecillinam están afectados en un nuevo gen (*rscM*) ubicado en el centisoma 76. La síntesis de AC en los mutantes *rscM* es anulada por mutaciones *rscB*, muy disminuida por mutaciones *rscA*, y sinérgicamente aumentada por mutaciones *lon*. La resistencia a mecillinam no se debe a la presencia de AC porque los mutantes *cps*, que son incapaces de sintetizar el polímero, mantienen la resistencia al antibiótico. También los derivados *rscA*, *rscC* o *lon* de las cepas *rscM* son resistentes en tanto que los derivados afectados en el gen *rscB* recuperan la sensibilidad a mecillinam. La células de cepas portadoras de mutaciones *rscM* son más pequeñas que las del tipo silvestre y el tamaño se normaliza en los derivados *rscB*. Estos resultados sugieren que el producto del gen *rscM* es un regulador negativo que actúa por medio del efector RcsB. En los mutantes *rscM* estaría aumentada la activación de RcsB, estimulándose así la síntesis tanto de AC como de la proteína FtsZ. La resistencia a mecillinam de las cepas *rscM* podría deberse a la reducción en el tamaño celular causado por el aumento de proteína FtsZ.

289 - CAPACIDAD ANTAGONISTA DE *ZYMONOMAS MOBILIS* EN CULTIVO CONTINUO (Antagonistic capacity of *Zymomonas mobilis* in continuous culture). Romero, M. E.; Rodríguez, E. y Callieri, D. A. PROIMI - Biotecnología. Avda. Belgrano y Pje. Caseros. 4000. Tucumán. E-mail: meromero@proimi.edu.ar

Introducción: *Zymomonas mobilis* no sólo es un potencial productor de etanol, levano y otros productos sino que también fue utilizada desde muy antiguo para el tratamiento de heridas y algunas infecciones, principalmente del tracto urogenital. El objetivo de este trabajo es determinar si la capacidad antimicrobiana, observada en cultivos en lote, también ocurre en cultivo continuo.

Materiales y métodos: Una cepa de *Z. mobilis* floculenta, aislada de jugo de caña de azúcar fue cultivada a 37° C en proceso continuo en un fermentador cilíndrico, de relación altura - diámetro 1: 5, con 150 ml de medio. La actividad se midió en el extracto crudo frente a *Escherichia coli* AB1133, por el método de difusión en agar.

Resultados: La capacidad antimicrobiana de *Z. mobilis* se mantiene al pasar de cultivo en lote a continuo y está directamente relacionada con la velocidad de dilución y la concentración celular. Este hecho implica posibilidades interesantes tales como: 1-Abaratamiento del costo de tratamiento del medio de fermentación por cuanto se desarrolla una acción biocida.

2-Producción con altas productividades de posibles compuestos terapéuticos no tóxicos como así también de compuestos probióticos para balanceados y otros alimentos, por cuanto *Z. mobilis* está caracterizada como GRAS (Generally Regarded As Safe).

290 - CARACTERIZACION DE CEPAS DE *PAENIBACILLUS LARVAE* SUBSP. *LARVAE* AISLADAS DE MIEL MEDIANTE REP-PCR. (Characterization of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains isolated from honey by rep-PCR). Alippi, A.M.*; López, A.C.* y Aguilar, O. M.*. *CIDEFI, Fac. Cs. Agrarias y Forestales, UNLP, calle 60 y 118, c.c. 31, 1900 La Plata - *IBBM, Fac. Cs. Exactas, UNLP, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina. Este proyecto fue financiado por la ANPCyT (PICT 08-03857) y por la C.I.C.

La enfermedad más grave de la etapa larval de las abejas es la loque americana, causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, cuyas esporas permanecen viables en miel diseminando la enfermedad.

Con el objeto de investigar la incidencia de loque americana, se efectuó un monitoreo de la distribución de esporas de *P.l. larvae* en mieles provenientes de distintos partidos de la Prov. de Buenos Aires. Se procesaron 272 muestras, de las cuales, el 50% (n=136) contenían esporas viables de *P.l. larvae*.

Todos los aislamientos se caracterizaron mediante pruebas microbiológicas clásicas, por sensibilidad frente al bacteriófago PPL1c y por rep-PCR, comparando los *fingerprints* obtenidos con los de cepas de referencia de una colección mundial (n=132).

Los resultados indican una baja variabilidad entre las cepas. El 98% resultó susceptible al fago PPL1c y se obtuvieron 4 perfiles de *fingerprints* con primers BOX y REP, en una proporción de A=93%; B=1%; C=4% y D=2%. Este alto predominio del A está en correspondencia con lo observado en la colección mundial, donde se encontró un quinto perfil en cepas de Francia (E), mientras que el C sólo se halló en cepas argentinas.

291- METABOLISMO PROTEICO EN BACTERIAS: FUNCION DE CHAPERONES HSP70 Y HSP100. (Protein metabolism in bacteria: Function of Hsp70 and Hsp100 chaperones). Risso, C.; Checa, S., y Viale, A. IBR (CONICET) y Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR). Suipacha 531, Rosario, Argentina. E-mail: amviale@infovia.com.ar

Los chaperones moleculares son proteínas comunes a todos los organismos que participan en el metabolismo proteico, incluyendo su correcto plegamiento y/o degradación en la célula. Se caracterizan por unirse a polipéptidos total o parcialmente desplegados, evitando interacciones no productivas y la consecuente agregación. Aquí analizamos la función y cooperación de los distintos sistemas de chaperones de *Escherichia coli* en la protección y degradación de estructuras proteicas en condiciones de estrés celular.

Nuestros resultados indican que DnaK/Hsp70 y ClpB/Hsp100 están implicados en la resistencia de las células a temperaturas extremas (termotolerancia basal o intrínseca). Asimismo, al menos uno de estos sistemas es requerido para que las células desarrollen termotolerancia después de ser incubadas a temperaturas subletales (termotolerancia adquirida). A diferencia de los anteriores, el sistema GroE/Hsp60 no mostró incidencia en la termotolerancia basal. Con respecto a la degradación, el sistema DnaK es capaz de interactuar con la proteasa Lon, dirigiendo así la proteólisis de ciertos polipéptidos celulares.

El conjunto de resultados sugiere que los distintos sistemas de chaperones varían en su capacidad de reconocer polipéptidos incompletamente plegados. Así, los mismos participan en el metabolismo proteico cooperando de manera concertada en el plegado productivo de proteínas y dirigiendo aquellos incorrectamente plegados hacia su degradación.

292 - IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA FOSFOGLUCOMUTASA DE *BRUCELLA ABORTUS*: ROL DEL LIPOPOLISACARIDO EN LA VIRULENCIA Y LA MULTIPLICACION INTRACELULAR (Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene. Role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication). Ugalde, J.E.; Czibener, C.; Feldman, M.F. y Ugalde, R.A. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, IIB-INTECH, Universidad Nacional de Gral. San Martín, CONICET, Av Gral. Paz y Albarellos, INTI, Ed. 24, Buenos Aires y Centro de Virología animal, Capital Federal; Argentina. Jugalde@inti.gov.ar

El lipopolisacárido (LPS) denominado liso de *Brucella abortus* es considerado un importante factor de virulencia a pesar de que su preciso rol en el proceso de patogénesis no está aún claro. Mientras que las propiedades protectivas contra la lisis mediada por complemento han sido bien aceptadas, aún existen controversias acerca de la capacidad de replicación intracelular de las mutantes rugosas (carentes del antígeno-o). El gen que codifica para la enzima fosfoglucomutasa (*pgm*) de *B. abortus* fue clonado, secuenciado e interrumpido. Este gen posee un alto índice de identidad con el homólogo de *Agrobacterium tumefaciens* pero no es parte del operón glucógeno como lo es en *Agrobacterium*. Una mutante de *B. abortus* nula para la *pgm* carece del antígeno-o del LPS aunque posee un core con un patrón electroforético igual al del core de la cepa salvaje, sugiriendo que glucosa, galactosa o un derivado de ellas pueden ser parte de la unión entre el core y el antígeno-o. Esta mutante es incapaz de sobrevivir en ratones pero replica en células HeLa, indicando que el LPS completo no es esencial para la invasión ni para la multiplicación intracelular. Este comportamiento sugiere que el LPS puede desempeñar un papel importante en la supervivencia extracelular en el animal, protegiéndolo contra la lisis mediada por complemento, pero no desempeñaría rol alguno en la supervivencia intracelular.

293 - ACIDOS ARILOXOALCANOICOS INHIBEN LA ADHERENCIA DE *Escherichia coli* UROPATOGENA P-FIMBRIADA. (Aryloxoalcanoic acids inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*) Balagué, C., Silva de Ruiz, C., Rey, R., Evangelista de Duffard, A. M., Nader-Macias, M. E. LATOEX, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR; CERELA, Inst. de Microbiol., UNT; Argentina. E-mail: cbalague@fbioyf.unr.edu.ar.

La uropatogenicidad de *E. coli* está determinada por las adhesinas o fimbrias P, la exotoxina α -hemolisina y la hidrofobicidad superficial. Varios compuestos aromáticos provocan inhibición *in vitro* de la adherencia bacteriana. Ensayamos tres ácidos ariloxoalcanoicos (AOAs): 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), clofibrato (CL) y etacrínico (ET); de amplio uso herbicida y de aplicación farmacológica como hipolipidémico y diurético respectivamente. Estos compuestos disminuyeron la población celular P-fimbriada observada por microscopía electrónica. Asimismo, a concentraciones 0,1 mM o 1 mM de AOAs, el título de hemoaglutinación descendió 2 o 4 diluciones y la cantidad de proteínas totales de superficie bajó en promedio 45% o 76% respectivamente. Por el contrario, no fueron alteradas la actividad hemolisina e hidrofobicidad superficial. Los ensayos *in vivo* se realizaron con el protocolo preventivo de infección urinaria ascendente en ratones BALB/c. La infección bacteriana en riñón disminuyó por la exposición diaria a AOAs. Los valores promedio de UFC fueron entre el 92% y el 85% más bajos en los animales tratados con CL o ET a dosis terapéuticas (29 mg/kg y 2,9 mg/kg respectivamente), o 2,4-D a 2,6 o 25 mg/kg. A la dosis de 70 mg/kg de 2,4-D, se detectó una recaída luego de 5 días de exposición. Estos resultados demuestran que CL y ET podrían ensayarse en la profilaxis antiadhesiva y que la exposición accidental en bajas dosis al 2,4-D interferiría con la infección antes que se establezca. Por el contrario, altas dosis de exposición al herbicida provocan una infección recurrente.

294 - EL SISTEMA DE TRANSPORTE TIPO IV (VIRB) ES ESENCIAL PARA LA MADURACION DE LA VACUOLA QUE CONTIENE A *BRUCELLA ABORTUS*. (Essential role of the VirB machinery in the maturation of *Brucella abortus*-containing vacuole). Comerci DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP y Ugalde RA. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, IIB-INTECH, Universidad Nacional de Gral. San Martín, CONICET, Av Gral. Paz y Albarelos, INTI, Ed. 24, Buenos Aires, Argentina. dcomerci@iib.unsam.edu.ar

En células epiteliales, el patógeno intracelular *B. abortus* evade la vía endocítica, explota la maquinaria autofágica de la célula huésped y establece su nicho de replicación intracelular en el retículo endoplásmico. Se desconoce aún el mecanismo molecular que permite a la bacteria llevar a cabo este proceso. Recientemente, nuestro laboratorio describió el operón VirB de *B. abortus* que codifica un sistema de secreción tipo IV. En este estudio, analizamos el tráfico intracelular en células HeLa de mutantes polares y no-polares de *Brucella* en el gen *virB10*, por doble inmunofluorescencia y microscopía confocal con láser de barrido. Demostramos que el operón virB es esencial para la biogénesis de la vacuola que contiene a *Brucella*. Mutaciones polares que anulan la transcripción de *virB10* y *virB11* afectan el proceso por el cual la bacteria evade el camino endocítico, haciéndola incapaz de evitar la fusión con el lisosoma, donde finalmente es degradada. En cambio, mutantes no-polares en *virB10* lograron evadir la vía endocítica y la subsecuente degradación en el lisosoma pero fueron incompetentes para alcanzar el retículo endoplásmico y establecer el nicho replicativo. Sorprendentemente, esta mutante escapa de la célula huésped por un mecanismo similar a la exocitosis, permaneciendo unida a la membrana plasmática, donde prolifera. Basados en los dos fenotipos particulares descriptos, se propone un modelo de maduración de la vacuola que contiene a *Brucella*.

295 MODELIZACION MATEMATICA Y SIMULACION DE LA ULTRASENSIBILIDAD EN LA SINTESIS DEL GLUCOGENO EN CIANOBACTERIAS (Mathematical modelling and simulation of the ultrasensitive glycogen synthesis in cyanobacteria). Cortassa, S., Aon, M. A., Gomez Casati, D. e Iglesias, A. A. Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH/CONICET) C.C. 164, 7130 - Chascomús, Buenos Aires, ARGENTINA. E-mail: cortassa@intech.gov.ar

La síntesis de glucógeno en cianobacterias (*Anabaena* sp. PCC 7120) fue modelizada en base a resultados experimentales obtenidos en sistemas molecularmente superpoblados *in vitro*, y en células permeabilizadas. El modelo consta de dos ecuaciones diferenciales ordinarias que representan la evolución temporal de ADP-glucosa y glucógeno. Los parámetros del modelo fueron ajustados a valores determinados en cada sistema experimental. Previamente, habíamos descrito el comportamiento ultrasensible de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) *in vitro* (Gomez Casati et al. 1999. FEBS Lett. 446, 117-121; Gomez Casati et al. 2000. Biochem. J. 350, 139-147). La ultrasensibilidad de la AGPasa corresponde a una gran amplificación de la actividad enzimática en función de pequeños incrementos de su activador alostérico 3-fosfoglicerato (3PGA). El modelo fue capaz de reproducir el comportamiento ultrasensible de la AGPasa *in vitro* y en células permeabilizadas ("in situ") al variar 3PGA y fosfato inorgánico (Pi, inhibidor alostérico de la enzima). El comportamiento cinético *in situ* se aproximó más a la condición de superpoblamiento molecular que al sistema acuoso. Se observó una relación óptima 3PGA/Pi para la cual se obtuvo el máximo factor de amplificación y que es diferente en los sistemas *in vitro* e *in situ*. Los resultados obtenidos se discutirán en términos del rol de la ultrasensibilidad durante la transición luz-oscuridad.

296 - ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR DE UN OPERON DE *M. TUBERCULOSIS* PROBABLEMENTE ASOCIADO A LA VIRULENCIA. (Molecular Biology studies in a *M. tuberculosis* operon probably associated to virulence). Santangelo M. P., Alito A., Caimi K., Zumárraga M., Gioffré, A., Cataldi, A. y Bigi, F. Instituto de Biotecnología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, INTA Castelar -Argentina.

El genoma de *M. tuberculosis* contiene cuatro operones (mce) homólogos, que codifican para proteínas exportadas, entre ellas una proteína de tipo invasina. En este trabajo estudiamos el operón *mce3* que es el único exclusivo de *M. tuberculosis* ya que está ausente en *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*.

Rio arriba del operón *mce3* se encuentra un gen con características propias de los genes reguladores. Para estudiar el efecto de este gen sobre la expresión de *mce3*, se construyeron fusiones entre la región promotora de la primera ORF de *mce3* con B-gal, con la inclusión o no del gen regulador. De acuerdo a estos experimentos el gen regulador parece ser un represor. La región promotora también fue mapeada por deleciones y mediante *primer extension*. Para comprobar la expresión de este gen y estudiar la localización subcelular de las proteínas codificadas por el operon se usaron anticuerpos contra la primera ORF cuyo producto se obtuvo en *E. coli* mediante fusión a polihistidinas. Por Western blot se determinó que la proteína se encuentra en membrana. Por último, se obtuvieron mutantes por knock out del primer y del tercer gen del operón.

297 - LA PROTEINA P55 DE *M. TUBERCULOSIS* ES UNA BOMBA DE EFLUJO DE ANTIBIOTICOS. (P55 from *M. tuberculosis* is an antibiotic efflux pump). Almeida da Silva¹ P., Bigi² F., Santángelo² M. P., Ainsa¹ J., Martín¹ C., y Cataldi² A.-1: Universidad de Zaragoza, España. 2: Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar, Argentina.

La resistencia a antibióticos es uno de los principales problemas en el control de la tuberculosis. Dentro de este campo, la resistencia debido a barreras de permeabilidad es aun pobremente entendida en micobacterias.

En un trabajo previo se identificó y caracterizó a P27, una lipoproteína antigénica de membrana de *M. tuberculosis*. En este trabajo mostramos por Northern blot y RT-PCR, que P27 y un transportador de antibióticos, P55, forman un operón. La región promotora fue identificada y caracterizada por delecciones sucesivas.

El gen de P55 fue clonado, solo y con P27, en *M. smegmatis* y se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM). P55 incrementó 8 veces el CIM para tetraciclina y estreptomycin y 4 cuatro veces para gentamicina. Cuando el influjo fue medido usando antibióticos marcados, una caída fue observada en presencia de P55 comparada con el control. El protonóforo CCCP abolió este efecto.

El análisis de la secuencia sugiere que P55 tiene 14 regiones de transmembrana. Usando anticuerpos específicos se demostró que P55 es una proteína integral de membrana.

En conclusión, los resultados indican que P55 es una bomba de eflujo que podría conferir resistencia a varios antibióticos.

298 - IDENTIFICACION DE GENES DE VIRULENCIA DE *M. tuberculosis* MEDIANTE UNA GENOTECA DIFERENCIAL. (*M. tuberculosis* virulence genes identification using a subtractive library) Cami K¹, Santangelo, MP¹, Zumárraga, M¹, Gioffré, A¹, Bigi, F¹, Alito A.² Romano M.I¹, Cataldi A¹. 1-Inst. de Biotecnología. 2-Inst. de Patobiología - INTA Castelar

La tuberculosis es una enfermedad de alta prevalencia en todo el mundo. En Argentina, desde comienzos de esta década, se notifican alrededor de 13000 casos anuales con una morbilidad cercana a 40/100000 habitantes.

Es necesario conocer los factores involucrados en la virulencia de *M. tuberculosis* (*M.t.*). La identificación de los mismos sufre un importante atraso debido a que se carece de un fenotipo asociado a la virulencia como toxinas o factores de adherencia.

La propuesta de este trabajo fue construir una genoteca diferencial entre *M.t.* (cepa virulenta) y *M. microti* (*M.m.*) (cepa no virulenta). *M.m.* es una especie integrante del complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo *M.m.* no es virulenta para el humano, el ratón, ni el bovino. De esta manera estimamos que con una genoteca diferencial *Mt-Mm* es posible identificar genes que determinen virulencia de *M.t.*

La genoteca diferencial se realizó de acuerdo al protocolo de Straus y Ausubel. Se realizaron 4 rondas de hibridación y captura, habiéndose clonado y secuenciado los productos. Paralelamente se determinó por Southern Blot el carácter específico cada fragmento diferencial.

Se obtuvieron cuatro productos diferenciales. Los resultados de las secuencias de tres de ellos mostraron que corresponden a una poliketido sintetasa (PKS), a una porina, denominada OmpA y a una proteína de tipo PE-PPE que constituye una familia proteica particular en *M.t.* que podrían estar asociadas a variabilidad antigénica. Es importante destacar que los genes hallados corresponden a proteínas de membrana, las cuales estén probablemente más asociadas a virulencia; mientras que no se detectaron secuencias repetitivas ni genes metabólicos.

299 - FOSFOGLUCOMUTASA DE *RHIZOBIUM LOTI*: REGULACION DE SU EXPRESION Y EFECTO SOBRE LA NODULACION DE *LOTUS TENUIS*. (*R. loti* phosphoglucumutase: expression and role in nodulation). D'Antuono, A.; Lepek, V y Ugalde, R. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, IIB-UNSAM-INTECH. CONICET. Av. Gral Paz entre Albarcellos y Constituyentes, INTI, Edif. 24 (1650). vlepek@inti.gov.ar

La actividad de la enzima fosfoglucomutasa se requiere para la síntesis de distintos polisacáridos. Algunos de estos han sido involucrados en el proceso de nodulación en distintos sistemas *Rhizobium*-leguminosas. En *Rhizobium loti* el gen que codifica para la fosfoglucomutasa (pgm) se encuentra ubicado dentro del cluster de genes que codifican para las enzimas del metabolismo del glucógeno. Investigando la capacidad promotora de distintas regiones de este cluster se localizaron dos zonas con dicha actividad. Debido a que la fosfoglucomutasa se requiere para la síntesis de otros polisacáridos además del glucógeno, se especula que la presencia de una segunda actividad promotora aseguraría la expresión de esta enzima en ausencia de expresión de los genes del metabolismo del glucógeno. Se estudió la variación de actividad de ambos promotores en función de la curva de crecimiento. *R. loti* forma en las leguminosas *Lotus tenuis*, *Lotus corniculatus* y *Lotus pedunculatus*, nódulos determinados y sobre *Leucaena leucocephala* nódulos indeterminados. Se ha descrito que mutantes de *R. loti* en la síntesis del exopolisacárido no se ven afectados en la nodulación sobre los primeros. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que mutantes de *R. loti* en la síntesis de glucógeno nodulan normalmente. En este trabajo informamos que mutantes de *R. loti* en *pgm* fueron incapaces de formar nódulos sobre *Lotus tenuis*. Este resultado indicaría que para la formación de nódulos determinados alguno de los otros dos polisacáridos dependientes de la actividad de la fosfoglucomutasa: glucano cíclico ó LPS ó tal vez ambos, serían necesarios

300-FENOTIPOPLEIOTROPICO RESULTANTE DE UNA MUTACION EN EL GEN DE BACTERIOFERRITINA DE *BRUCELLA ABORTUS*. (Pleiotropic phenotype of a mutation in the *Brucella abortus* bacterioferritin gene). Martínez, M., Almirón, M., Ugalde, R. Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, UNSAM. INTI-ed. 24, Av. Gral Paz s/n, (1650) San Martín. Pcia. de Bs As. E-mail: mmtruco@inti.gov.ar.

El hierro es uno de los principales nutrientes requeridos por las bacterias, actuando en distintos procesos celulares. Para superar su baja biodisponibilidad y efectos tóxicos, las bacterias han desarrollado varios mecanismos que lo mantienen en complejos: producción de sideróforos considerados factores de virulencia, y proteínas de almacenamiento como bacterioferritinas cuya función no esta totalmente dilucidada.

A partir de una genoteca de *Brucella abortus*, se identificó un clon con homología al gen *bfr* de *Brucella melitensis*. El gen fue clonado, secuenciado y la composición de aminoácidos deducida permitió alinearlo como miembro de la familia de las bacterioferritinas. Se obtuvo un mutante "knock-out" en el gen por delección e inserción de un cassette de gentamicina. El mutante obtenido presenta un fenotipo pleiotrópico, caracterizado por un patrón de expresión diferencial para proteínas de membrana, un incremento en el sideróforo excretado y dificultad para el crecimiento en condiciones limitantes para el hierro. En experimentos de infección a células HeLa, su comportamiento fue semejante al de la cepa salvaje.

Estos resultados nos permiten: 1) Demostrar el rol de la bacterioferritina como proteína de stock de hierro, hecho que se deducía de su estructura pero no había sido confirmado. 2) Proponer su participación, en la regulación de genes con respuesta al hierro, frecuentemente asociados a patogenicidad.

301 - ESTUDIOS SOBRE UROPORFIRINOGENO DECARBOXILASA DE *CHLORELLA KESSLERI*. (Studies on uroporphyrinogen decarboxylase of *Chlorella kessleri*). Juárez, A., Corvi, M., Aldonatti, C. y Ríos de Molina, M. Dpto. Cs. Biológicas y Dto. Química Biológica, FCE y N, UBA.

Se estudió la actividad uroporfirínógeno decarboxilasa (Uro-D) de extractos obtenidos desde cultivos axénicos de *Chlorella kessleri*.

La mayor actividad se obtuvo en la fase exponencial del crecimiento. Ensayos de precipitación fraccionada, indicaron que la mayor parte de la enzima precipita, libre de clorofila, a 40-70% de saturación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (purificación 2 veces, rendimiento 20%). Actualmente se está ajustando el rango para lograr mayor recuperación. La actividad en función del tiempo de incubación aumentó en forma lineal desde 0 a 20 minutos, decayendo levemente a los 30 minutos. La curva de actividad en función del pH mostró un máximo entre pH 6 y 6,5. En cuanto a la actividad en función de la cantidad de proteínas, al igual que lo informado para otros sistemas biológicos, llega a un máximo y luego decae ligeramente (actividad máxima a 0,23 mg/ml, bajo las condiciones ensayadas). Al fijar proteínas en este valor y realizar la curva de saturación, encontramos que aproximadamente a 5 μM de uroporfirínógeno se alcanza una meseta, siendo la relación sustrato/proteínas aproximadamente 20 nmoles/mg.

A pesar de la importancia de esta enzima en el camino metabólico de la clorofila y en la respuesta a xenobióticos como los hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAPs), este es el primer estudio de caracterización de la actividad Uro-D en *Chlorella*.

302 - ENZIMOINMUNOENSAYO PARA EVALUAR LA EXPRESION DE PILI EN *MORAXELLA BOVIS*. (Enzyme linked immunosorbent assay to determine *Moraxella bovis* pili expression). Donolo, A.¹; Prieto, C.¹; Viegas, M.¹; Chirido, F.²; Rodríguez, M.¹; Yantorno, O.¹ CINDEFI (UNLP, CONICET) ² CIDCA (UNLP, CONICET). Calle 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.

Los pilis son uno de los principales factores de virulencia y antígenos protectores de *Moraxella bovis*, agente etiológico de Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. A pesar de que la presencia de los mismos es esencial para asegurar el nivel de protección de las vacunas, no se dispone aún de metodologías que permitan la cuantificación de piliación en células.

Este estudio describe una metodología para la evaluación tanto de pili soluble como de pili asociado a células. Se usó en ambos casos, un diseño de ELISA competitivo secuencial Empleando pili purificado en inmunizaciones sucesivas de conejos, se obtuvo un suero que reconoce selectivamente la subunidad pilina por inmunoblotting. En ELISA el antígeno empleado fue en un caso la proteína purificada y en el otro células enteras densamente piliadas de *M. bovis* (controladas por microscopía electrónica) fijadas con formaldehído (bactELISA).

Los niveles de piliación de las muestras (suspensiones bacterianas y sobrenadantes de cultivo) se compararon con las curvas patrones respectivas, usándose un cultivo de células de referencia en el bactELISA y la proteína purificada en el otro caso.

Estos ensayos que demuestran alta sensibilidad y reproducibilidad permitieron el análisis de la expresión y estabilidad de pilis de *M. bovis* durante procesos de producción de vacunas a escala de laboratorio. El límite de detección del ELISA de pili purificado ($p < 0.01$) fue de 0.32 $\mu\text{g/ml}$. El coeficiente de variación de ambos ensayos se mantuvo inferior al 10%.

303 - MOVILIZACION DEL PLASMIDO CRIPTICO DE *S.meliloti* pSmeLPU88b (Tra⁺Mob⁺) A TRAVES DE AISLAMIENTOS GENETICAMENTE DIFERENTES. (Mobilization of the *S.meliloti* cryptic plasmid pSmeLPU88b by different homologous isolates). Pistorio, M., Balagué, L.J. y Lagares, A. IBBM-Fac.Cs.Exactas.UNLP.47 y 115 (1900) La Plata-Argentina. e-mail: lagares@biol.unlp.edu.ar

La diseminación de información genética desde bacterias introducidas en forma masiva al suelo debe controlarse para preservar la estructura genética de las poblaciones nativas. Diferentes mecanismos en los que están involucrados la transferencia de plásmidos pueden conducir a la generación de nuevos genotipos bacterianos cuya dinámica poblacional y propiedades a mediano y largo plazo son difíciles de predecir. Con el proposito de caracterizar la transferencia de plásmidos por conjugación desde la bacteria fijadora de N_2 , *S.meliloti*, hemos utilizado una estrategia que ha permitido el aislamiento de plásmidos crípticos movilizables. Pudimos identificar un sistema binario de conjugación constituido por un plásmido de 22 kb -pSmeLPU88b- movilizable por conjugación, y un plásmido *helper* acompañante no movilizable (frecuencia menor $10^{\text{exp}-9}$) -pSmeLPU88a-, de 139 kb. Hemos encontrado que otros aislamientos del mismo suelo carentes del plásmido pSmeLPU88b eran capaces de conducir su movilización, indicando que funciones *helper* compatibles con el sistema del plásmido pSmeLPU88b estaban presentes en dichos aislamientos. Finalmente, funciones *helper* compatibles fueron también encontradas en aislamientos genéticamente diferentes de distinto origen geográfico, sugiriendo una amplia distribución de las funciones *helper* requeridas por el plásmido pSmeLPU88b. Con el propósito de caracterizar el sistema binario a nivel molecular ya hemos obtenido mutantes del plásmido pSmeLPU88a que han perdido la capacidad de movilización.

304 - CARACTERIZACION FENOTIPICA Y MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE RIZOBIOS NODULADORES DE ALFALFA PRESENTES EN DIFERENTES HORIZONTES DE UN SUELO ACIDO EN CONDICIONES DE CAMPO (Phenotypic and molecular characterization of alfalfa-nodulating rhizobia that are present at different depths in an acid soil). Balagué, L.J. (1), Del Papa, M. F. (1), Pistorio, M., Perticari, A. (2), y Lagares, A. (1). (1) IBBM-Fac. Cs. Exactas, UNLP, 47 y 115, 1900-La Plata; (2) IMYZA-INTA Castellar. Financiado por AMPyT-PICT 01-00032-00627.

La simbiosis fijadora de nitrógeno que se establece entre leguminosas y rizobios está influenciada por las características fisicoquímicas del entorno radicalar. La acidez moderada de muchos suelos locales cultivados con alfalfa es un factor limitante de la simbiosis y la producción de los cultivos. Estudios de nuestro laboratorio detectaron la presencia de un grupo de aislamientos noduladores de alfalfa ácido tolerantes, muy persistentes a bajo pH, e ineficientes para la fijación de N (1). El análisis fenotípico y genético-molecular de esos aislamientos evidenció su muy estrecha relación con la cepa descrita previamente *R. spp.* Or191. En este trabajo presentamos un ensayo a campo en condiciones de acidez, destinado a evaluar la población naturalizada de rizobios y el comportamiento en el tiempo de distintas cepas inoculadas. Los resultados muestran que la proporción de aislamientos tipo-Or191 dentro de los nódulos aumenta en profundidad pudiendo alcanzar hasta 90% a 50 cm de la superficie. Tal predominancia en profundidad contrasta con la más baja proporción de estos rizobios en los nódulos del horizonte superficial del suelo (20-45%). Cuando se inocularon cepas de *Sme*, la proporción de los rizobios tipo-Or191 aumentó progresivamente durante el primer año y medio del ensayo (5% a 40%). Los resultados muestran a los aislamientos tipo Or191 como un factor biótico de riesgo potencial para el cultivo de alfalfa y la introducción de cepas seleccionadas de *Sme*. Contamos actualmente con un ensayo de PCR para evaluar sin ensayos de plantas la presencia y evolución de este tipo de rizobios respecto de *Sme*, el simbionte natural de alfalfa fijador de nitrógeno.

Del Papa Del Papa et al., Appl. Environ. Microbiol. 65:1420-1427 (1999).

305 - PRESENCIA DE UBIQUITINA EN LA ARQUEO-BACTERIA HALOALCALOFILA *Natronococcus occultus* (Ubiquitin in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*). **Nercessian D.**, De Castro R., Conde RD. Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEN, Univ.Nac. de Mar del Plata. CC 1245-7600 MdP, Argentina. dnercess@mdp.edu.ar. Patrocinio: UNMDP y CONICET.

Previamente, comprobamos que la vida media promedio de las proteínas de *N. occultus* es muy corta en relación con la de eubacterias y células eucariotas. Además, observamos que esas vidas medias se corresponden con composiciones aminoácídicas características de proteínas de alto recambio. Asimismo, hay evidencias de que este microorganismo utilizaría un sistema neutro para degradar a sus proteínas. A partir de estos antecedentes, se examinó si *N. occultus* posee la vía degradativa mediada por ubiquitina. Se tomaron muestras de proteínas del microorganismo en diferentes etapas de crecimiento. Estas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y "western blot" con anticuerpos contra ubiquitina y/o conjugados ubiquitina-proteína. Los análisis revelaron bandas inmunoreactivas en el rango de Mr 60.000-80.000. La concentración relativa de estos complejos fue más alta en el inicio del crecimiento y disminuyó a medida que el cultivo entró en la etapa estacionaria. Dado que la vía de ubiquitina se encarga de eliminar a las proteínas anormales, se indujo en las células la formación de puromicilil-péptidos. Los "western blot" correspondientes al inicio del cultivo exhibieron bandas inmunoreactivas de mayor intensidad y en mayor número que los controles de células no tratadas con puromicina. Estos resultados sugieren que un proceso de ubiquitinación equivalente al exhibido por eucariotas podría participar en el recambio de las proteínas de este microorganismo.

306 - UNA NUEVA TECNICA EN GELES DESNATURALIZANTES (DTGGE) PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES RHIZOBIANAS. (DTGGE a new approach for the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia population.) **López, M. V.** and Aguilar, O. M. Instituto de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Calles 47 y 115. 1900. La Plata. Argentina. Este proyecto fue financiado por IFS y Comunidad Europea INCO-Dev.

Las técnicas electroforéticas en geles con gradientes de temperatura o agentes desnaturantes (TGGE y DGGE, respectivamente) son utilizadas en estudios de ecología microbiana para analizar la diversidad poblacional en sus hábitat naturales. En general, el procedimiento es utilizado para revelar diferencias en las secuencias del gen 16S ARNr. El objetivo de este trabajo fue identificar una región variable en el gen 16S ARNr de las especies de rizobios que permita diferenciarlas entre sí por sus propiedades migracionales. A partir de una región de 260 pb que presentó la mayor variabilidad se diseñó un par de *primers* para amplificar por PCR el ADN molde de rizobio. Los fragmentos resultantes fueron analizados en geles desnaturantes, encontrando que combinando en una misma corrida electroforética un gradiente de temperatura y un gradiente desnaturante (urea y formamida) resulta en la resolución óptima de las secuencias de ADN. Esta nueva técnica la denominamos DTGGE.

Los fragmentos de PCR obtenidos de las especies *R. etli*, *R. leguminosarum*, *S. teranga*, *R. tropici* B, *R. galegae*, *B. japonicum* y *B. elkanii*, fueron resueltos en bandas con perfiles de migración distintivos. Además, se mostrarán las potencialidades de esta técnica para revelar heterogeneidad en miembros de una población de rizobios que nodulan la leguminosa arbórea leucaena.

307 - CLONADO Y ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL GEN *GUAB* DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899 (Cloning and expression of *Rhizobium tropici* CIAT899 *guaB* gene). **Collavino, M. M.** y Aguilar, O. M. Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Exactas, UNLP. Calles 47 y 115, 1900, La Plata, Argentina. Este proyecto fue financiado por el programa Fomec Univ.Nac.Nordeste y ANPCyT PICT No.628/97.

En este trabajo, se estudia el mutante *R.tropici* CIAT 899-10.T (*guaB*⁻), afectado en su tolerancia térmica y capacidad de nodular eficientemente *P. vulgaris*. La mutación mapea en el gen *guaB* (enzima inosina monofosfato deshidrogenasa IMPd) de la vía de síntesis *de novo* de las purinas. Previamente demostramos que *R. tropici* usa xantina oxidasa como una vía alternativa. El mutante no es auxótrofo para guanina. Con el objeto de examinar la organización y regulación del gen *guaB* se clonó la región respectiva como un fragmento EcoRI de 8.0 Kb, a partir de una minibiblioteca y se usó para complementar fenotípicamente al mutante. Además, se clonó un fragmento PCR que comprende el ORF de *guaB* en el vector psuP204 resultando en una expresión iniciada en el promotor de cloramfenicol del vector. Ambos plásmidos fueron transferidos a las cepas salvaje CIAT 899 y mutante CIAT 899-10.T. Se observó que los plásmidos con el gen *guaB* restauran la tolerancia a altas temperaturas. Asimismo la cepa mutante que contiene los plásmidos no resulta inhibida con allopurinol, lo que demuestra el uso de la vía que comprende la IMPd. Por otra parte, los resultados negativos de ensayos de complementación de mutantes *guaA* de *E.coli* y de experimentos de amplificación con primers específicos para el gen *guaA*, usando el fragmento de 8.0 Kb EcoRI (*guaB*) indicarían que a diferencia de *E.coli*, los genes *gua* no estarían agrupados en *R.tropici*. Ensayos de expresión del gen *guaB* fusionado al reportero lacZ indicarían que el gen está activado en el mutante defectivo en IMPd probablemente por acumulación de sustrato, y es reprimido por el producto final guanina.

308 - UNA MUTACION EN EL GEN *PGK* DE *R.TROPICI* CIAT899 AFECTA EL CRECIMIENTO A ALTAS TEMPERATURAS Y LA UTILIZACION DEL GLICEROL (Mutation in *R.tropici* CIAT899 *pgK* gene affects growth at high temperature and utilization of glycerol). **Riccillo, P.M.^{1,3}**, Riva O. L.¹, y Aguilar, O.M.^{1,2} Instituto de Bioquímica y Biología Molecular¹, (Fac.Cs.Exactas-U.N.L.P.-CIC), 115 e/49 y 50, La Plata (1900).CONICET². CIC.PBA.³. Financiado por ANPC y T, Pict 628/97.

En su ambiente natural los rizobios frecuentemente enfrentan condiciones adversas y para sobrevivirlas realizan una variedad de cambios fisiológicos y adaptaciones metabólicas. A partir de una colección de mutantes Tn5-*luxAB* de *R. tropici* CIAT899 defectivos en la tolerancia intrínseca a temperatura y acidez, se aisló la cepa mutante CIAT899-3T1, sensible a alta temperatura (38°C). Esta cepa no presentó alteraciones en las respuestas a estrés osmótico, a acidez y hambre de C y N. La secuenciación de la regiones de ADN rizobiano adyacentes a la única inserción del transposón Tn5-*lux* permitió identificar un ORF con un alto grado de homología con el gen *pgK*, codificante de la enzima fosfoglicerato kinasa (PGK). Se confirmó la asociación entre la inserción y el fenotipo mediante el intercambio del fragmento EcoRI del mutante con su homólogo en el genoma de la cepa salvaje. Se demostró que, al igual que mutantes PGK⁻ de *E. coli*, es incapaz de crecer con succinato como única fuente de carbono. Además presenta un retraso en el crecimiento a alta temperatura en medio mínimo con otras fuentes de carbono tales como glucosa, xilosa, glicerol y gluconato. El mutante crecido previamente en medio mínimo con glicerol como única fuente de C, recupera la tolerancia a alta temperatura, indicando la inducción por glicerol de funciones requeridas para esa respuesta. Se ha descrito que la vía de las pentosas fosfato con la participación de la de Entner-Doudoroff, es la ruta catabólica principal de azúcares en *R. tropici*. Nuestros datos demuestran la necesidad del gen *pgK*, ubicado en el bloque inferior (anfibólica) de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para la rápida metabolización de distintos azúcares, tolerar altas temperaturas, y una óptima fijación de nitrógeno en plantas de porotos.

309 - CLONADO DEL GEN *gshB* (CODIFICANTE DE LA GLUTATION SINTETASA) DE *RHIZOBIUM TROPICI* CIAT899. Cloning of the *Rhizobium tropici* CIAT899 *gshB* gene (encoding for the glutathione synthetase). Muglia, C. y Aguilar, M., Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Exactas, UNLP. Calles 47 y 115, (1900) La Plata, Argentina. Financiado por ANPCyT, PICT 628/97.

Hemos demostrado en estudios anteriores que el glutatión en *R. tropici* es importante en la tolerancia a acidez y estrés osmótico, y al agente electrofílico metilglioxal. La mutación del gen de la glutatión sintetasa (*gshB*) determinan un fenotipo de sensibilidad a esos agentes ambientales y químicos, afectando probablemente los canales de flujo de potasio. En el presente trabajo se clonó la región salvaje del gen *gshB* de *Rhizobium tropici* CIAT899 a partir de una minibiblioteca de fragmentos EcoRI. Mediante análisis de restricción y comparación con los datos de secuencia conocida se confirmó que el fragmento clonado contenía a la secuencia salvaje de este gen. El fragmento se subclonó en un plásmido replicativo en *Rhizobium* generándose el plásmido pCMA. Este plásmido se utilizó para transformar las cepas CIAT899 y el mutante *gshB* cepa CIAT899-13T2. El mutante conteniendo el plásmido pCMA recuperó la capacidad salvaje para tolerar la acidez y al compuesto metilglioxal. Se determinaron los niveles de glutatión encontrándose que la cepa mutante CIAT899-13T2 presenta niveles de glutatión entre 20 y 100 veces inferiores a los de la cepa salvaje. La cepa CIAT899-13T2 con el plásmido pCMA presentó niveles similares a los de la cepa salvaje. Asimismo los niveles de glutatión en condiciones de acidez se incrementan unas diez veces respecto las condiciones de pH neutro, indicando que habría una regulación en respuesta a la acidez del medio. Teniendo en cuenta la importancia del glutatión endógeno en la respuesta a estreses ambientales, se ensayó el efecto de la introducción de plásmidos multicopias expresando el gen *gshB* de *R. tropici* sobre la tolerancia de cepas de *R. meliloti* y *R. etli*, intrínsecamente sensibles a la acidez.

310 - CLONADO Y EXPRESION DE LA FERREDOXINA NADP⁺ REDUCTASA DE *R. CAPSULATUS* (cloning and expression of ferredoxin NADP⁺ reductase from *R. capsulatus*). Bittel, C.; Carrillo, N.; Cortez, N. IBR. Fac. Cs. Bioq. y Farm.-UNR. Suiipacha 531, 2000 Rosario.

La ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FPR) es un componente de la respuesta biológica al estrés oxidativo. Cepas *fpr* de *E. coli* son extremadamente sensibles al estrés oxidativo y su complementación con un gen que codifica para la reductasa de arveja restablece la tolerancia al estrés a los niveles de la cepa salvaje.

En fracciones solubles de *R. capsulatus* se observaron tres bandas mayoritarias con actividad diaforasa (reducción de colorantes artificiales por NADPH), una de las cuales aumentó ante el agregado de metilviológeno. La secuenciación del N-terminal mostró alta homología con la FPR de *A. vinelandii* (AvFPR). Basándonos en secuencias disponibles en bancos de datos, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron obtener un clon codificante para esta diaforasa (RcFPR) por PCR.

La comparación de la secuencia nucleotídica del clon RcFPR muestra algunas diferencias con la secuencia proveniente del proyecto genoma, si bien todos los cambios preservan la identidad de los aminoácidos codificados.

Finalmente, se clonó la región codificante como fusión C-terminal del péptido tiorredoxina-Trx.Tag del vector PET-32a que permite la purificación en columnas de afinidad de Ni a partir de células de *E. coli* (DE3). La proteína de fusión obtenida representa aproximadamente el 50% del total. Una fracción de ésta (aproximadamente 20%) se encuentra en forma soluble, unida al grupo prostético FAD y muestra actividad diaforasa.

VIRUS

311 - EL DOMINIO CITOPLASMATICO DE LA GLICOPROTEINA DE ENVOLTURA DE SIV MODULA LAS FUNCIONES BIOLOGICAS DE ESTA PROTEINA (The SIV Env cytoplasmic domain modulates Env-mediated viral functions). Manrique, J.M., Celma, C.C.P., Affranchino, J.L. & González, S.A. CEVAN-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

El virus de inmunodeficiencia de simio (SIV) presenta una envoltura constituida por una doble capa lipídica donde se inserta la glicoproteína viral Env. La proteína Env posee una subunidad de superficie (SU), y una subunidad transmembrana (TM) que exhibe un dominio citoplasmático (CT) de 164 aminoácidos. Con el objeto de estudiar la contribución del dominio CT a las funciones virales mediadas por Env, se generaron y caracterizaron siete mutantes truncados de Env, en los que el CT de TM fue acortado progresivamente cada 20 aminoácidos a partir de su extremo C-terminal. Deleciones de 20 hasta 80 residuos inhiben la habilidad de Env de incorporarse a partículas virales, mientras que proteínas con deleciones de 100 a 140 aminoácidos se incorporan eficientemente. Llamativamente, mutantes de Env con un CT de sólo 44 o 24 aminoácidos de longitud se incorporan con mayor eficiencia que la Env salvaje. Por otro lado, se determinó que la habilidad diferencial de incorporación observada en las mutantes, no se debe a variaciones en sus niveles de expresión, procesamiento o transporte a la superficie celular. Ensayos de infectividad demostraron una buena correlación entre el nivel de incorporación de cada mutante y su capacidad de conferir infectividad a viriones. Nuestros estudios demuestran cómo la longitud del dominio citoplasmático de Env modula las funciones virales mediadas por esta proteína.

312 - ESTUDIO DE LA ENTRADA Y SALIDA DEL VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO 1008 POLARIZADAS. (Entry and release of Junin virus in polarized Vero 1008 cell line). Cordo, S. Damonte, E. Candurra, N. Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

El cultivo de células epiteliales permite formar monocapas polarizadas donde cada célula presenta dominios de membrana característicos de un epitelio: el dominio apical (A) hacia el lumen de la cavidad y el dominio basolateral (BL) hacia la lámina basal. Estos dominios se establecen por uniones estrechas entre las células de la monocapa y su constitución es asimétrica debido al transporte diferencial de moléculas hacia cada lado de la membrana. En este trabajo se investigó la interacción del virus Junín, cepa IV4454, con células Vero 1008 polarizadas que mostraron valores de resistencia eléctrica similares a los reportados en bibliografía (50-70 Ω cm²). La presencia de antígenos virales determinados por inmunofluorescencia indirecta, en las monocapas infectadas, fue similar en ambas caras demostrando la capacidad del virus para infectar tanto la cara A como la BL. Analizando la producción viral (UFP/ml) a las 24, 48 y 72 hs. post-infección de una u otra cara se determinó la salida preferencial del virus por la cara apical. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por medio de inmunoprecipitación y resolución en geles de poliacrilamida. Cultivos infectados y luego tratados con agentes que perturban el transporte vectorial mostraron una distribución similar de la progenie viral tanto hacia el lado A como hacia el basolateral BL.

313 - TIPIFICACION VIRAL DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (VFA) POR TECNICAS DE PCR. (Viral typification of Foot and Mouth Disease Virus using PCR techniques). Busi, M.V. y Ugalde, R. IIB - INTECH (Instituto Tecnológico de Chascomús) CONICET - UNSAM. CC 164, 7130 - Chascomús, Buenos Aires, ARGENTINA y Fundación COREPRO (Consejo Regional de la Producción). E-mail: busi@intech.gov.ar

Una de las características más notables del Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) es su diversidad antigénica. Por métodos inmunológicos se han clasificado siete serotipos (tipos) denominados A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 y ASIA y más de 65 subtipos. Considerando que la vacunación con un tipo de virus no protege necesariamente contra los otros y dado que el VFA es capaz de establecer infecciones persistentes en animales que han superado la fase aguda de la enfermedad y en animales vacunados, se desarrolló una técnica de diagnóstico de gran sensibilidad y altamente específica, que no solo certifica la presencia o ausencia de virus, sino también el tipo y subtipo viral que afecta al animal.

Mediante la técnica de RT-PCR sobre el segmento de RNA viral que codifica para VP1 (Proteína estructural del virus, de localización externa, responsable de la actividad antigénica) y el análisis de secuencia por enzimas de restricción (Alu I, Kpn I, Hind III, Eco 47 III, BssH II, Hae III) se llegaron a identificar tres tipos virales (A, O, C) que son los que afectan a la región sur de Sudamérica, y tres subtipos (A87, A24 y A79).

314 - CINETICA Y RENDIMIENTO DE LA MULTIPLICACION DEL VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR MULTIPLE DE ANTICARSIA GEMMATALIS EN CULTIVOS EN SUSPENSION DE LA LINEA CELULAR UFL-Ag-286. (Kinetics and yield of the *Anticarsia gemmatalis* multiple nuclear polyhedrosis virus multiplication in suspension cultures of the UFL-Ag-286 insect cell line). Leguizamón, E., Claus, J. INTEBIO, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, R. Argentina. E-mail: jclaus@fbc.unl.edu.ar.

Cultivos en suspensión en frascos agitados de una sub-población de la línea celular UFL-Ag-286 fueron infectados con el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), un baculovirus utilizado como insecticida biológico. La infección se realizó a una multiplicidad de infección de 2 DICC_{50%}/célula, en distintas fases de la curva de crecimiento, con o sin recambio de medio de cultivo. En los cultivos infectados en fase exponencial, el pico de velocidad de producción de viriones no incluidos se produjo entre las 24 y 48 horas post-infección, alcanzándose el rendimiento máximo a las 96 horas ($6,32 \times 10^8$ DICC_{50%}/ml, 632 DICC_{50%}/célula); la velocidad máxima de producción de cuerpos de inclusión se verificó entre las 48 y 72 horas, alcanzándose un rendimiento máximo de $5,74 \times 10^7$ poliedros/ml ($57,4$ poliedros/célula) a las 72 horas. La infección durante la fase estacionaria produjo rendimientos significativamente menores, obteniéndose un título de cuerpos de inclusión de $1,22 \times 10^7$ poliedros/ml, con un rendimiento específico de $3,13$ poliedros/célula. Sin embargo, el recambio de medio de cultivo antes de la infección en fase estacionaria permitió elevar significativamente los rendimientos de cuerpos de inclusión: $1,38 \times 10^8$ poliedros/ml y $26,8$ poliedros/célula. Estos resultados permiten avanzar en el reconocimiento de los factores fisiológicos y culturales que condicionan la producción de AgMNPV en cultivos celulares.

Agradecimiento: financiado por ANPCYT (PICT 08 04411).

315 - ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL OXIDO NITRICO SOBRE LA INFECCION VAGINAL CON HERPES SIMPLEX TIPO 2 EN EL MODELO RATON (Antiviral activity of nitric oxide in the vaginal infection of the mouse with HSV-2). Gamba, G.; Massouh, E.J.; Benencia F. Laboratorio de Inmunquímica, Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA.

En este trabajo investigamos la activación de la óxido nítrico sintetasa inducible y el efecto de la aminoguanidina (AMG), un inhibidor de dicha enzima durante la infección vaginal de ratones Balb/c con herpes simplex virus tipo 2 (HSV-2), cepa G. Grupos de 10 ratones fueron infectados por vía intravaginal con 10^6 UFP del virus y a distintos días post-infección (p.i.) se extrajo RNA de vagina y ganglios linfáticos inguinales (GLI) a fin de determinar la cinética de activación de la iNOS por la técnica RT-PCR. Pudo observarse una activación de dicha enzima a nivel GLI a las 24 hs p.i., mientras que al día 3 p.i. se obtuvieron muestras positivas a nivel de vagina. Grupos de 10 animales fueron tratados (inoculación intraperitoneal, volumen: 0.5 ml) por tres días, a partir del día de la infección, con diferentes concentraciones (0.4, 2 y 10 mg/ml) de AMG en PBS. En los animales tratados se observó un aumento de la severidad de la patología (día 3 p.i., controles: 50% de enfermedad, tratados: 0.4 mg/ml, 75% de enfermedad, $p < 0.05$; 2 mg/ml y 10 mg/ml, 100% de enfermedad, $p < 0.05$) y de la mortalidad (control y 0.4 mg/ml, 30%; 10 y 2 mg/ml AMG: 50%, $p < 0.01$). Se registró también un aumento en los títulos de virus en secreciones vaginales y vagina en animales tratados. Estos datos indican una contribución del óxido nítrico en la respuesta inmune natural hacia herpesvirus en infecciones vaginales.

316 - RESPUESTA TEMPRANA DE CITOQUINAS EN MUCOSA DURANTE LA INFECCION INTRANASAL CON HSV-1 EN EL MODELO RATON. (Early cytokine response in mucose during the intranasal infection of HSV-1 in the mouse model). Gamba, G.; Courreges, M.C.; Gonzalez Videla, R.; Massouh, E.J.; Benencia F. Laboratorio de Inmunquímica, Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA

En este trabajo investigamos la activación de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y distintas citoquinas durante la infección intranasal de ratones Balb/c con herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1), cepa F. En este modelo se genera una neumonitis que culmina en la muerte de los animales infectados. Grupos de 10 ratones fueron infectados por vía intranasal con 10^7 UFP del virus y a distintos días post-infección (p.i.) se extrajo RNA de turbinato (Tb) y pulmones (Pm) a fin de determinar la activación de la iNOS y citoquinas por la técnica RT-PCR. La presencia de TNF- α e IL-12 se detectó a partir de las 12 hs p.i. hasta el día 6 p.i. tanto en Tb como en Pm. También se detectaron niveles de IFN- γ entre las 48 y 72 hs p.i. La expresión de iNOS, inducible por TNF- α , IL-12 e IFN- γ , pudo observarse entre los días 2 y 6 p.i.. Con respecto a citoquinas TH2, la transcripción de IL-4 y de IL-10 ocurre tempranamente (12 hs p.i.) perdurando ambas hasta las 72 hs p.i. Observamos una tardía expresión (día 6 p.i.) de TGF- β a nivel de pulmones, probablemente como una respuesta a la profunda inflamación que allí se desarrolla. La expresión de la iNOS durante las primeras etapas de la infección herpética determina la producción de óxido nítrico, molécula de reportada actividad antiviral y fundamental en la respuesta inmune innata frente a infecciones.

317 - EXPRESION DEL POLIPEPTIDO NO ESTRUCTURAL 3ABC DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA (VFA) EN BACTERIAS Y EN CELULAS BHK21. (Expression of foot and mouth disease virus 3ABC non structural polypeptide in bacteria and BHK21 cells). Capozzo, A.*; Musikant, D*.; Burke, D*.; La Torre, J y Grigera, P*. Dp. Microbiología, UVA*, USA, Centro de Virología Animal*, CONICET; Fundación COREPRO*; Argentina.

En trabajos anteriores demostramos que el polipéptido 3ABC, producto de procesamiento proteolítico del precursor P3 codificado en el tercio 3' del RNA viral, posee un alto "turn over" y afinidad por el citoesqueleto celular. También postulamos su participación en el procesamiento de la histona H3, un componente estructural y funcional clave de la cromatina celular, en la célula infectada con VFA.

Aquí informamos sobre la expresión en bacterias de un recombinante 3ABC capaz de autoprocresarse e inducir la degradación del polipéptido ribosomal S1 dentro de las 3 horas post inducción con IPTG. La expresión en células BHK21 de 3ABC original o de una contraparte con los cuatro sitios de consenso de autoprocresamiento mutados, inducen la transición histona H3 a Pi, idéntica a la promovida en células infectadas por VFA. El procesamiento de H3 no se lleva a cabo en células transfectadas con la secuencia 3ABCcys163, donde el sitio activo de 3C esta mutado.

Estos resultados y la particular localización de los polipéptidos recombinantes expresados, de acuerdo a estudios de fluorescencia y fraccionamiento celular, confirman a 3ABC como un efector de importancia sobre proteínas de relevancia funcional y estructural en la célula infectada.

318 - UN VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR (VSV) RECOMBINANTE CONTENIENDO LA GLICOPROTEINA E2 DEL VIRUS DE LA DIARREA BOVINA (VDVB) INDUCE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI VDVB EN RATON (Neutralizing anti BVDV antibodies induced in mice by a recombinant VSV containing BVDV E2 glycoprotein). Marzocca, M.*; Capozzo, A.*; Buonoore, L.*; Donis, R.*; Rose, J.* y Grigera, P.*. *CEVAN-CONICET, Buenos Aires, Argentina. *Yale University School of Medicine, CT, USA, * University of Nebraska, LN, USA

La infección de células BHK21 en monocapa con un recombinante quimérico del Virus de la estomatitis vesicular (VSV) conteniendo el gen de la glicoproteína E2 del Virus de la diarrea viral bovina (VDVB) indujo la síntesis de la proteína recombinante E2 (rE2) que coemigra con su equivalente nativa presente en infecciones de VDVB.

La rE2 es un homodímero unido por puentes disulfuro con por lo menos 10 veces más avidéz para la unión de anticuerpos dependientes de la conformación que su contraparte monomérica reducida y es transportada a la membrana plasmática de acuerdo a estudios de inmunofluorescencia.

El dímero rE2 se incorporó en los viriones en una proporción 1/10 con respecto a la glicoproteína G, constituyente natural del virión. Ratones inoculados intranasalmente con dosis de 10^7 PFU no mostraron síntomas de la enfermedad y desarrollaron respuesta neutralizante hasta por lo menos 180 días postinoculación.

Los resultados sugieren que este recombinante podría tener utilidad como vacuna bivalente contra 2 enfermedades de mayor relevancia veterinaria.

319 - SINTESIS DE LA NUCLEOPROTEINA DEL VIRUS JUNIN DURANTE LA INFECCION PERSISTENTE DE CELULAS VERO (Junin Virus nucleoprotein synthesis during persistent infection of Vero cells) Ellenberg, P.¹; Lozano M.²; Scolaro L. ¹Lab. Virología, Quím. Biol., FCEyN, UBA. ²Lab de Ingeniería Genética y Biol. Mol., Depto de Ciencia y Tecnología, UNQ.

El arnavirus Junín (VJ), agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, establece infecciones persistentes en células Vero, estadio caracterizado por un equilibrio entre el potencial citolítico del virus y el metabolismo celular. A fin de estudiar la expresión de la nucleoproteína viral (N, 64kDa) en este tipo de infecciones, se utilizaron dos cultivos infectados persistentemente con las cepas atenuadas de VJ, XJCl₃ y Cl₆₇, denominados V₃ y V₇, respectivamente, en comparación con células infectadas en forma aguda con XJCl₃ (V#3). V₃ y V₇ no presentaron efecto citopático ni produjeron virus infeccioso, exhibiendo un 30-40% de células (+) para antígenos de VJ por inmunofluorescencia empleando un suero policlonal anti-VJ. Mediante esta última técnica se detectaron, en V₃ y V₇, gránulos e inclusiones citoplasmáticas de mayor tamaño y distribución diferencial respecto de V#3. Mediante RT-PCR se demostró la presencia del gen correspondiente a N en los 3 cultivos. Por western blot, utilizando un mAb anti-N, se observaron 3 bandas de 64, 40-42, y 25 kDa, correspondientes a N y a 2 productos de su degradación (mayoritarios en V₃ y V₇ respecto de V#3). Por radioinmunoprecipitación, se encontraron las mismas bandas aunque en proporciones similares para V₃, V₇ y V#3. Estos resultados sugieren un equilibrio diferencial en la síntesis/degradación de N, en los cultivos persistentemente infectados respecto de los infectados de forma aguda.

320 - EFECTO DE MELIACINA, UN ANTIVIRAL DE ORIGEN VEGETAL, EN LA LOCALIZACION INTRACELULAR DE PROTEINAS VIRALES. (Effect of meliacine, a plant-derived antiviral, on the intracellular location of viral proteins) Barquero A.A., Alché L.E. y Coto C.E. Lab. de Virología - Depto. Química Biológica - FCEyN - UBA.

Meliacina (MA) es un principio antiviral presente en una fracción purificada de extractos de hojas de la planta *Melia azedarach* L. que inhibe la multiplicación del virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y del virus de la estomatitis vesicular (VSV). En el presente trabajo se investigó la acción de MA sobre la localización intracelular de las proteínas M y G de VSV y D de HSV-1 (pM, pG y pD) para determinar si el efecto antiviral observado está relacionado con un procesamiento inadecuado de las proteínas virales. Para ello, células Vero infectadas a alta multiplicidad de infección con VSV o HSV-1 se trataron con 50 µg/ml de MA durante 6 o 13 hs., respectivamente. Las células se procesaron para un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas virales en estudio. Los resultados obtenidos demostraron que MA alteró la distribución intracelular de pG de VSV sin modificar la de pM. La pG apareció asociada a inclusiones citoplasmáticas perinucleares de fluorescencia muy intensa y no fue detectada en membrana plasmática. Se obtuvieron resultados similares con la pD de HSV-1. Dado que MA tan sólo afectó la localización de las glicoproteínas, se realizó un experimento utilizando una lectina conjugada a rodamina, que se une específicamente al aparato de Golgi, encontrando que tanto pG como pD co-localizan en dicha organela. En consecuencia, MA actúa sobre el procesamiento de las glicoproteínas de VSV y HSV-1.

321 - LA APOPTOSIS INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR INVOLUCRA LA ACTIVACION DE CASPASAS Y LA MODULACION DE BCL-XL. (Vesicular stomatitis virus-induced apoptosis involves caspase activation and bcl-xl modulation). *Perfetti, X., Gadaleta, P., Vacotto, M., Coulombie, F.* Laboratorio de Virología, Dpto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

El virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) induce apoptosis en distintas líneas celulares de mamíferos. Para conocer los mecanismos involucrados, estudiamos los componentes celulares intervinientes en la apoptosis de células VERO infectadas con VSV.

Para estudiar el papel de las caspasas, se incubaron células infectadas con el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk, observándose: 1) una reducción en los cambios morfológicos nucleares característicos de la apoptosis, 2) reducción en la fragmentación del DNA cromosómico y 3) un aumento en la viabilidad celular. Luego, se investigó si la apoptosis inducida por VSV forma parte de una estrategia celular para disminuir la diseminación viral, o si es un mecanismo viral para favorecer la productividad. Se observó que la producción viral no se modifica por la presencia del inhibidor de caspasas, por lo tanto la inducción de apoptosis no afecta la eficiencia de multiplicación viral. Finalmente, estudiamos el papel que cumplen las proteínas reguladoras de la familia de Bcl-2. Mediante inmunoblot analizamos los niveles intracelulares de Bcl-xL y Bax durante la infección viral. Este análisis mostró una disminución en el nivel de Bcl-xL concomitantemente con la infección, mientras que el nivel de Bax no se modificó, sugiriendo que la regulación de Bcl-xL es específica. Dado que Bcl-xL desaparece casi completamente a las 12 hs post-infección, esta reducción podría ser consecuencia de un proceso postranscripcional.

322 - DESARROLLO DE UN SISTEMA DE EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS BASADO EN EL VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR DE *Anticarsia gemmatilis* (Development of a heterologous gene expression system based on the *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrosis virus) *Arana, E.I.¹; Ghiringhelli, P.D.²; O'Reilly, D.³ y Romanowski, V.^{1,2}* ¹Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina; ²Dpto. De Ciencia y Tecnología, CEI, UNQ, Bernal, Argentina; ³Dept. of Biology, Imperial College, Londres, Reino Unido. eloarana@biol.unlp.edu.ar

Los baculovirus son de particular interés tanto por su utilidad para la expresión de genes heterólogos como por su potencial empleo para el control biológico de plagas. En algunos países del Mercosur se está intentando controlar a la oruga de las leguminosas *Anticarsia gemmatilis*, utilizando el baculovirus AgMNPV wt. Sin embargo, su uso se encuentra limitado debido al tiempo letal prolongado. En nuestro laboratorio se ha encarado el proyecto de generar un sistema para la producción de recombinantes de AgMNPV (rAgMNPV) con la idea de aprovechar el sistema creado para generar virus con una actividad insecticida mejorada mediante la introducción de genes de hormonas o toxinas específicas de insectos. En esta primera etapa, se construyó un plásmido conteniendo el gen lacZ de *E. Coli*, flanqueado por las regiones *upstream* y *downstream* del gen *polh*, y se utilizó para insertar este gen marcador en el locus *polh* por recombinación homóloga. De esta manera, se generó un recombinante de AgMNPV con el genotipo *polh⁺ lacZ⁺*. La identidad y pureza de los recombinantes aislados por dilución terminal, se verificó mediante el análisis de su DNA por patrón de restricción, *Southern blot* y PCR. Asimismo se estudió la expresión de β -galactosidasa. Este nuevo virus se utilizará como parental para la producción de recombinantes, en los cuales se reemplazará al gen lacZ por genes heterólogos de interés.

323 - INTRODUCCION DE SITOS DE RESTRICCION UNICOS EN EL GENOMA DE AgMNPV (*Anticarsia gemmatilis* Nucleopolyhedrovirus). Introduction of unique restriction sites in the AgMNPV genome. *McCarthy, C.¹; Arana, E.¹; Sciocco-Cap, A.¹; Romanowski, V.^{1,2}* ¹Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata; ²Dpto. De Ciencia y Tecnología, CEI, UNQ, Bernal; ³IMYZA-INTA Castelar, Argentina.

El nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatilis* (AgMNPV) es el baculovirus más utilizado como biopesticida. Se aplica anualmente en Brasil en más de un millón de hectáreas de soja para el control de la "oruga de las leguminosas". Sin embargo, su uso está limitado por su baja velocidad de acción. En nuestro laboratorio se está llevando adelante un proyecto que abarca la generación de recombinantes de AgMNPV (rAgMNPV) y el estudio de sus efectos sobre larvas del hospedador y de otras especies del complejo de orugas defoliadoras de la soja. Se proyecta incrementar la eficiencia de este bioinsecticida mediante cambios dirigidos en el genoma del virus, a través de la recombinación homóloga. La baja proporción de recombinantes en la progenie (1% o menos, de los cuales la mayoría son recombinantes simples) puede mejorarse usando DNA viral linealizado. Con este fin, diseñamos una estrategia para incorporar sitios de restricción únicos en el genoma de AgMNPV. Como primer paso, se introdujeron sitios de restricción para la enzima I-Pol (endonucleasa codificada por un intrón) en un plásmido de transferencia que contenía el gen LacZ, flanqueado por las regiones *upstream* y *downstream* del gen *polh*. La cotransfección del plásmido y el DNA de AgMNPV generó un rAgMNPV con sitios de restricción únicos. Este virus será utilizado como parental para la producción de otros recombinantes.

324 - ANALISIS DE LOS EFECTOS HISTOPATOLOGICOS PRODUCIDOS POR EpapGV EN LARVAS DE SU HOSPEDERO. (Analysis of the histopathological effects produced by EpapGV on its host larvae). *Goldberg, A.¹; Romanowski, V.^{2,3}; Sciocco-Cap, A.¹; IMYZA-INTA Castelar, ²Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata; ³Dpto. de Ciencia y Tecnología, CEI, UNQ, Bernal, Argentina.*

Epinotia aporema es una de las principales plagas del cultivo de soja. Recientemente, un virus de la granulosis (Epap GV) fue aislado, caracterizado y evaluado como agente de biocontrol de esta plaga. Con el fin de estudiar los efectos de la infección producida por Epap GV sobre su hospedero natural, se realizaron estudios histológicos y de inmunohistoquímica, mediante microscopía óptica y electrónica. Por medio de la técnica de hibridación *in situ*, utilizando una sonda antisense de rRNA, se evaluaron los cambios en los niveles de ribosomas de las células en estados avanzados de la infección. Los principales tejidos afectados fueron el tejido adiposo, la epidermis y la matriz traqueal. Se observó una hipertrofia celular seguida por la ruptura de la membrana nuclear y la dispersión del estroma virogénico dentro de la célula. Esta ruptura se produciría luego de la expresión de genes tardíos, como el de la granulina. En estados avanzados de la infección se encontraron gránulos en el citoplasma de hemocitos. Sin embargo, no se observaron cambios citopatológicos indicativos de infección por lo que se infiere que los mismos actúan fagocitando cuerpos de inclusión. Se observó una drástica reducción en los niveles de ribosomas y la presencia de depósitos anormales de estructuras membranosas, indicando una marcada alteración metabólica de las células infectadas.

325 - CLONADO MOLECULAR Y ANALISIS DE LA SECUENCIA DEL GEN *p74* DEL VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR DE *Anticarsia gemmatilis*. (Molecular cloning and sequence analysis of AgMNPV *p74* gene). Belaich¹, M.N.; Perrat¹, P.N.; Sciocco-Cap², A.; Romanowski^{1,3}, V.; Lozano¹, M.E. y Ghiringhelli¹, P.D. ¹LIGBCM (Lab. de Ing. Gen. y Biol. Cel. y Molec.), Departamento de Ciencia y Tecnología - CEI, Univ. Nac. de Quilmes; ²IMYZA, INTA-Castelar; ³IBBM, UNLP, Argentina. (E-mails: mbelaich@unq.edu.ar o pdg@unq.edu.ar)

A. gemmatilis es un lepidóptero plaga en cultivos de soja de distintos países del Mercosur. En Brasil se usa como bioinsecticida un baculovirus de poliedrosis nuclear de *A. gemmatilis* (AgMNPV). Sin embargo, el tiempo letal prolongado hace necesario alterar su patogenicidad modificándolo genéticamente. El uso de virus modificados y con capacidad replicativa intacta, plantea dudas acerca de la bioseguridad. El empleo de variantes defectivas en el gen de poliedrina y la delección o alteración de genes relacionados con algunas de las etapas del ciclo viral permite aumentar la bioseguridad. En este trabajo se presentan las etapas iniciales en el desarrollo de líneas celulares de *A. gemmatilis* genéticamente modificadas para expresar, en forma inducible, el gen codificante para *p74*. Como primer etapa, en base a las secuencias conocidas de otros baculovirus, diseñamos primers conservados, y generamos productos de amplificación específicos correspondientes a dos aislamientos de AgMNPV (Brasil y Argentina). Después identificar el fragmento de restricción genómico de AgMNPV conteniendo el locus *p74* completo, clonarlo y secuenciarlo, la información obtenida fue analizada comparativamente con secuencias homólogas de otros baculovirus. La disponibilidad del locus de *p74* clonado, nos permitirá generar una variante de AgMNPV $\Delta p74$ y una línea celular de insecto *p74*⁺. Con esta herramienta se podrán empaquetar viriones defectivos y así contar con mejores niveles de bioseguridad.

326 - CLONADO MOLECULAR DEL GEN *ie1* DEL VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR DE *Anticarsia gemmatilis* Y ANALISIS FUNCIONAL DE LA REGION PROMOTORA. (Molecular cloning of AgMNPV *ie1* gene and functional analysis of promoter region). Bilen¹, M.F.; Pilloff¹, M.G.; Morais Ribeiro², B.; Romanowski^{1,3}, V.; Lozano¹, M.E. y Ghiringhelli¹, P.D. ¹LIGBCM (Lab. de Ing. Gen. y Biol. Cel. y Molec.), Dto. de Ciencia y Tecnología, UNQ, Saenz Peña 180, (1876) Bernal. ²Dto. de Biología Celular, Univ. de Brasília. ³Inst. de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), UNLP. (E-mails: mbilen@unq.edu.ar o pdg@unq.edu.ar)

A. gemmatilis (Lep. Noctuidae), es una de las principales plagas de la soja en América del Sur. Un nucleopoliedrovirus (AgMNPV) aislado en Brasil demostró ser un posible agente de control microbiano. Este baculovirus se usa actualmente en más de un millón de hectáreas en Brasil. Sin embargo, el tiempo letal prolongado limita su aceptación. Mediante técnicas de DNA recombinante podría alterarse su patogenicidad, introduciendo genes codificantes para toxinas, hormonas de insecto, etc. y/o eliminando genes virales específicos. El uso del promotor de *ie1* para manejar la expresión de genes foráneos es una idea atractiva que ha tenido éxito en otros sistemas baculovirus-insecto. El locus *ie1* de AgMNPV está ubicado en un fragmento genómico BglII/XhoI de 2396 pb, que contiene los 1707 pb correspondientes al ORF *ie1* y las regiones regulatorias *upstream* y *downstream*. La proteína IE1 de AgMNPV tiene más del 60% de identidad aminoacídica con las de otros baculovirus. Por otra parte, con la finalidad de realizar estudios básicos de la cinética transcripcional se construyeron plásmidos recombinantes con genes reportadores, tales como *LacZ*, bajo el control del promotor de *ie1*. Estas tareas iniciales, permiten sentar las bases para evaluar la factibilidad de la construcción de vectores de transferencia aptos para el clonado de genes foráneos bajo el control del promotor de *ie1*.

327 - ANALISIS COMPARATIVO DE LA COMPLEJIDAD INFORMATIVA EN LOS RNAs S GENOMICOS DE ARENAVIRUS. (Comparative analysis of the informative complexity in Arenavirus genomic S RNAs). Aljinovic, E.M. y Ghiringhelli, P.D. LIGBCM (Lab. de Ing. Gen. y Biol. Cel. y Molec.), Departamento de Ciencia y Tecnología - CEI, Univ. Nac. de Quilmes, Bernal, Argentina. (E-mails: ealjinov@unq.edu.ar o pdg@unq.edu.ar)

La teoría de la información, que estudia las propiedades de los mensajes, permite describir globalmente la información de los mismos mediante el cálculo del contenido informativo. Para realizar un estudio más detallado de cualquier mensaje, se puede calcular la complejidad local de la información. Los ácidos nucleicos, como mensaje unívoco de cada organismo, son macromoléculas informativas por excelencia, y la probabilidad de encontrar dos mensajes iguales derivados de una evolución convergente tiende al infinito. Considerando el RNA S de la cepa Candid #1 del virus Junín (longitud 3413 nt.), la chance de encontrar una secuencia exactamente igual es de 1 en 2×10^{2044} genomas de arenavirus. El concepto expresado anteriormente es cierto cuando se considera la información particular de cada mensaje. Otro aspecto informativo de los mensajes se refiere a la organización de la información, en forma independiente del contenido de la misma. Desde este punto de vista, la comparación de los patrones de complejidad local de composición (LCC: *Local Composition Complexity*) de macromoléculas relacionadas evolutivamente muestra un cierto grado de similitud organizativa. Dicha similitud se puede correlacionar con el grado de relación evolutiva de las macromoléculas en cuestión. En este trabajo se presenta el desarrollo de una metodología de análisis comparativo, que permite determinar relaciones, cualitativas y/o cuantitativas, basadas en los perfiles individuales de LCC de un conjunto de secuencias filogenéticamente relacionadas.

328 - DETECCION DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE PAPILLOMAVIRUS HUMANO EN LA LINEA CELULAR DE HEPATOPBLASTOMA HEPG-2. (Detection of HPV-DNA in hepatoblastoma HepG2 cell line). Remorini P.G*, y Lojo M. M.**. **Catedra de genética Microbiana- Fac. Cs. Veterinarias- UNLP. *Centro de Virología Animal (CEVAN)- CONICET

Estudios realizados en el año 1998 en colaboración con el Servicio de Patología del Hospital Sor María Ludovica de la ciudad de La Plata, han puesto de manifiesto la presencia de secuencias específicas de HPV en biopsias de hígado correspondientes a dos patologías hepáticas neonatales y a hepatoblastoma. Estos hallazgos nos llevaron a investigar la posible presencia de ADN HPV en la línea celular HepG2. Estas células de morfología epitelial derivan de un hepatoblastoma, y se encuentran registradas como ATCC HB-8065.

Los estudios realizados por la técnica de Southern Blott, usando como sonda los plásmidos portadores de las secuencias completas de HPV-16 y HPV-18 y revelados por quimioluminiscencia pusieron de manifiesto la presencia de secuencias complementarias a dichas sondas en los digestos correspondientes al ADN de las células en estudio. Esto sugiere que las células de hepatoblastoma podrían ser portadoras de secuencias ADN-HPV compatibles con tipos virales considerados de alto riesgo. Agradecimientos: Al Dr. Ricardo Drut y a la Dra. Mónica Drut y a la Dra. Cristina Cordo y al Lic. Guillermo Villegas por la valiosa colaboración brindada.

329 - UN SISTEMA DE GENETICA REVERSA PARA UN ARENAVIRUS (A Reverse Genetic System for an Arenavirus) Lopez, N., Jácamo, R., Franze, M.T. CEVAN (CONICET) Serrano 669. Buenos Aires.

El arenavirus Tacaribe (VTac) contiene dos ARNs de cadena simple. Cada ARN codifica dos proteínas con estrategia codificante bisentido: la nucleoproteína (N) y la glicoproteína están codificadas en el ARN "S"; la ARN polimerasa (L) y una proteína "ring finger" (p11), en el ARN "L".

Se ha desarrollado un sistema de genética reversa para estudiar las bases moleculares de la replicación y transcripción en arenavirus. Para este fin se han construido plásmidos que transcriben, bajo el control del promotor de la T7 polimerasa, análogos del ARN "S" genómico o antígenómico del VTac. Estos contienen la copia negativa del gen reportero CAT (cloranfenicolacetiltransferasa) flanqueada por las regiones 3' y 5' no codificantes del ARN "S". También se construyeron plásmidos que expresan, bajo el control de la T7 polimerasa, las proteínas L, N ó p11 del VTac.

En células infectadas con virus vaccinia que expresa la T7 polimerasa y transfectadas con los plásmidos mencionados, se encontró que las proteínas L y N del VTac son suficientes para la transcripción (medida como expresión de CAT) y la replicación (medida por inmunoprecipitación de las nucleocápsides) de los análogos del ARN "S" genómico o antígenómico.

Subsidiado por ANPCyT.

330 - DOMINIOS DE ENSAMBLADO EN LA PROTEINA MATRIZ DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DE FELINOS (FIV). (Assembly domains in the matrix protein of feline immunodeficiency virus [FIV]) Manrique M. L., Celma C.C.P., González S.A y Affranchino J.L. Centro de Virología Animal (CEVAN), Buenos Aires, Argentina

El virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) es un lentivirus que causa en gatos domésticos un síndrome de inmunodeficiencia similar al SIDA de humanos. Por ello, el sistema FIV-gato doméstico es considerado actualmente un modelo adecuado para el estudio de las infecciones producidas por el virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV). FIV posee, al igual que el resto de los lentivirus, tres genes principales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para un precursor poliproteico (Gag) que se ensambla en partículas en la membrana plasmática de las células infectadas. Durante la brotación de los viriones, Gag se procesa para dar las proteínas maduras de la cápside: matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). Hemos expresado el precursor Gag de FIV utilizando el sistema recombinante de vaccinia obteniendo el ensamblado de partículas pseudovirales que son liberadas al medio extracelular. Para estudiar la contribución del dominio MA al ensamblado de FIV se introdujeron sustituciones aminoacídicas y deleciones en regiones conservadas de esta proteína. Los genes *gag* con mutaciones en la MA se expresaron con el sistema de vaccinia. Los resultados obtenidos condujeron a la identificación en la MA de FIV de dominios necesarios para la formación eficiente de partículas.

331 - IDENTIFICACION DE LOS DOMINIOS EN LA GLICOPROTEINA DE ENVOLTURA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DE SIMIOS (SIV) NECESARIOS PARA SU INCORPORACION A VIRIONES (Domains in the SIV Env protein that are necessary for its incorporation into virions) Celma, C.C.P., Manrique, J.M., Affranchino, J.L. y González, S.A. Centro de Virología Animal (CEVAN-CONICET), Buenos Aires, Argentina

La glicoproteína (Env) de los virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV) y de simios (SIV) está formada por una subunidad de superficie (gp120) y una subunidad transmembrana (gp41) que posee un dominio citoplasmático (CT) inusualmente largo de 150-164 aminoácidos. Los viriones al brotar de la membrana plasmática incorporan la proteína Env, proceso que les confiere infectividad. Para estudiar si el dominio CT de gp41 es necesario para mediar la incorporación de Env a las partículas virales de SIV, se introdujeron pequeñas deleciones internas en CT y los genes *env* mutados se expresaron utilizando el sistema recombinante de vaccinia. El efecto de las mutaciones en gp41 sobre la incorporación de Env a las partículas se estudió por coexpresión de Gag de SIV con cada Env mutante. Las deleciones que afectaban la región carboxilo terminal de CT inhibieron tanto la incorporación de Env a las partículas como su infectividad, sin alterar la expresión de Env en la superficie celular. Los resultados obtenidos demuestran que la región C-terminal de CT alberga los dominios que median la incorporación de Env a los viriones.

332 - PROCESADO DE GLICOPROTEINAS RECOMBINANTES Y AUTENTICA DE ARENAVIRUS (Processing of Recombinant and Authentic Arenavirus envelope Glycoproteins) Jácamo, R., Rossi, C., Lopez, N., Franze, M.T. CEVAN (CONICET) Serrano 669. Buenos Aires.

Los arenavirus Tacaribe (VTac) y Junín (VJun) son virus cuyas glicoproteínas de envoltura (G1 y G2) son generadas por el procesamiento proteolítico de una glicoproteína precursora (GPC). Resultados recientes revelaron que las GPCs recombinantes de los VTac y VJun generan anticuerpos homólogos con eficiencia muy diferente (Lopez y col. (2000), *J. Gen. Virol.*, 81, 1273-1281). Esto llevó a estudiar el procesamiento de la GPC auténtica y recombinante del VTac y de la GPC recombinante del VJun. El clivaje proteolítico de la GPC del VTac es lento comparado con el de la GPC de otros arenavirus. Un comportamiento similar se observa en el clivaje de la GPC recombinante del VTac mientras que la GPC recombinante del VJun es clivada más rápidamente. En todos los casos el clivaje tiene lugar antes de adquirir resistencia a endonucleasa H. La GPC de los arenavirus posee, en la región propuesta para el clivaje proteolítico, secuencias conservadas entre las que se encuentra una secuencia dibásica. Esta se conserva en la GPC del VJun pero no en la del VTac. Se ha mutagenizado la zona propuesta para el clivaje de la GPC del VTac, introduciendo, entre otras mutaciones, secuencias dibásicas. Se estudia el procesamiento de las proteínas mutadas para determinar posteriormente su capacidad inmunogénica.

Subsidiado por ANPCyT

PROTOZOOLOGIA

333 - SEÑAL DE CALCIO EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* ESTIMULADOS CON MASTOPARAN. CAMBIOS INDUCIDOS EN EL METABOLISMO DE FOSFOLIPIDOS. (Calcium signalling in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* stimulated with mastoparan. Changes induced on the phospholipid metabolism.) Santander, V., Bonansea, S., Bollo, M. y Machado-Domenech, E. Dpto. Biología Molecular FCEFQN UNRC. Río Cuarto. Argentina.

En *Trypanosoma. cruzi* se demostró la presencia del ciclo del inositol fosfato y la capacidad del parásito de responder a carbacol, un análogo de acetilcolina, mediante el aumento en el recambio de polifosfoinosítidos y ácido fosfatídico y en los niveles de inositol trifosfato (IP_3). Se conoce además que el tetradecapeptido mastoparan es una herramienta muy usada en el estudio de las señales de transducción debido a que es capaz de activar proteínas G heterotriméricas. Con el objeto de estudiar la respuesta del parásito frente a mastoparan nos propusimos investigar posibles cambios en la señal de calcio y en el metabolismo de fosfolípidos. Para ello, se utilizaron formas epimastigotes de *T. cruzi*. La concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se midió en células cargadas con Fura 2-AM. El metabolismo fosfolipídico se estudió mediante la incorporación $[^{32}P]Pi$. Mastoparan induce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y cambios en el patrón fosfolipídico de células estimuladas. Ambos efectos se modifican cuando está ausente el Ca^{2+} en el medio extracelular. Esto indicaría que la señal de Ca^{2+} producida por mastoparan se debe a la movilización del ión desde reservorios intracelulares y al aumento de su entrada. Esta sería la primera vez que se observa dependencia de Ca^{2+} extracelular frente a estímulos externos, convirtiendo a mastoparan en un modelo para el estudio de los diferentes fuentes de Ca^{2+} involucradas en la señal celular. Subsidiado por: CONICET-CONICOR-FONCYT-SECYT(UNRC).

334 - IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE T. CRUZI QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO CATALITICO DE LA ENZIMA ADENILIL CICLASA (TczAC). (Identification of *T. cruzi* proteins that interact with the catalytic domain of the enzyme adenylyl cyclase (TczAC)). D'Angelo, M., Montagna, A., Flawiá, M. M., y Torres, H. N. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, and Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

EL AMPc desempeña un gran número de funciones tanto en eucariotas como en procariotas. En el parásito *Trypanosoma cruzi* este segundo mensajero estaría involucrado en los mecanismos de crecimiento y diferenciación de las formas no infectivas a las infectivas.

En tripanosomátidos la adenilil ciclasa (AC), enzima responsable de la síntesis del AMPc, presenta características únicas en su estructura y bioquímica. Sin embargo, nada se conoce de proteínas que regulan la actividad de esta enzima.

En nuestro laboratorio se clonó y caracterizó funcionalmente una de las isoformas de la adenilil ciclasa de *T. cruzi* determinándose que presenta una estructura típica de AC de tripanosomátidos y cuya secuencia carece de sitios involucrados en la interacción con proteínas reguladoras conocidas en otros sistemas (proteínas G y CAP).

En este trabajo, por medio de la técnica de doble híbrido se identificaron proteínas que interaccionan con la adenilil ciclasa de *T. cruzi*. Para esto se utilizó el dominio catalítico de la enzima y una biblioteca de expresión del estadío epimastigote.

El resultado fue la obtención de 11 clones específicos. La secuencia de estos clones permite predecir la presencia de putativos sitios de regulación, pero no presenta homología con ninguna de las proteínas reguladoras conocidas de esta enzima. Los clones se utilizaron para rastrear las secuencias completas en una biblioteca genómica.

335 - CLONADO Y CARACTERIZACION DE UNA PROTEINA DE LA FAMILIA SR, TcSR, Y DE UNA PUTATIVA PROTEINA QUINASA DE PROTEINAS SR, SRPK, EN *TRYPANOSOMA CRUZI*. (Cloning and characterization of a member of the SR family of proteins, TcSR, and of a putative SR-protein kinase, SRPK, in *Trypanosoma cruzi*). Portal, D., Espinosa, J., Lobo, G., Pereira, C., Alonso, G., Torres, H.N., Flawiá, M.M. INGEBI-CONICET. Vuelta de Obligado 2490. Buenos Aires, Argentina. mflawia@dna.uba.ar

En tripanosomátidos, los ARN mensajeros maduran mediante un mecanismo conocido como *trans-splicing*. Poco es lo que se conoce sobre los componentes de la maquinaria responsable de esta reacción.

Presentamos el clonado del primer miembro de la familia de proteínas SR, descrito en el parásito. La secuencia nucleotídica indica que el gen, denominado *tcsr*, posee dos dominios de unión a ARN (RRM1 y 2) así como un dominio RS, hacia el extremo C-terminal, característico de la familia. Ensayos de Southern blot, muestran que el gen está presente como una copia única, en el genoma del parásito.

En mamíferos, estas proteínas están involucradas en el reconocimiento de los sitios aceptores del *splicing* y su función esta modulada por fosforilación/defosforilación del dominio RS, por parte de una quinasa de proteínas específica, llamada SRPK. Esta, fosforila las serinas del dominio RS, permitiendo que las proteínas SR migren hacia los sitios de *splicing*.

Presentamos además, el clonado de una putativa quinasa de proteínas SR, que presenta una elevada homología con las de organismos superiores. Esta se encuentra como copia única, como lo demuestran ensayos de Southern blot.

336 - ACTIVIDAD DIFERENCIAL DE LA ARGININA QUINASA DE *Trypanosoma cruzi* DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO. (Differential arginine kinase activity during *Trypanosoma cruzi* growth phases) Alonso, GD*, Pereira, CA*, Cochella, L*, Remedi, MS*, Paveto, C*, Gerez de Burgos, NM*, Flawiá, MM* and Torres, HN*. INGEBI (UBA-CONICET). Buenos Aires, Argentina. *CEMECO. Facultad de Medicina. (UNC). Córdoba, Argentina. galonso@proteus.dna.uba.ar

En este trabajo se estudiaron las variaciones en los niveles de expresión de la arginina quinasa en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a lo largo de la curva de crecimiento. Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo entre la fosfoarginina y el ADP permitiendo la rápida regeneración del ATP en los momentos de mayor consumo energético. Los resultados obtenidos mostraron un continuo aumento de la actividad específica con el crecimiento del cultivo, alcanzándose la máxima diferencia entre los días 3 y 19 (7 veces). Este aumento fue acompañado por una variación en los niveles de arginina quinasa detectados en ensayos de Western blot, mas no se notaron variaciones en los niveles del ARNm correspondiente. El aumento en la actividad enzimática se correlaciona con variaciones en el medio de cultivo, tales como la disminución en la concentración de glucosa (agotándose en el día 9) y el aumento en el amoniaco derivado del catabolismo oxidativo de aminoácidos (3.3 veces entre los días 3 y 18). Nosotros proponemos que las condiciones de estrés energético en las etapas tardías del cultivo, ocasionan el consumo de las reservas de fosfoarginina, explicando de esta manera el aumento en la actividad específica observado.

337 - ANALISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P DE *T. CRUZI* A TRAVES DE CRISTALOGRAFIA DE RAYOS X Y OTROS METODOS: ESTUDIOS PRELIMINARES DE PLEGAMIENTO. Structural and functional analysis of ribosomal P proteins of *T. cruzi* using X Ray Crystallography and other methods: preliminary folding studies) Jury Ayub M*, Ghio S**, Gómez Barroso A*, Levin M** y Aguilar C*. *Univ. Nac. de San Luis, **INGEBI-CONICET.

Preliminary folding studies. Las proteínas ribosomales P forman una protuberancia (stalk) ubicada en la subunidad mayor de los ribosomas eucariotas. Esta estructura ha sido involucrada en la translocación durante la síntesis de proteínas e interviene en la actividad de los factores de elongación.

Aunque las proteínas del stalk eucariota y procariota parecen tener roles funcionales similares, no muestran identidad de secuencia y existen importantes diferencias estructurales entre ellas.

En el presente trabajo, se describe la expresión y purificación de las proteínas ribosomales de *T. cruzi* P0 y P2 β , como así también el estudio inicial de sus características estructurales y de plegamiento mediante PAGE en gradiente transversal de urea, PAGE nativo y proteólisis limitada.

TcP2 β se expresó en forma soluble y no mostró indicios de poseer una estructura terciaria definida. TcP0, por otro lado, fue hallada exclusivamente como cuerpos de inclusión y durante los ensayos de replegamiento mostró gran tendencia a la agregación. Electroforesis nativa y en gradiente transversal de urea mostraron que la forma responsable de esta agregación es el estado plegado de TcP0 y no un estado intermedio en la vía de plegamiento. Esta información fue utilizada para el replegamiento de la proteína con un alto rendimiento.

Agradecimientos: FONCyT; Sec. C. y T. U.N.S.L.

338 - ESTUDIOS SOBRE LA RELACION ESTRUCTURA-FUNCION DE AMINOTRANSFERASAS AROMATICAS (TATs). (Structure- function relationship studies in aromatic aminotransferases) Gabarain C., Sobrado V., Montemartini-Kalish M., Kalisz K., Hecht H.J. y Nowicki C. Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, Bs. As., Argentina y Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Alemania. (cnowicki@criba.edu.ar)

Trypanosoma cruzi posee una TAT que utiliza aminoácidos aromáticos, alanina, metionina y leucina. Los principales aceptores de los grupos α -amino son el piruvato y el 2-oxoisocaproato. La TAT de hígado de mamíferos con un 40.5% de identidad y 70 % de similitud respecto de la enzima de *T. cruzi* se diferencia de ella por su marcada especificidad por el par tirosina/2-oxoglutarato. Ambas enzimas comparten algunas propiedades fisicoquímicas evidenciadas en sus espectros de absorbancia, diroísmo circular y resistencia a la digestión con tripsina en condiciones nativas, distinguiéndose así de las ASATs. La estructura 3-D de la TAT del parásito obtenida por difracción de rayos X muestra un sitio activo con notorias diferencias respecto al de las ASATs, las enzimas mejor estudiadas en este sentido. Los residuos de arginina de ambas TATs correspondientes a la región de la Arg292 en las ASATs se mutaron por Glu en la TAT de *T. cruzi* y por Lys en la de los mamíferos. La mutante Arg283Glu mantuvo las mismas constantes cinéticas que la enzima natural, mientras que la Arg315Lys resultó completamente inactiva. Estos resultados sugieren que a pesar de las similitudes observadas entre las TATs de *T. cruzi* y la de hígado de mamíferos, la Arg283 de la TAT del parásito no participaría en la catálisis, en cambio en la TAT de mamíferos, al igual que en las ASATs, sería indispensable la presencia de un grupo guanidino en dicha posición. Por otra parte, en la TAT de mamíferos, la Cys140 parecería ser un residuo esencial para el proceso catalítico dado que la mutante Cys140Lys resulta completamente inactiva. En cambio, en la TAT de *T. cruzi*, ninguno de sus 20 residuos de cisteína puede observarse formando parte del sitio activo. Estas observaciones constituyen una primera aproximación tendiente a explicar las diferencias en la especificidad de sustrato de ambas enzimas la cual se refleja en su distinta función biológica.

339 - ESTUDIOS DE MUTAGENESIS DIRIGIDA Y MODE-LADO MOLECULAR DE LA DESHIDROGENASA DE L- α -HIDROXIACIDOS AROMATICOS (AHADH) DE EPIMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. (Site directed mutagenesis studies and molecular modelling of the aromatic L- α -hydroxy acids dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes). Vernal J.¹, Fisera.⁴, Sali M.⁴, Müller M.², Cazzulo J.J.² Y Nowicki C.¹ ¹Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, ²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de Gral. San Martín, Buenos Aires, Argentina. ³Biochemical Parasitology Laboratory, ⁴Molecular Modeling Department, Rockefeller University, New York, USA. (cnowicki@criba.edu.ar)

La AHADH de *T. cruzi* reduce los derivados aromáticos del ácido pirúvico, como el fenilpirúvico, a los correspondientes derivados del ácido láctico en una reacción acoplada a la oxidación de NADH. Puede reducir también, aunque con menor eficiencia, el 2-oxoisocaproato. Del alineamiento de la secuencia de la AHADH con las existentes en las bases de datos surge un 50-53 % de identidad con malato deshidrogenasas (MDHs) citosólicas; conservándose todos los residuos de aminoácidos reconocidos como esenciales en las MDHs, con excepción de la R102 (numeración de Eventoff), sustituida por alanina en la AHADH. La mutación R102A podría ser la responsable de que la AHADH no pueda reducir al oxalacetato ya que el residuo 102 se conoce como el determinante de la especificidad de sustrato en la familia de las deshidrogenasas de L- α -hidroxiácidos. Con el fin de confirmar que la similitud de la AHADH con las MDHs se refleja también en su aspecto funcional, se diseñaron las mutantes A102R, H195A y R171K. La primera de ellas permitió que la AHADH adquiriera capacidad de reducir oxalacetato sin perder su especificidad original. En cambio las mutantes H195A y R171K resultaron inactivas indicando que al igual que en las MDHs, la H168 formaría parte del par ácido-base involucrado en el mecanismo de catálisis y la R171 participaría de la interacción con el carboxilato del sustrato. Por otra parte, se construyó un modelo para la enzima del parásito utilizando las coordenadas depositadas en el banco de datos para las MDH citosólica de cerdo y la MDH de *E. coli*. En base al modelo teórico y con el fin de obtener evidencias experimentales sobre los residuos del sitio activo determinantes de la especificidad de la AHADH se diseñaron las siguientes mutantes: Y237G, I239V, Y239G/I239V, A102R/Y237G A102R/I239V y A102R/Y237G/I239V. El análisis de las constantes cinéticas para los distintos sustratos mostró que la Y237 participa, de acuerdo al modelo molecular, en la correcta ubicación del fenilpiruvato en el sitio activo, con una menor relevancia en la unión del p-hidroxifenilpiruvato y 2-oxoisocaproato.

340 - CLONADO Y SECUENCIACION DEL GEN DE LA ISOFORMA CITOSOLICA DE MALATO DESHIDROGENASA (MDH) DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*. (Cloning and sequencing of the cytosolic malate dehydrogenase gene from *Trypanosoma brucei*). Vernal J.¹, Muñoz J.², Müller M.³, Cazzulo J.J.² Y Nowicki C.¹ ¹Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA, ²Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de Gral. San Martín, Buenos Aires, Argentina, ³Biochemical Parasitology Laboratory, ⁴Molecular Parasitology Laboratory, Rockefeller University, NY, USA. (cnowicki@criba.edu.ar)

A diferencia de lo que se describió en *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* posee una isoforma citosólica de MDH adicional a las isoenzimas glicosomal y mitocondrial. Estas dos últimas han sido clonadas y secuenciadas; en cambio no se posee ninguna información respecto a la MDH citosólica. Por otra parte, en los tripanosomas africanos, Stibbs y Seed fueron los primeros en detectar un activo catabolismo de aminoácidos aromáticos, que se refleja en una abundante excreción de derivados aromáticos de lactato y piruvato. Estos metabolitos alcanzan altas concentraciones en la orina de los huéspedes mamíferos infectados. En *T. cruzi* es la deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos (AHADH), una enzima vinculada a la familia de las MDHs, la responsable de la formación de los derivados aromáticos del ácido láctico. En cambio en los tripanosomas africanos no se identificó ni caracterizó a la enzima responsable de la formación de estos catabolitos. Por estas razones encaramos la búsqueda de los genes que codificarían para una deshidrogenasa de L- α -hidroxiácidos aromáticos y para la MDH citosólica en *T. brucei*. Aquí presentamos la secuencia del gen que codifica para la cMDH y la caracterización de la proteína recombinante. Nos basamos en secuencias encontradas en bancos de datos vinculados al proyecto genoma de *T. brucei* que presentaban alta homología con la AHADH de *T. cruzi*. Empleando reacciones de retrotranscripción seguidas de PCR, se pudo obtener el marco de lectura abierto completo que codificaría para una proteína de 328 aminoácidos, con alta homología con cMDHs y 71% de identidad con la AHADH de *T. cruzi*. La expresión de la proteína recombinante en cultivos de *E. coli* mostró que se trata de una típica MDH, con alta afinidad por oxaloacetato (Km de 20,2 μ M) e incapaz de reducir derivados aromáticos del ácido pirúvico. La ausencia de una secuencia codificante para un péptido señal en el N-terminal y del tripéptido C-terminal para localización glicosomal, es una fuerte evidencia adicional a favor de su ubicación citosólica.

341 - ANALISIS DE LA ACTIVIDAD COLESTEROL-DESATURASA EN CELULAS VIVAS Y EN HOMOGENATOS DE *Tetrahymena thermophila*: CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS METABOLICOS (Cholesterol-desaturase activity in *Tetrahymena thermophila* cells and cell free extracts: characterization of the metabolic products) Muñoz, L.; Valcarce, G.; Nudel, B.C. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Junín 956 (1513) Buenos Aires, Argentina

El protozoo *Tetrahymena thermophila* metaboliza esteroides mediante desaturaciones sucesivas, transformándolos en derivados de provitamina D. Con el objeto de caracterizar el sistema colesterol-desaturasa se hicieron ensayos *in vivo* cultivando el microorganismo en presencia de [¹⁴C] o [³H] colesterol y se analizaron los productos formados a distintos tiempos de cultivo. La evaluación cinética del proceso reveló un desplazamiento progresivo de los esteroides formados que involucra al $\Delta 7$ y al $\Delta 7,22$ bis dehidrocolesterol, al mismo tiempo que progresa el consumo de colesterol. También se han aislado otros productos cuya identificación por GC-MS se encuentra en estudio. En todos los casos los lípidos se analizaron mediante saponificación, extracción y posterior separación e identificación por TLC y revelado por radioautografía o bien por HPLC y posterior recuento en contador de centelleo líquido, comparándose con patrones. También se ensayó el proceso de biotransformación del colesterol con un homogenato celular. Para ello las células de *Tetrahymena* se cultivaron durante 24 horas, se cosecharon, lavaron y sonicarón. En esta instancia se agregó [¹⁴C] o [³H] colesterol, junto con cofactores que pudiesen ser requeridos (ATP, NAD(P) y sus formas reducidas) para luego de una incubación, extraer los lípidos celulares y revelarlos por las técnicas descriptas. Si bien se llegó a apreciar una capacidad biotransformante sobre colesterol, con formación exclusiva de $\Delta 7$ -dehidrocolesterol, la misma fue muy leve.

**342 - PERFILES DE AUTOINDUCCION EN AISLAMIEN-
TOS DE *ACINETOBACTER SP.* HOSPITALARIOS** (Autoinduction profiles in *Acinetobacter sp* isolates from hospitals). González, R.H., Martínez, D., Nudel C.B. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 965 6° piso (1113) Buenos Aires, Argentina

La regulación de la expresión genética mediada por autoinductores es conocida en varias especies de bacterias Gram negativas e involucra compuestos del tipo Acil-homoserinolactonas (AHL), aunque también se han descripto quinonas y péptidos cíclicos con actividad similar aunque con menor potencia. Las funciones reguladas por este mecanismo son muy variadas y van desde la expresión de genes asociados a luminiscencia (*Vibrio harveyi*) a la producción de factores de virulencia (*Pseudomonas aeruginosa*). Para este estudio se seleccionaron 10 aislamientos de *Acinetobacter sp.* obtenidos de brotes intrahospitalarios y se efectuaron cultivos en distintos medios para su análisis utilizando 2 cepas de reporte: *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZLR4) con la capacidad de revelar la presencia de una amplia variedad de autoinductores y *Chromobacterium violaceum* CV026 que responde a AHL de cadena corta (C4 y C6 HSL). Los sobrenadantes de cultivo se extrajeron en acetato de etilo o cloruro de metileno, se separaron por TLC y se revelaron con las cepas de reporte. Se observó la producción de al menos dos inductores en cada aislamiento, con diferente movilidad según el tipo de aislamiento y las condiciones de cultivo. Se observó también una dependencia de la producción con la fase de crecimiento, siendo máxima en la fase logarítmica tardía y estacionaria de los cultivos.

Dada la multiplicidad y variedad de los autoinductores aislados podría sugerirse su utilización en estudios epidemiológicos.

343 - IDENTIFICACION DE UN HOMOLOGO DE SINTAXINA INVOLUCRADO EN LA SECRECION REGULADA DE PROTEINAS DURANTE LA FORMACION DE LA PARED DEL QUISTE EN *GIARDIA LAMBLIA*. Touz, MC, Nores, MJ; Lujan, HD. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

El enquistamiento en *Giardia* es un proceso de adaptación celular que exige la producción, procesamiento y transporte intracelular de los materiales constituyentes de la pared del quiste, para ser luego ensamblados extracelularmente. *Giardia* carece del aparato de Golgi, una organela fundamental para el transporte de materiales de secreción en eucariotas, pero el transporte, distribución y secreción de proteínas ocurre normalmente en este parásito. En contraste, durante el enquistamiento se manifiesta la inducción del aparato de Golgi y de gránulos de secreción. El anticuerpo monoclonal 3B5 reconoce un antígeno presente tanto en los gránulos como en la membrana plasmática de trofozoítos en proceso de enquistamiento. El escrutinio de una genoteca de ADN complementario y posterior análisis genómico, nos permitió obtener la secuencia completa del gen cuyo producto es reconocido por 3B5. Este codifica para una proteína con una alta homología con Sintaxina. Las Sintaxinas componen el complejo de fusión (SNARE) descrito en organismos más evolucionados. Siendo *Giardia* la célula eucariota más primitiva que se conoce, la presencia de Sintaxina y su participación en el mecanismo de secreción regulada que conduce a la formación de la pared del quiste en este organismo demuestra la alta conservación evolutiva de los procesos de transporte intracelular en eucariotas.

344 - LA ACCION DE UNA CISTEIN PROTEASA INTRACELULAR ES INDISPENSABLE EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION CELULAR DE *GIARDIA LAMBLIA*. Touz, MC; Coronel, CE; Lujan HD. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

Para sobrevivir fuera del intestino del huésped *Giardia lamblia* sufre un proceso de diferenciación llamado enquistamiento. Previamente identificamos y caracterizamos dos proteínas que forman parte de la pared del quiste: CWP1 (26 kDa) y CWP2 (39 kDa) y que tienen una gran homología en una región de 26 kDa. El anticuerpo monoclonal que reconoce CWP2 detecta una proteína de 39 kDa en gránulos de secreción purificados pero sólo una proteína de 26 kDa en paredes quísticas, indicando que CWP2 sufre un procesamiento proteolítico durante la formación de la pared del quiste. Nuestros resultados indican que una cisteín proteasa intracelular unida a membrana, cuya actividad se incrementa durante el enquistamiento de manera similar a las CWPs, está involucrada en este procesamiento. La secuencia del gen que codifica para esta proteasa, a la que llamamos ESCP (Encystation-Specific Cysteine-Protease), tiene homología con Catepsinas C lisosomales, pero presenta un dominio transmembrana ausente en estas proteasas. Análisis de actividad indicaron que ESCP actúa específicamente sobre CWP2, lo que demostraría por primera vez la actividad endopeptidasa de una Catepsina C sobre un sustrato natural. Estos resultados demuestran que ESCP es la proteasa involucrada en el procesamiento de CWP2 y que su actividad durante el enquistamiento es indispensable para la formación de la pared del quiste.

345 - IDENTIFICACION DE UNA PROTEINA DE UNION A ADN INVOLUCRADA EN LA EXPRESION DE GENES ESPECIFICOS DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DEL PROTOZOARIO INTESTINAL *GIARDIA LAMBLIA*. Nores, MJ; Touz, MC; Lujan, HD. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. hlujan@biomed.uncor.edu

Los trofozoítos de *Giardia* son incapaces de sintetizar colesterol y deben captar esta molécula del lumen del intestino superior. El enquistamiento de *Giardia* es un proceso de adaptación celular que ocurre ante la falta de colesterol que enfrenta el parásito en las partes más bajas del intestino. Para estudiar la regulación de la expresión génica en este proceso realizamos el escrutinio de una genoteca de expresión de ADN complementario, utilizando: anticuerpos policlonales generados contra trofozoítos en proceso de enquistamiento y fragmentos de 120 pb marcados radioactivamente correspondientes a las regiones 5' no transcritas de los genes *cwp1* y *cwp2*, los cuales codifican para dos proteínas componentes de la pared quística. Mediante ambas estrategias identificamos una proteína que une ADN y que es codificada por un gen previamente caracterizado en *Giardia* (ORF-C4) cuya función era desconocida. La expresión de este gen se induce durante el enquistamiento y codifica para una proteína de 22 kDa que posee dominios presentes en proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica en otros organismos, tales como supresina, myc y DEAF-1. Estudios en curso nos permitirán determinar la función de esta proteína en el mecanismo de control de la transcripción mediado por colesterol durante la diferenciación de *Giardia*.

346 - IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA DIPEPTIDIL PEPTIDASA NECESARIA PARA LA EXPRESION GENICA ESPECIFICA DURANTE DIFERENCIACION A QUISTE DE TROFOZOITOS DE *GIARDIA LAMBLIA*. Touz, MC¹; Piacenza, L²; Acosta, D²; Carmona, C²; Lujan, HD¹. ¹Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. ²Instituto de Higiene. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. hlujan@biomed.uncor.edu

El proceso de diferenciación de trofozoíto a quiste de *Giardia* es un mecanismo de adaptación necesario para la supervivencia del parásito. Uno de nuestros objetivos es el estudio de los eventos involucrados en la expresión génica diferencial que ocurre en este proceso, particularmente la de dos glicoproteínas de la pared del quiste (CWP). Cuando se agrega al medio de enquistamiento un inhibidor de aminopeptidasas (Bestatina) se inhibe la expresión de CWPs, no se generan gránulos de secreción y no hay formación de quistes. Por afinidad a una columna de Bestatina dos proteínas (87 y 58 kDa) fueron purificadas, microsecuenciadas y con las sondas generadas se realizó el escrutinio de genotecas obteniendo la secuencia completa del gen. Este predice una proteína de 87 kDa (que incluye el péptido de 58 kDa) que presenta una gran homología con dipeptidilpeptidasa IV. Los resultados obtenidos indican que esta enzima participaría en la regulación de la expresión génica diferencial durante el enquistamiento y que, al ser indispensable para la formación de la pared del quiste, puede ser un importante blanco para la acción de agentes terapéuticos que impidan la diferenciación y con ello la transmisión de este importante patógeno intestinal.

347 - PRESENCIA DE UNA PROTEINA-COBAMIDA EN EL TRIPANOSOMATIDO CRITHIDIA FASCICULATA (Presence of a cobamide-protein in the trypanosomatide *Crithidia fasciculata*). Catalano, P.N., Capelluto, D., Cazzulo, J.J.*. Cannata, J.J.B. Centro de Investigaciones Bioenergéticas (CIBIERG), Fac. de Medicina, UBA-CONICET, Buenos Aires; *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de General San Martín, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. jcannata@fmed.uba.ar

Hemos podido detectar la presencia en el tripanosomátido *C. fasciculata*, de una proteína asociada a una de las denominadas coenzimas B12. La misma ha sido purificada hasta casi homogeneidad proteica mediante un protocolo que incluye sucesivas cromatografías en columnas de DEAE-celulosa, fenil sepharosa e hidroxilapatita. El peso molecular de la proteína nativa determinado por el método de Andrews utilizando una columna convenientemente calibrada de BiosilSEC 250 fue de 15.1 kD el cual coincide con el determinado por SDS-PAGE. La proteína purificada exhibe el intenso y característico color rosado de este tipo de proteínas y presenta un espectro de absorción con un máximo prominente a 412 nm. y otros dos menores a 525 y 555 nm. respectivamente. Si bien todavía no ha podido ser identificada, su sola presencia en dicho microorganismo reviste particular interés, dado que es la primera vez que se informa la existencia de una proteína- cobamida en un tripanosomátido. Este trabajo fue realizado con un subsidio de la Universidad de Buenos Aires.

348 - MOVILIZACION DE CALCIO EN *Trypanosoma cruzi* ESTIMULADO POR CARBACOL. POSIBLE PAPEL DE UN INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ (*Trypanosoma cruzi* calcium mobilization stimulated by carbacol. Possible role of Na^+/H^+ exchange). Bollo, M. y Machado-Domenech, E. Dpto. Biología Molecular, FCEQON. UNRC. Río Cuarto. Argentina. CONICET, CONICOR, FONCYT, SECYT (UNRC).

En los tripanosomátidos, el intercambiador Na^+/H^+ forma parte del sistema de transporte de calcio de los acidocalcisomas. En otro tipo de células, este intercambiador es una fosfoproteína susceptible a ser regulada por PKC. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, carbacol promueve la activación de PLC y movilización de calcio desde reservorios intracelulares. Los cambios en los niveles de IP_3 y $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por carbacol son afectados de manera contraria por el éster de forbol TPA y por la ausencia de sodio del medio externo. Así, mientras que bajo esta última condición la señal de calcio disminuye, los cambios de IP_3 no varían. Inversamente, TPA anula el aumento de IP_3 y no afecta la movilización de calcio. Por ello, se decidió estudiar una posible participación del transportador mencionado en la señal de calcio en *T. cruzi*. Las mediciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizaron con formas epimastigotes del parásito cargados con Fura2-AM. Los resultados indican que monensina, ionóforo de Na^+/H^+ , indujo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en ausencia de Ca^{2+} y Na^+ extracelular. Además, en presencia de EIPA (N-etil-N-isopropil) amiloride, inhibidor del intercambiador, se observó que la señal de calcio inducida por carbacol estuvo significativamente disminuida. Estos resultados sugieren que en el mecanismo por el cual carbacol induce la movilización de calcio participaría un intercambiador Na^+/H^+ de reservorios intracelulares de epimastigotes de *T. cruzi*.

349 - CICLO DEL FOSFATIDILINOSITOL EN *TRYPANOSOMA CRUZI*: EFECTO DEL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF) (Phosphatidylinositol cycle in *Trypanosoma cruzi*: effect of platelets activating factor). Beassoni, P., Garrido, M.N. y Machado-Domenech, E.E. Dpto. Biología Molecular, F.C.E.F.Q.N. UNRC. 5800, Río Cuarto (Cba), Argentina. CONICOR, CONICET.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la participación del ciclo del fosfatidilinositol en *Trypanosoma cruzi* luego de una estimulación con el factor activador de plaquetas (PAF: 1-O-alkil-2-acetil-sn-gliceril-3-fosfatidil colina), sustancia relacionada con procesos fisiopatológicos y a la que el parásito puede enfrentarse durante una infección. Para ello, formas epimastigotes de *T. cruzi* de 6 días de crecimiento (fase logarítmica) fueron incubadas con $[\text{H}^3]$ -myo-Inositol durante 12 hs. y/o con $[\text{P}^{32}]\text{-Pi}$ durante 3 hs. a 28 °C. La estimulación se llevó a cabo a 28 °C en buffer KRT durante diversos tiempos y en un rango de concentraciones de 5-500 nM. Los lípidos extraídos se resolvieron y analizaron por cromatografía en capa delgada y posterior autorradiografía. Los inositoles solubles se separaron y analizaron por columnas de intercambio iónico. Los valores de las muestras obtenidas y cuantificadas por centelleo líquido se expresaron como porcentaje del control sin estimular. La estimulación de los parásitos por períodos de hasta 15 min. con 5 nM del agonista provocó variaciones en los metabolitos solubles y en el recambio fosfolipídico. Se observaron incrementos de 25-30% en IP_3 e IP_2 y de 100% en IP_1 . Las variaciones significativas observadas en el recambio fosfolipídico fueron disminuciones de 20-30% en PIP_2 a los 30 segundos y en PC y PA a los 2,5 y 11 minutos de estimulación respectivamente. Los resultados demuestran que *Trypanosoma cruzi* es capaz de responder al estímulo de PAF mediante la activación de una vía de señales que involucra a la PIP_2 -PLC y sugieren la participación de otras fosfolipasas en esta respuesta celular.

350 - ACCION REGULATORIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD HEXOQUINASA Y GLICEROL-3-FOSFATO DESHIDROGENASA EN INSECTOS VECTORES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*. (The regulatory action of temperature on hexokinase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase from vector insects of *Trypanosoma cruzi*). Scaraffia, P.Y. and Gerez de Burgos, N.M. Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Córdoba, Argentina.

In our laboratory we have demonstrated enzymatic and ultrastructural changes in thoracic muscles of *Dipetalogaster maximus* and *Triatoma infestans* during the later stages of metamorphosis. The development of flying ability is accompanied by morphological and biochemical adaptations of the muscles involved in that activity. Hexokinase (HK) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) are two of the enzymes showing most important increase of activity from the nymphal to the adult stages. We have now analyzed the effect of temperature on HK and GPDH of flight muscle from *D. maximus* and *T. infestans*. Starch gel electrophoretic patterns showed a single band with HK and GPDH activities. Both enzymes exhibited a Michaelian behavior. V_{max} , catalytic efficiency and K_m were incremented as temperature increased from 20 to 37°C. The enzymes showed inhibition by high concentrations of substrates (ATP for HK and DHAP for GPDH), which is dependent on temperature. The strong inhibition by substrates detected at 20°C almost disappeared at 37°C. The capacity of muscles to phosphorylate glucose and the operation of the glycerophosphate shuttle would be more efficient at 37°C. Therefore, temperature appears to exert a regulatory action on HK and GPDH by modulating the inhibition produced by substrates. ATP production would be promoted when temperature rises from 30° to 37°C. Because insect thoracic muscles increase their temperature over 30°C during flight, this phenomenon would indicate a mechanism enhancing energy supply for muscle activity.

351 - LA VIA DE LAS PENTOSAS FOSFATO EN *TRYPANOSOMA CRUZI* Y *LEISHMANIA MEXICANA*. (The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*). **Maugeri, D.**, Igoillo Esteve, M., Franke de Cazzulo, B.M. y Cazzulo, J.J. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

En muchos organismos la glucosa es catabolizada a través de dos vías principales, la vía glicolítica de Embden y Meyerhof (EM), cuya finalidad es energética, y la vía de las pentosas fosfato (PP), cuya finalidad es biosintética, a través de la producción de ribosa-5P para la síntesis de ácidos nucleicos y NADPH para vías biosintéticas reductivas. Se ha sugerido también que el NADPH generado por el PP podría jugar un papel importante en la protección contra el stress oxidativo en algunos Protozoarios. El papel que juega el PP en los Trypanosomatidos no está aún bien definido, y la vía ha sido muy poco estudiada, a diferencia de la EM, tanto en *Trypanosoma cruzi* como en *Leishmania* spp. Hemos comenzado una evaluación de la presencia y relevancia del PP en *T. cruzi* y *L. mexicana*, tanto en condiciones basales como de stress oxidativo. Según experimentos metabólicos llevados a cabo con glucosa marcada con ¹⁴C en C1 o C6, la PP es operativa en ambos parásitos, y el consumo de glucosa a través de la misma aumenta de 2 a 4 veces en condiciones de stress oxidativo inducido por azul de metileno 0.2 mM. Experimentos de localización subcelular con digitonina sugieren que todas las enzimas del PP, detectadas en ambos parásitos, son esencialmente citosólicas, con una probable localización glicosomal muy minoritaria en algunos casos. Estamos purificando la glucosa-6PDH y la 6-PgluconatoDH de *T. cruzi*, cepa Tul 2, para completar su caracterización. Estos estudios se han visto dificultados por la marcada inestabilidad de ambas enzimas.

352 - EXPRESION DE CRUZIPAINA MADURA ACTIVA EN EL SISTEMA BACULOVIRUS - CELULAS DE INSECTO (Expression of active mature cruzipain in the baculovirus - insect cells system). **Alvarez, V.**, Parussini, F. y Cazzulo, J.J. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, 1650 San Martín, Buenos Aires, Argentina.

La cruzipaina (Cr) es la principal cisteína proteinasa (CP) de *Trypanosoma cruzi*. La Cr madura consta de un dominio catalítico, con alta homología con CPs de la familia de la papaína, y un dominio C-terminal (CT) que caracteriza a las CPs de Tipo I de Trypanosomatidos. Si bien se conoce la estructura 3-D de una forma truncada del dominio catalítico (cruzapaina), no hay hasta ahora datos estructurales sobre el CT y la relación entre ambos dominios. Ello se debe en buena medida a que hasta ahora no había sido posible expresar Cr activa conteniendo el CT, pues el mismo es procesado por los sistemas bacterianos, probablemente por la falta de modificaciones post-traduccionales. Hemos expresado Cr en el sistema eucariótico de células de insecto (Sf 21) - baculovirus, que permite, en general, altos niveles de expresión heteróloga con plegamiento y localización correctos. Lisados de células infectadas con el baculovirus recombinante, estudiados por SDS-PAGE seguido de Western blot, mostraron una única banda reconocida por el suero anti-Cr natural, con un Mr similar. Geles de SDS-PAGE con gelatina incorporada indicaron una única banda de actividad, también con movilidad similar a la de la Cr natural. La Cr recombinante fue purificada por cromatografía de quelatos metálicos, y está siendo caracterizada en comparación con la enzima natural. Toda la evidencia obtenida sugiere que la Cr recombinante contiene el CT, y puede esperarse, por lo tanto, que sea utilizable para intentar su cristalización y determinación de estructura 3-D.

353 - ENFERMEDAD DE CHAGAS: A LA BUSQUEDA DE UNA ESTRATEGIA TERAPEUTICA DIFERENTE. II. FINGERPRINT DE PROTEINAS PLASMATICAS EN TRANSPORTADORES LIPOSOMALES DE BENZNIDAZOL (BNZ), ETANIDAZOL (ETZ), Y MISONIDAZOL (MSZ). (Chagas disease: searching for a different therapeutic strategy. II. Plasma protein fingerprint on the surface of benznidazole (bnz), etanidazole (etz) and misonidazole (msz) liposomal carriers.). **Morilla, M.J.**, Venier M.C., Montanari, A., Benavidez P., Romero E. y Bakas, L.*. Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), Saenz Peña 180, Bernal 1876, Buenos Aires, Argentina. elromero@unq.edu.ar. * INIBIOLP, Facultad de Ciencias Medicas, UNLP.

La elevada permeabilidad vascular asociada a zonas invadidas por el *Trypanosoma cruzi*, permite planear la utilización de transportadores particulados de drogas, que aumentarían sustancialmente el índice terapéutico de drogas tradicionalmente tóxicas, como BNZ. En el presente trabajo hemos determinado los fingerprint de proteínas plasmáticas humanas a formulaciones liposomales de BNZ, MSZ y ETZ-drogas hidrofóbica, parcial y totalmente hidrofílica, respectivamente. El aislamiento de las proteínas unidas a las vesículas del resto de las proteínas libre -paso crítico- se llevó a cabo por ultracentrifugación a 150.000 g en tubos Ultra-clear en rotores SW-40Ti, una hora a 20 °C, en medio iodinado isotónico con el plasma humano. Luego de ser delipidadas, las proteínas fueron analizadas por electroforesis bidimensional y reveladas por tinción de plata. Los distintos fingerprint obtenidos son el primer paso para establecer una relación estructura del transportador-naturaleza del ligando proteico adsorbido. Esto habilitará el diseño de vesículas transportadoras endocitables, por adsorción a su superficie de ligandos para receptores endocíticos situados por ej., en cardiomiocitos infectados crónicamente.

354 - ESTUDIO DE LA FUNCION DE LA ARGININA QUINASA EN EL METABOLISMO DEL *Trypanosoma cruzi*. (Functional study of the arginine kinase in the *Trypanosoma cruzi* metabolism) **Ivaldi, M.S.**, Alonso, G.D.; Pereira, C.A.; Cochella, L.; Portal, D.; Flawiá, M.M. y Torres, H.N. INGEPI (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina. torres@proteus.dna.uba.ar

En nuestro laboratorio se caracterizó bioquímica y molecularmente la enzima arginina quinasa de *Trypanosoma cruzi*. Esta enzima cataliza la síntesis del fosfágeno fosfoarginina, que actúa como un reservorio intracelular de energía permitiendo la rápida resíntesis de ATP. Dado que la arginina quinasa es una enzima diferencial entre el parásito y el hospedador mamífero, el objetivo de este trabajo es determinar si es esencial para la viabilidad del parásito constituyéndose de esta manera en un posible blanco terapéutico. Para ello se obtuvieron transfectantes estables de epimastigotes de la cepa CL Brener, en los cuales la arginina quinasa fue sobre-expresada o parcialmente anulada, utilizándose un vector de expresión específico de *T. cruzi* (pTREX). La sobre-expresión y supresión funcional de la arginina quinasa se analizaron por medio de ensayos de actividad enzimática, Northern y Western blots. Una vez validado el modelo, se estudiará como las fluctuaciones en los niveles de arginina quinasa afectan aquellos procesos de mayor demanda energética como el tiempo de duplicación y la cinética de crecimiento. Además podrá usarse este modelo para investigar el rol de esta enzima en otros procesos importantes en el ciclo de vida del parásito como la diferenciación, invasión y motilidad celular.

355 - INMUNOGLOBULINAS Y FERTILIDAD EN QUISTES HIDATIDICOS DE *Echinococcus granulosus*. Paredes, R., Galindo, M. y Galanti, N. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. I.C.B.M., Facultad de Medicina, Universidad de Chile

En Chile la hidatidosis es considerada la segunda parasitosis más importante, y a nivel mundial posee un impacto similar. Se describen dos tipos quistes hidatídicos; los fértiles que generan protoescolices (forma infectiva) y los infértiles que no continúan con el ciclo.

Algunos antecedentes sugieren que el sistema inmune del hospedero podría regular la infección de este parásito y modular la fertilidad de los quistes hidatídicos. Para esto se desarrolló la búsqueda de Inmunoglobulinas (Ig) en capa germinal y protoescolices de quistes fértiles y capa germinal de quistes infértiles de bovino, utilizando SDS-PAGE y microsecuenciación aminoacídica. Se identificó una proteína que está solo presente en capa germinal infértil, presenta un peso molecular de 27 kDa y cuyo análisis aminoacídico la identifica como un fragmento de cadena liviana de Ig.

El análisis de la síntesis de proteínas en capa germinal infértil; mediante la incorporación de metionina- S^{35} y análisis fluorográfico indica que esta proteína de 27 kDa no es sintetizada por el parásito. Además, utilizando la metodología clásica de purificación de Ig mediante la precipitación con sulfato de amonio, se determinó la presencia de Ig en líquido hidatídico de quiste infértil. Finalmente mediante inmunocitoquímica y utilizando anticuerpo anti IgG bovino, se localizó IgG asociada a la capa germinal del quiste hidatídico infértil.

Se concluye que la capa germinal de quiste hidatídico infértil presenta una proteína de 27 kDa que correspondería a un fragmento de Ig del hospedero.

Así se postula que existe una respuesta inmunológica por parte del hospedero que Inmunoglobulinas tendrían un rol fundamental en la determinación de la fertilidad en quistes hidatídicos.

Financiado por proyectos: Fondecyt N° 1970766, Andes-Antorcha-Vitae, SAREC, DID-U. de Chile I013/2.

ENZIMOLOGIA

356 - PROTEO-OLIGOGLUCANO CON ACTIVIDAD AUTOGLUCOSILTRANSFERASA AISLADO DE PROTEOGLUCOGENO ISOAMILOLIZADO (Proteo-oligoglucan with autoglucosyltransferase activity isolated from isoamylolysed proteoglycogen) Romero J.M. y Curtino J.A., CIQUIBIC-Departamento de Química Biológica "Dr. Ranwel Caputto", Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000 Córdoba. E-mail: jcurtino@dqbfq.uncor.edu

Por amilólisis con mezcla de α -amilasa y amiloglucosidasa del proteoglucógeno (Pgno) purificado de músculo de conejo se libera la porción glucogenina, de Mr 38 kDa (Gnna-38), que es aislada por columna de Q Sepharosa. La enzima se autoglucosila por incubación con UDP-glucosa y iones manganeso. También transglucosila aceptores exógenos como el dodecil- β -maltósido (DBM). Cuando la porción polisacárido es degradada con isoamilasa durante corto tiempo, se aísla glucogenina unida a una porción oligoglucano que le disminuye la movilidad en SDS-PAGE, migrando con Mr 45 kDa. Esta oligoglucano-gnna (Gnna-45) glucosila DBM y muestra actividad autoglucosiltransferasa. Por digestión más prolongada con isoamilasa se aísla una forma de Gnna que migra como una banda más ancha que la Gnna-38, que correspondería al conjugado con la única rama (rama C) que queda unida a la enzima luego de la desramificación total del polisacárido. Esta forma de la glucogenina (Gnna-ramaC) posee también actividad de auto- y transglucosilación. Los controles indican que la preparación de isoamilasa utilizada no posee α -amilasa o glucosidasa contaminante. Se demuestra además que, al igual que α -amilasa y amiloglucosidasa, la isoamilasa no hidroliza la unión tirosina-oligoglucano. Se concluye que la Gnna posee capacidad para autoglucosilarse cuando se halle unida a un oligoglucano de mayor grado de polimerización que las 8 a 11 glucosas descritas por otros autores como su máximo límite de autoglucosilación.

357 - REGULACION DE LA ATPasa SOLUBLE MITOCONDRIAL (F_1) POR ANIONES (Anion regulation of the mitochondrial F_1 -ATPase) Lodeyro, A.F., Poletti, A. y Roveri, O.A. Area Biofísica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Suipacha 531 (2000) Rosario, ARGENTINA. alodeyro@fbioyf.unr.edu.ar

Bicarbonato activa la hidrólisis e inhibe la síntesis de ATP catalizadas por la ATPasa mitocondrial. Recientemente hemos postulado que el anión actúa a nivel de un sitio no catalítico de unión de nucleótidos el cual debería estar ocupado por ADP en el ciclo catalítico correspondiente a la síntesis de ATP y libre u ocupado por ATP en la reacción inversa (hidrólisis de ATP). Ha sido postulado que sulfato, anión que inhibe la hidrólisis de ATP, ejercería su acción uniéndose al mismo sitio. Aquí informamos resultados obtenidos al realizar un estudio cinético del efecto de sulfato sobre la hidrólisis de ATP catalizada por F_1 , como una primera etapa de un estudio comparativo del efecto de ambos aniones orientado a determinar el mecanismo y sitio de acción de los mismos.

La inhibición por sulfato sigue una compleja dependencia con la [ATP]. A bajas [ATP] sulfato se comporta como anión competitivo parcial. La inhibición disminuye hasta 10 - 20 μ M ATP, concentración a partir de la cual comienza a aumentar. A altas [ATP] la inhibición es también competitiva parcial, pero la inhibición no aumenta de manera hiperbólica con la $[SO_4^{2-}]$, lo cual podría ser explicado postulando la existencia de más de un sitio de unión para sulfato.

CON SUBSIDIO DE LA UNR

358 - BIOTRANSFORMACION ANAEROBIA DEL ETANOL A RADICALES LIBRES 1-HIDROXIETILO Y ACETALDEHIDO MEDIADA POR CITOCROMO P450 REDUCTASA (Cytochrome P450 reductase-mediated anaerobic biotransformation of ethanol to 1-hydroxyethyl free radicals and acetaldehyde). Díaz Gómez, M.I.; Castro, G.D.; Delgado de Layño, A.M.A.; Costantini, M.H. y Castro, J.A.. Centro de Investigaciones Toxicológicas (CEITOX)-CITEFA/CONICET. J.B. de La Salle 4397, (1603) Villa Martelli. Buenos Aires. e-mail: ceitox@dd.com.ar. (subsidiado por CONICET).

En este trabajo se estudió la capacidad de la citocromo P-450 reductasa para metabolizar el etanol (EtOH) a acetaldehído (AC) y radicales libres 1-hidroxietilo (1-HEt) en medio anaerobio. La determinación de AC se llevó a cabo mediante análisis por GC-FID del espacio-cabeza de las mezclas de incubación. La formación de 1-HEt se estableció mediante análisis por GC-MS del aducto formado entre el radical y el compuesto "spin trap" PBN. Los resultados muestran que la P450 reductasa humana pura es capaz de biotransformar el EtOH a AC y 1-HEt en un proceso que es dependiente del NADPH bajo una atmósfera de nitrógeno libre de oxígeno. El FAD puro en presencia de NADPH fue capaz de generar AC y 1-HEt a partir de etanol. Mezclas de incubación anaerobia conteniendo ya sea microsomas de hígado de rata o núcleos altamente purificados fueron capaces de biotransformar EtOH a AC y 1-HEt en presencia de NADPH. Estos procesos fueron inhibidos por el anticuerpo contra la P450 reductasa de microsomas de hígado de rata. Los resultados muestran que las formas semiquinona de la flavina en la P450 reductasa pueden biotransformar al EtOH. Estas reacciones pueden tener importancia en tejidos donde la P450 reductasa está presente, en ausencia de formas específicas del P450 que se sabe que están involucradas en el metabolismo del EtOH (Ej. CYP2E1).

359 - INHIBIDOR ENZIMATICO EN EL CALOSTRO BOVINO (enzymatic inhibitor in the bovine colostrum). Villegas L.B., Ponce A. M, Segovia R.F. Universidad Nacional de San Luis. Argentina.

El calostro bovino, es la secreción de las glándulas mamarias antes e inmediatamente después del parto. Su composición difiere mucho de la leche normal, siendo la única fuente de inmunoglobulinas o anticuerpos para los terneros, ya que no poseen pasaje transplacentario y son incapaces de sintetizar los propios. La vida de los neonatos depende de la adecuada transferencia pasiva de los anticuerpos calostrales, que se consigue por la administración adecuada de calostros de alta calidad.

Los anticuerpos por ser de naturaleza proteica se hidrolizan enzimáticamente en el tubo gastrointestinal. Gracias a las propiedades del sistema digestivo de los terneros al nacer, los anticuerpos calostrales son absorbidos completos.

Usando técnicas de Biuret modificado y electroforesis SDS-PAGE se analizaron los cambios proteicos cuantitativos y cualitativos del suero calostroal, lácteo y sanguíneo materno. Los resultados muestran la elevada concentración proteica que posee el primero y su gran similitud con el suero sanguíneo.

Realizando mediciones colorimétricas de actividad enzimáticas se verificó la fuerte inhibición que el calostro ocasiona sobre tripsina, demostrándose así la activa participación del mismo en la inmunidad pasiva del neonato. Se conoce que la α_1 antitripsina (AAT) sanguínea es capaz de neutralizar la actividad de la tripsina y de otras proteasas. Podríamos decir entonces que la propiedad inhibitoria estaría a cargo de un sistema donde la AAT sanguínea podría ser uno de sus componentes principales.

Agradecimientos: Tambo los Puquios y F.Fontana.

360 - ESTUDIOS SOBRE LA VÍA SEROTONINERGICA DEL TRIPTOFANO EN PORFIRIA HEPATICA EXPERIMENTAL (Studies on tryptophan serotonergic pathway in experimental hepatic porphyria). Llambías, E.B.C., Aldonatti C., San Martín de Viale L.C., Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina. ebc11@qb.fcen.uba.ar

Las plaquetas toman del plasma la serotonina (5-HT) formada en el tracto gastrointestinal a partir del triptofano dietario vía 5-hidroxitriptofano (5-HTRP). En orina se excreta el metabolito principal, ácido 5-hidroxiindol acético (5HIAA). Nuestro objetivo es relacionar alteraciones del metabolismo del triptofano y manifestaciones clínicas en la porfiria hepática. Anteriormente vimos un bloqueo en la formación de indoxilos en ratas con porfiria experimental inducida por hexaclorobenceno (HCB), investigando ahora disturbios en la vía serotonina. Se empleó HPLC en fase reversa, fase móvil isocrática y detección fluorimétrica. Se midió actividad de triptofano hidroxilasa, que cataliza la formación de 5-HTRP. En ratas con porfiria por HCB, aumenta la excreción urinaria del 5-HIAA, así como los contenidos de triptofano, 5-HTRP y 5-HIAA en plasma y triptofano en sangre total. 5-HT aumenta en sangre porfirica pero disminuye en plasma. En cerebro de animales porfíricos se observa un aumento de triptofano y una disminución de 5-HT; en hígado aumenta triptofano y sus metabolitos así como la formación de 5-HT en intestino delgado. Triptofano hidroxilasa es más activa en cerebro e hígado porfíricos. Se concluye que el metabolismo del triptofano vía serotonina está alterado en porfiria experimental, sin haber determinado aún su significancia. (Subsidios: UBA and CONICET).

361 - ENERGETICA DE LA MODULACION DE ACETILCOLINESTERASA POR SUSTRATO Y POLIAMINAS. (Energetic of substrate- and polyamine- modulation in acetylcholinesterase.) Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M.; Rosenbaum, E. LIBQUIMA Universidad Nacional del Comahue. Neuquén Argentina. aventu@uncoma.edu.ar. Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Comahue

El mecanismo reconocido para ester hidrolasas es un proceso en dos etapas, con la formación de acil-enzima por transacilación, seguida por su hidrólisis. Una triada catalítica de aminoácidos sería común para todas las esterasas. Acetilcolinesterasa (AChE) tiene su sitio activo en el fondo de una depresión profunda, y un segundo sitio de unión para sustrato en la superficie. En trabajos previos describimos la modulación dual por poliaminas (PAs) sobre AChE, proponiendo un modelo cinético en dos etapas, con un sitio para PAs interactuante con ambos sitios para sustrato.

Presentamos aquí los cálculos en los cambios de energía libre estándar de activación ($\Delta\Delta G^\circ$) entre la vía de catálisis modulada por sustrato, por PA o por ambos, y la no modulada, a partir de los parámetros de ajuste. La inhibición por sustrato produce un $\Delta\Delta G^\circ$ de -2,68 Kcal/mol para la transacilación, y -4,11 Kcal/mol para la hidrólisis. Hallamos una alta correlación ($R^2 = 0,999$) entre el $\Delta\Delta G^\circ$ y el número de grupos amino (N) en PA, siendo mayor la pendiente para la segunda etapa (-1,86 vs -0,61 Kcal/mol/N). Partiendo de las constantes cinéticas, calculamos el ΔG° de unión de cada complejo, y las energías de interacción. Nuevamente obtuvimos una alta correlación entre N y ΔG° , con mayor pendiente para la segunda etapa catalítica.

Proponemos que el aporte de cada N a la estabilidad de los distintos complejos y a la constante global de catálisis es el mismo e independiente de la PA en particular. El efecto de PA sobre la catálisis es debido, principalmente, a los cambios que la misma introduce en la estabilidad de los complejos.

362 - REGULACION DE LA ACTIVIDAD Y ABUNDANCIA DE LA ISOFORMA NHE3 DEL INTERCAMBIADOR Na^+/H^+ POR CORTICOSTERONA Y 18-HIDROXICORTICOSTERONA. (NHE3 Na^+/H^+ exchanger. Regulation of activity and abundance by corticosterone and 18-hydroxycorticosterone). Zalocchi, M., Igarreta, P., Lantos, C.P., Calvo, J.C. y Damasco, M.C. Programa de Regulación Hormonal y Metabólica. CONICET. UBA.

La isoforma NHE3 del intercambiador Na^+/H^+ en ribete en cepillo de túbulo proximal renal, es la principal responsable de la reabsorción de bicarbonato.

La actividad de este intercambiador está regulada por 11-hidroxycorticoesteroides naturales: corticosterona y 18-hidroxycorticoesterona (18OHB).

Para estudiar el mecanismo de esta regulación investigamos la actividad intercambiadora por fluorometría con naranja de acridina y la abundancia de NHE3 por Western-blot, utilizando un anticuerpo específico para dicha isoforma.

Grupos de animales estudiados: Adrenalectomizados (ADX), adrenalectomizados inyectados por vía intramuscular con corticosterona (ADX+B) o con 18OHB (ADX+18OHB). Las dosis oscilaron entre 220 μg y 0.1 μg .

Resultados: Actividad: considerando la V_{max} del intercambio para ADX como 100%, para ADX+B aumentó 110% con 220 μg y 41% con 6 μg por animal; para 18OHB incrementó 117% con 12 μg y un 65% con 6 μg (diferencias significativas).

Abundancia Se alcanzaron altos límites de sensibilidad para estos experimentos in vivo: 6 μg de B y 0.5 μg de 18OHB por animal.

363 - FRACCIONAMIENTO DE UN PREPARADO COMERCIAL DE ENZIMAS PECTICAS PARA UN USO MAS RACIONAL DE SUS ACTIVIDADES ENZIMATICAS (Fractionation of a commercial preparation of pectic enzymes for a more rational use of their enzyme activities) Camperi, S. A. y Cascone O. Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA

Los preparados comerciales de pectinasas utilizados en la industria alimentaria normalmente contienen una mezcla de enzimas: pectinlinasa (PL), pectinesterasa (PE) y poligalacturonasa (PG).

En este trabajo se presenta un proceso de fraccionamiento de un preparado comercial para separar las tres actividades enzimáticas que permite su uso más racional.

La cromatografía en hidroxipatita retuvo selectivamente la PG en presencia de buffer de fosfatos 5 mM, pH 6,8, siendo eluida con un aumento en la molaridad del buffer a 200 mM. La fracción de lavado conteniendo la PL y PG fue sometida a cromatografía en membranas con Cu^{2+} inmovilizado en presencia de buffer de fosfatos 20 mM pH 7,0, NaCl 250 mM. Las membranas retuvieron selectivamente la PE que fue posteriormente eluida con buffer acetato de sodio 100 mM, pH 3,0, NaCl 250 mM.

La PL libre de PE es ideal para el procesamiento de los jugos de manzana, donde la presencia de PE origina la producción de metanol durante su procesamiento.

El agregado de PG a los jugos cítricos en forma controlada puede ser utilizada para estabilizar su turbidez por disminución del peso molecular del ácido péctico.

La PE aislada tiene aplicación en producción de pectinas de bajo grado de metoxilación usadas en la industria de jaleas y mermeladas.

364 - CARACTERIZACION ELECTROQUIMICA Y BIOQUIMICA DE UNA PIRUVATO FERREDOXINA OXIDOREDUCTASA DE *Pyrococcus woesei*. (Electrochemical and biochemical characterization of a hyperthermophilic pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus woesei*). Blamey, J.M.¹, Chiong, M.¹ and Smith, E.T.². ¹INUAL, LTDA./TEPUAL S.A., Santiago, Chile. ²Department of Chemistry, Hamline University, MN, USA.

In order to understand the unusual biochemistry that sustains life at 80°C and above, it is important to study the properties of the proteins and enzymes involved in the hyperthermophilic metabolic pathways. Pyruvate ferredoxin oxidoreductase (POR) catalyzes the reversible oxidation/reduction of pyruvate, a key intermediate in carbohydrate fermentation of extreme thermophiles. POR was purified from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* using a three-column procedure. POR enzyme was catalytically active above 80°C and was irreversibly inactivated in the presence of oxygen. NaNO_2 (1mM) and NaN_3 (1mM) are also inhibitors of this enzyme. *P. woesei* POR has a M_r 108,000 and is composed by four subunits and contains 7.3 g-atoms of Fe per mole of protein and 7.0 g-atoms of acid labile sulfide per mole of protein. Direct electrochemistry of *P. woesei* POR, demonstrated that this enzyme has an $E_{25^\circ\text{C}}^\circ = -260$ mV.

Funding from FONDECYT 1960171 is acknowledged.

365 - ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA Y ASCORBATO PEROXIDASA EN *Colobanthus quitensis* DURANTE LA EXPOSICION A ALTA INTENSIDAD LUMINICA Y FRIO. (superoxide dimutase and ascorbate peroxidase activity in *Colobanthus quitensis* during exposure to high light intensity and cold). Pérez, E.A.; Dinamarca, J.; Bravo L.A.; Corcuera L.J. Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile.

Colobanthus quitensis es la única dicotiledónea que ha colonizado la Antártida Marítima. La alta intensidad lumínica y bajas temperaturas de la Antártida pueden causar estrés oxidativo en plantas. En este trabajo, se determina la actividad de dos enzimas que detoxifican especies activas del oxígeno, la superóxido dismutasa (SOD) y la ascorbato peroxidasa (APX).

Plantas crecidas en fotoperíodo 21/3 h luz/oscuridad, a 15°C y baja intensidad lumínica (200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), fueron expuestas por diferentes tiempos a alta intensidad lumínica (1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y/o 4°C. Se determinó la actividad SOD y APX en el tejido aéreo. Las actividades basales de la APX y SOD fueron 0,025 $\Delta A_{580}/\text{mg}$ proteína y 177 USOD/g tejido fresco, respectivamente. Las plantas aclimatadas al frío presentaron actividades SOD y APX 2,4 y 1,8 veces mayor, respectivamente, que las plantas control. La actividad APX aumentó rápidamente a tiempos cortos (12h) de exposición al frío. La actividad SOD sólo varió a tiempos largos (21d) de aclimatación. Durante la exposición a bajas temperaturas por tiempos cortos no se observó influencia de la intensidad lumínica en la actividad de ambas enzimas. Estas respuestas serían importantes en la sobrevivencia de esta planta en la Antártida.

PI-UCOC 98.111.018-1.0

366 - CISTEINA SINTETASA (CysK) DE *Bacillus stearothermophilus* V: ESTUDIOS CINÉTICOS Y DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA. [Cysteine synthase (CysK) from *Bacillus stearothermophilus* V: kinetic and fluorescence spectroscopy studies]. Saavedra, C.¹, Encinas, M.V.², Loyola, C.¹, Araya, M.¹ y Vásquez, C.¹ ¹Lab. Microbiología Molecular y ²Lab. Fotoquímica, Universidad de Santiago de Chile.

Durante nuestros estudios sobre la resistencia de *B. stearothermophilus* V a telurito de potasio (K_2TeO_3), se identificó la enzima CysK –que utiliza PLP como cofactor– como un probable candidato del mecanismo de resistencia. El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímicamente la enzima por un lado y tratar de relacionar el nivel de actividad con el de resistencia, por otro. Se utilizó fundamentalmente la enzima silvestre (wt) y en estos momentos estamos estudiando además dos enzimas mutadas a las que se delecionó 40 (CysK²⁶⁸) y 60 (CysK²⁴⁸) residuos aminoácidos del extremo carboxilo terminal, respectivamente. Estudios de espectroscopía de fluorescencia del cofactor permitieron determinar las constantes de unión de los sustratos y de los productos de reacción a la enzima wt tanto a temperatura ambiente como en condiciones en que la enzima presenta su máxima actividad (50 °C). A esta última temperatura se encontró que la CysK cataliza la descomposición de O-acetilserina en ausencia del sustrato aniónico (S²⁻). Estudios cinéticos mostraron que la catálisis sigue un mecanismo ping-pong.

Financiado por Fondecyt 1990197 y Dicyt.

368 - EL PUENTE DISULFURO ENTRE LAS CYS 147 Y 179 ES ESENCIAL PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ACETIL XILANO ESTERASA II DE *Penicillium purpurogenum*. (The disulfide bridge between cys 147 and 179 is essential for activity of acetyl xylan esterase II from *Penicillium purpurogenum*.) Quiroz, S., Peirano, A., Herrera, F., Larrondo L. F.* y Eyzaguirre, J. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El hongo *P. purpurogenum* secreta al medio dos acetil xilano esterases (AXE I y II). AXE II ha sido secuenciada y su estructura determinada por difracción de rayos X. La enzima (207 residuos) posee 5 puentes disulfuro. Al comparar su estructura con la de cutinasa, (esterasa vegetal), se observa que esta última (199 residuos y de estructura similar) sólo posee dos puentes S-S con posición equivalente en AXE II. En este trabajo se reemplazó las cys 147 y 179 por ala para determinar si este puente (no existente en cutinasa) es necesario para su actividad. La mutación se realizó por "overlap extension" fusionando el cDNA de AXE II con un promotor inducible y un terminador de *Aspergillus*. El producto se clonó en pGEM-T y se co-transformó *Aspergillus nidulans* con ppyrG que complementa una auxotrofia a uridina del huésped. Se aislaron colonias prototróficas y se determinó la producción extracelular de AXE II por western blot. Se obtuvo un clon cuya AXE II es del tamaño de la enzima nativa pero carece de actividad enzimática. Se concluye que el puente eliminado es esencial para la actividad de AXE II.

Financiamiento: DIPUC, Fundación Andes* y FONDECYT Líneas Complementarias 8990004.

367 - OXIDACION DE ACIDO KOJICO POR LA MANGANESO PEROXIDASA DE *C. subvermispota*. (Oxidation of kojic acid by manganese peroxidase from *C. subvermispota*) Bastidas, F., Urzúa U., Vicuña R. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Ceriporiopsis subvermispota es un hongo ligninolítico que secreta varias enzimas extracelulares, entre las que se encuentra la manganoso peroxidasa (MnP). Esta enzima cataliza la oxidación de Mn(II) a Mn(III) en presencia de H₂O₂, actuando luego el Mn(III) como mediador en la oxidación de la lignina.

Estudios preliminares determinaron que la MnP oxida ácido kójico en ausencia de H₂O₂ con un requerimiento estricto de Mn(II). Posteriormente se determinó que el ácido kójico experimenta una fotoxidación inicial que lleva a la producción de intermediarios radicalarios, los que se detectaron mediante atrapadores. El ácido ascórbico inhibe la reacción, implicando la producción de radicales peroxilo. El manitol no la afecta, descartando la participación del radical hidroxilo. El efecto inhibitorio de SOD, NBT y GSH evidenció la presencia de ion superóxido. La inhibición por catalasa sugiere la producción de H₂O₂. Mediante análisis por HPLC se detectó la formación de un producto con tiempo de elución y un espectro UV idéntico a los del producto de la oxidación de ácido kójico por HRP. Dado que éste último había sido identificado por otros autores como un dímero del ácido kójico, se deduce que este corresponde al mismo producto generado con MnP. Se propone un mecanismo para esta reacción.

Financiado por FONDECYT 899004 de Líneas Complementarias

369 - MUTACION SITIO DIRIGIDA DE LISINA 213 EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Saccharomyces cerevisiae*. (Site-directed mutation of lysine 213 in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase). Roschztardt, H. y Cardemil, E. Departamento de Ciencias Químicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

Según los datos cristalográficos obtenidos para la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK, EC 4.1.1.49) de *Escherichia coli*, Lis213 es uno de los ligandos de Mn²⁺ (Tari et al., 1997, Nature Struct. Biol. 4, 990-994). Para que esto ocurra, el microentorno de Lis213 debe bajar el pK de su grupo ε-amino de manera que este se encuentre desprotonado. En este trabajo se empleó PCR para realizar el cambio de Lis213 por Arg en la PEPCK de *Saccharomyces cerevisiae* (enzima homóloga a la carboxiquinasa de *E. coli*). En la enzima alterada la Km de Mn²⁺ aumentó 13 veces, sugiriendo que se afectó la unión del metal. La reacción principal disminuyó su V_{máx} en 3 órdenes de magnitud en ambos sentidos. Por otra parte, no hubo grandes variaciones V_{máx} para las reacciones secundarias, sugiriendo que las etapas limitantes en la reacción principal y en las reacciones secundarias son distintas. Concluimos que el microentorno de Arg213 no es capaz de desprotonar completamente al grupo guanidinio del residuo, y por lo tanto se mantendría una densidad de carga positiva, desfavoreciendo la unión de Mn²⁺ a la enzima.

Financiado por DICYT-USACH 029941CU y FONDECYT 1970670/1000756.

370 - SITIO REGULADOR DEL pKa DE LIS213 DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA (PEPCK) DE *Saccharomyces cerevisiae*: ESTUDIO TEORICO-EXPERIMENTAL. (Regulatory site of Lys213 pKa in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase: theoretical-experimental study). González-Nilo, F., Krautwurst, H. y Cardemil, E. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago.

Las PEPCK dependientes de ATP se encuentran agrupadas en una familia que presenta secuencias altamente conservadas. Se hizo un análisis exhaustivo de estas secuencias con el software GCG, que es una poderosa herramienta para el análisis de secuencias, y que además cuenta con acceso a numerosas bases de datos. El estudio de alineamiento de 26 secuencias de las PEPCKs, ha permitido identificar motivos y construir diferentes modelos por homología de esta familia. En este estudio, se presenta un modelo de la PEPCK de *Saccharomyces cerevisiae*, que permite explicar el efecto indirecto de la mutación Glu284Gln sobre el sitio de unión del Mn^{2+} . Esta mutación cambia los parámetros de unión de Mn^{2+} , y baja la actividad catalítica, a pesar que el residuo mutado se encuentra relativamente alejado del sitio de unión del metal. Se hizo un análisis teórico de esta mutación, basado en el modelo por homología de la PEPCK de *S. cerevisiae* y en cálculos de mecánica cuántica y de perturbación de energía libre. Este estudio permitió identificar que el residuo mutado pertenece a un conjunto de aminoácidos que modularía el pKa de la lis213, que es la que se une directamente con el metal. Agradecemos al Dr. R. Cachau, NCI-USA y FONDECYT 1000756.

371 - ESTUDIO ESTRUCTURAL DEL SITIO DE UNION DEL METAL EN LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *Saccharomyces cerevisiae* (Structural study of the metal binding site of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase) Krautwurst, H., Roschztardt, H.,*Nowak, T. y Cardemil, E. Universidad de Santiago y *University of Notre Dame.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) cataliza la reacción de descarboxilación de oxaloacetato (OAA) para generar fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de un nucleósido trifosfato. Para catalizar la reacción requiere la presencia de un metal divalente. Datos cristalográficos de la PEPCK de *Escherichia coli* (Tari et al., 1997, Nature Struct. Biol. 4, 990-994) establecen que la transferencia del P_{γ} del ATP hacia OAA para generar PEP es directa y es ayudada por Mn^{2+} . Este metal se encuentra unido en forma directa a His232 y Lis212. Considerando estos antecedentes se procedió a analizar aspectos estructurales del sitio activo de la PEPCK de levadura en solución. Para ello se midió por RMN- ^{31}P la distancia entre Mn^{2+} y el P del PEP unidos a la PEPCK de levadura. La distancia entre Mn^{2+} y el fósforo fue de 5,07 Å. Por otra parte, se obtuvieron mutantes para la enzima de levadura (Lis213Arg, His233Gln) las que fueron sometidas a experimentos de unión de Mn^{2+} (EPR). Se encontró que las constantes de disociación para las enzimas alteradas Lis213Arg y His233Gln aumentaron 23 y 111 veces, respectivamente, con relación a la enzima nativa. Estos datos se comparan con las predicciones del modelo cristalino de la PEPCK de *E. coli*. DICYT-USACH 029941CU, FONDECYT 1970670/1000756.

372 - EL ESTRES HIPEROSMOTICO REGULA LA ACTIVIDAD DE ALDOSA REDUCTASA EN CULTIVOS DE CARDIOMIOCITOS (Hyperosmotic stress regulates aldose reductase activity in cardiomyocytes cultures). Ulloa A., Gálvez A., Lavandero S. Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La enzima Aldosa Reductasa (AR) cataliza la reducción de glucosa a sorbitol en diversos tejidos, cuando éstos son expuestos a una condición hiperglicémica. La acumulación de sorbitol tiene por función equilibrar la osmolaridad interna de las células. Por otra parte, la sobreexpresión de AR en una línea de células pancreáticas induce apoptosis.

En este trabajo postulamos que la AR (36 KDa) está presente en el cardiomiocito, y que ésta es activada por hiperosmolaridad, lo que además puede inducir apoptosis. Para resolver esto, cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatas fueron expuestos a condiciones de hiperosmolaridad creciente por 24 horas con diferentes solutos (glucosa o sorbitol, 25-300 mM). La cantidad y actividad de AR fueron determinadas por inmunowesternblot y espectrofotometría, respectivamente. La apoptosis se evaluó por fragmentación del DNA en geles de agarosa al 2 %.

Los resultados mostraron un aumento tanto en la masa (2.0-2.5 veces el control), como en la actividad de la AR cuando las células fueron cultivadas en un medio hiperosmótico (concentraciones iguales o mayores a 150 mM de soluto). La apoptosis de los cardiomiocitos determinada por la fragmentación del DNA es 150-350 % mayor al control, y es directamente proporcional al aumento en la actividad AR. Se concluye que el cardiomiocito presenta actividad AR, y que ésta aumenta en forma proporcional a la osmolaridad del medio. Este aumento en la AR, está relacionado en forma directa con la inducción de la apoptosis en el cardiomiocito.

Proyecto Fondecyt 1980908

373 - LOCALIZACION DE LA ISOENZIMA A DE ALDOLASA EN TEJIDOS DE RATA. (Localization of the type A isoenzyme of aldolase in rat tissues). Droppelmann, C.A., Yañez, A.J., Brito, M., Asenjo, J.L., Concha, I.I. y Slebe, J.C. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Se ha postulado que la organización y regulación de las vías metabólicas podría ocurrir *in vivo* a través de complejos multienzimáticos, permitiendo interacciones específicas secuenciales entre las enzimas que constituyen una vía metabólica. La inmunolocalización de fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y Aldolasa B, en hígado y riñón de rata (Sáez et al., 1996); Sáez y Slebe (2000) *J. Cell. Biochem.* 63, 453-462; 78, 62-72) mostró que ambas enzimas se localizan en la región periportal en el hígado y en células del túbulo contorneado proximal en la corteza renal. Además, nuestro laboratorio ha demostrado que existe una interacción específica débil entre FBPasa y Aldolasa B. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la localización de aldolasa A, isoenzima muscular que debiera ser parte de la vía glicolítica, y por lo tanto, presentar una distribución diferente. Aún cuando el análisis inmunohistológico en hígado reveló que Aldolasa A presenta una localización similar a la FBPasa y a la Aldolasa B, en el riñón se observó que Aldolasa A se localiza en el asa de Henle de la médula y en los túbulos distales de la corteza. Utilizando microscopía confocal se encontró que aldolasa A, al igual que aldolasa B, en células renales tiene una localización subcelular preferencialmente perinuclear y nuclear. Estos resultados nos permiten postular que Aldolasa B y FBPasa participarían en la vía gluconeogénica y que la isoenzima A de aldolasa participaría preferencialmente en la vía glicolítica. Además, apoyan la idea que el contenido de una enzima activa no es suficiente para una función celular apropiada y que la localización de la enzima es también crítica para la función celular. (Financiado por: FONDECYT 1981001 y DID-UACH).

374 - INFLUENCIA DE LA INTERACCION DE HETERODIMEROS DE TUBULINA SOBRE SU ACTIVIDAD GTPASICA. (Influence of heterodimer interaction over its GTPase activity). Nova, E. y Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos, cuyo constituyente principal es el heterodímero α y β tubulina, depende de la velocidad de hidrólisis de GTP en β -tubulina. En nuestro laboratorio hemos determinado que en solución el heterodímero presenta una actividad basal, k_{cat} 0,6 min⁻¹, que es estimulada alrededor de tres veces por Ca²⁺, y aproximadamente siete veces cuando los extremos C-terminales de ambos monómeros se digieren controladamente con subtilisina. Estos resultados sugieren que la región C-terminal modula la actividad GTPásica del heterodímero. Por otro lado se sabe que la polimerización de microtúbulos, la polimerización de anillos inducida por Ca²⁺ y la polimerización de tubulina-S inducen la actividad GTPásica. Esto ha llevado a postular que la polimerización induce en *trans* la actividad GTPásica, como resultado de la interacción del residuo glutámico 254 de α -tubulina con el sitio de GTP de β -tubulina. Para determinar si la interacción entre heterodímeros de tubulina es responsable de la inducción de esta actividad, se inmovilizó el heterodímero a una resina affi-gel y se midió la actividad GTPásica de tubulina, tubulina Ca²⁺ y tubulina-S. Los resultados fueron comparables a los observados en solución y sugieren que la actividad GTPásica no sería dependiente sólo de la interacción entre dímeros. Financiado por Proyecto FONDECYT 198098.

375 - LIPOXIGENASA RELACIONADA A LA SINTESIS DE JASMONATOS EN HOJAS Y RAICES DE TOMATE INDUCIDA POR NaCl (A lipoxigenase responsive jasmonate tomato leaves and roots is induced by NaCl). Pedranzani H *, Peña-Cortéz H. ***, Abdala G. **, Ramírez I. ***, * Laboratorio Fisiología Vegetal. FICES. Universidad Nacional de San Luis. Argentina. ** Laboratorio Fisiología Vegetal. FCE. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. *** Centro de Biotecnología. Universidad de Santa María. Valparaíso. Chile.

Las lipoxigenasas (LOXs) están involucradas en diferentes procesos regulados por el desarrollo y el ambiente de la planta (Rosahl, 1996; Z. Naturforsch. 51c:123-138). Los ácidos 12-oxo-fitodienoico y jasmónico (JA) son derivados del ácido linolénico y de ácidos grasos de las membranas de plantas; en esta vía de síntesis intervienen LOX, aleno óxido sintasa y aleno óxido ciclasa, y b-oxidación para producir JA (Vick y Zimmerman, 1984; Plant Physiol. 75:458-461). Bell y col. (1995; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8675-8679) informaron que la isoforma LOX-2 de *Arabidopsis thaliana*, de ubicación cloroplástica, está involucrada en la biosíntesis de JA. En plantas transgénicas de *Arabidopsis*, con niveles bajos de síntesis de LOX-2, la acumulación de JA inducida por heridas se vio reducida.

La injuria, patógenos y sequía aumentan la actividad LOX luego de un período lag, el cual es necesario para la biosíntesis de novo de proteína LOX. Este efecto podría estar mediado por JA o Me-JA ya que se ha demostrado que estos compuestos son potentes inductores de la expresión de genes LOX en soja (Park y col., 1994; Plant Sci. 96:109-117), *Arabidopsis thaliana* (Melan y col., 1993; Plant Physiol. 101:441-450), papa (Geerts y col., 1994; Plant Physiol. 105:269-277), zapallo (Nellen y col., 1995; Z. Naturforsch. Teil C 50:29-36) y cebada (Feussner y col., 1995; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11849-11853).

Previo a este estudio observamos que la salinización de plantas de tomate indujo una mayor producción de JA en raíces y hojas; así, el objetivo del presente trabajo fue encontrar una LOX relacionada con la síntesis de JA y estimulada por NaCl.

Se utilizaron plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L., cv. Hellfrusch Frustamm y Pera), crecidas en medio hidropónico Hoaglang al 50%; el tratamiento salino se realizó con 100 mM de NaCl a 40 días de la siembra. Follaje y raíces se homogeneizaron separadamente con buffer fosfato salino al 1% pH 7.4 y se midió proteínas en el sobrenadante. Con 25 μ g de proteína por muestra se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes; luego se transfirió a membranas de nitrocelulosa para western blot. Se empleó anticuerpo policlonal AbLox de papa 1:1500 v/v que reconoce a una LOX de tubérculo y a una LOX inducible por heridas en hojas de papa. El anticuerpo reconoció una LOX en tomate. Se analizó el patrón de expresión del Ant-LOX de papa, presentando los tratamientos salinos mayor intensidad de bandas. En conclusión, la ruta biosintética de JA mediada por LOX es incrementada en las plantas salinizadas.

Indice de Autores

<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>
A					
Abadie P.	108	Alvarez S.	168	Balatti P.A.	146
Abate C.M.	134	Alvarez S.E.	103	Baldessari A.	135
Abdala G.	154, 192	Alvarez S.M.	101	Baldi A.	56, 93, 103
Accatino L.	68	Alvarez V.	186	Balestrasse K.B.	148
Acerenza L.	86	Alvear D.	117	Balme A.	33
Acosta D.	184	Alvarez M.G.	80	Bantignies B.	60
Actis A.	107	Alvite G.	120	Barahona S.	74
Actis-Goretta L.	100	Alzamora R.	98	Barbieri A.	89
Acton S.	69	Ambrosio A.	119	Barbieri R.	154
Adamo H.F.	120	Amigo L.	68, 69, 85	Barengo N.	155
Adragna N.	127	Amthauer R.	49, 130	Barquero A.A.	177
Adroer J.	50	Angeletti S.	108	Barra H.	122, 123
Affranchino J.L.	175, 180	Angelini J.	149	Barra J.	159
Agostitini E.	146	Anguiano O.	99	Barrantes F.J.	127, 128
Aguayo J.	137	Antollini S.	124, 128	Barreras M.	158
Aguilar C.	182	Antón D.N.	169	Barrio M.	94, 95
Aguilar M.	145, 175	Anton E.	118	Basack B.S.	131
Aguilar O.	149, 152	Aon A.M.	35, 168, 171	Basso A.	110
Aguilar O.M.	170, 174	Arakaki A.K.	28, 150	Bastidas F.	190
Aguilar P.	39	Arana E.I.	178	Battistoni F.	153, 169
Aguilera A.C.	150	Araya C.	51, 78	Beassoni P.	185
Aguilera S.	77, 78	Araya M.	190	Becerra C.	156
Aimó L.	101	Araya P.	50	Becker M.I.	63
Ainsa J.	172	Arce C.A.	123	Belaich M.N.	179
Aisen E.G.	91	Arce-Johnson P.	62	Beligni M.V.	148
Alaniz M. J.	84, 86, 128	Argaña C.	132, 156, 158, 159	Bellini M.J.	128
Alba C.	146	Argimón. S.	135	Belmonte S.	96
Albanesi D.	168	Argüelles C.	108	Benavides M.P.	54, 148
Albesa I.	156	Arias A.	153, 169	Benavides P.	186
Alcaíno J.	74	Armisen R.	66	Benech-Arnold R.	54
Alché L.E.	177	Arostegui G.	106	Benencia F.	176
Aldonatti C.	173, 188	Arranz S.	92	Benseñor L.	110
Algranati I.	157	Arredondo M.	83	Bergoc R.	106, 107
Alipi A.M.	170	Arribére M.	122	Berón W.	82
Alito A.	171	Arturi M.J.	146	Bersier G.	36
Aljinovic E.M.	179	Asenjo J.L.	59, 191	Bertín P.	113
Allende M.L.	41, 63, 64, 66	Ashfaq R.	113	Bertonsini C.	107
Alliende C.	77, 78	Avale M.E.	95	Betancor L.	133
Almará A.M.	150	Avalos A.M.	76, 153	Bette-Bobillo P.	89
Almarza C.	71	Aveldaño M.	124, 127, 128, 157	Bettera S.	162
Almeida da Silva P.	172	Avila M.	71	Beuret C.	124
Almirante A.	164	Awuad Y.	79	Bey P.	56
Almirón M.	172	Aybar M.J.	65	Bidinost C.	160
Almoguera C.	145	Azcárate Peril M.	158	Bigi F.	171, 172
Alonso G.D.	181, 186, 187	Azulovich A.C.	94	Bilen M.F.	179
Alonso L.J.	110, 111	B			
Alonso-Romanowski S.	125, 127	Babul J.	50, 60	Biscoglio J.B.	122
Altabe S.	169	Badin A.	36	Biscoglio, M. J.	33
Alvarez H.	77	Baez M.	50	Bisig C.G.	123
Alvarez J.	39	Baeza M.	39, 75	Bittel C.	175
Alvarez L.	100, 101	Bagnato C.	124	Blamey J.M.	189
Alvarez M.	77	Baigori M.D.	168	Blanch B.	99
Alvarez M.E.	146	Bakas L.	186	Blanco L.P.	67, 97
		Balagué C.	171, 173	Blanco Rivero M.C.	156
				Blank V.	90
				Bocca S.N.	40

<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Bocco J.	109, 160	Cabello C.	98	Carvajal N.	49, 60
Bogni C.	162	Cabezas M.	49	Carvallo M.	72
Boland R.	92, 93, 104	Cabrejos M.E.	61	Carvallo P.	113
Bollo M.	181, 185	Cabrera J.E.	108	Casabé N.B.	131
Bonansea S.	181	Cabrera R.	60, 130	Casale C.H.	123
Bonini I.C.	128	Caffini N.	118, 120, 122	Casalla D.	108
Bono M.R.	65, 67	Caimi K.	171	Casalangué C.	144, 145, 151
Boren J.	35	Callieri D.A.	170	Casar J.C.	64
Borioli G.	55	Calvette J.J.	119	Cascante M.	35, 50, 86
Boros L.G.	35	Calvo J.C.	85, 189	Cascone O.	130, 136, 149, 189
Borroni M.V.	101	Calzolari A.	162	Casserly C.	132
Bortolotti S.	150	Cami K.	172	Cassia R.	147
Bosca L.	36	Campani S.A.	189	Cassorlo F.	76
Botham K.	127	Campos X.	36, 79	Castagnaro A.	161
Bover L.	94	Candurra N.	175	Castas M.	111
Boveris A.	36	Cane M.	159	Castellano P.	161
Brandon E.	64, 65, 82	Cánepa E.T.	106, 112	Castilla R.	104, 153
Bravo L.A.	189	Cangemi R.	163	Castillo J.A.	39
Bravo M.G.	128	Cannata J.J.B.	185	Castillo O.	34, 51
Brenner R.R.	124, 126	Cano F.	56	Castro C.	95
Brevedan R.	128	Cantore M.	104	Castro G.	159, 168
Briand O.	52	Cantore M.L.	153	Castro G.D.	188
Bricca M.	146	Capelluto D.	185	Castro J.A.	188
Briones G.	162	Capiati D.A.	92	Castro M.A.	82, 97
Briones R.	59	Caporaletti D.	61	Castro S.	149
Brito M.	83, 191	Capozzo A.	177	Catalá A.	125, 126, 129, 130
Bronfman M.	57	Capozzo A.	177	Catalano P.N.	185
Brown N.	77	Caputto B.L.	129	Cataldi A.	171, 172
Bru E.	163	Caputto B.L.	55	Cave R.	76
Bruna C.	50, 55	Caputto B.L.	55	Caviedes P.	81
Brunet J.	49, 59	Carballo C.	77	Caviedes R.	81
Brunster M.	55	Carballo P.	76	Cazzulo J.J.	182, 183, 185, 186
Bu G.	68	Carballo P.	76	Ceccarelli E. A.	28, 150
Bucarey J.L.	64	Cardemil E.	190, 191	Celma C.C.P.	175, 180
Bucarey S.	47	Cardemil E.	49	Centanin L.	40
Bueno M.	151	Cardemil E.	59	Centelles J. J.	35
Buitrago C.	105	Cardemil E.	59	Centeno J.M.	110, 111
Bull P.	71, 72	Cárdenas A.M.	79	Cerdán M.G.	95
Bunster M.	50	Cárdenas H.	80	Ceruti J.M.	112
Buonocuore L.	177	Cárdenas L.	53	Chan A.	157
Burgos A.	62	Cárdenas L.	53	Chan N.	107
Burgos M.H.	94	Cárdenas M.L.	35	Chan R.	145
Burke D.	177	Carmona C.	184	Chatton B.	29
Burzio L.O.	137	Carpinelli J.	155	Chávez R.	71
Busalmen J.P.	131	Carranza M.P.	142	Checa S.	170
Busconi L.	153	Carrari F.	54	Chelín R.	121
Busi M.V.	152, 176	Carrari F.O.	61	Chianalle J.	37
Bussolino D.	55	Carrasco A.E.	41	Chianelli M 157	
Bustamante F.	97	Carrasco C.	67	Chicco A.	123
Bustamante J.	36	Carrasco L.	36	Chico J.M.	54, 151, 152
		Carrasquedo F.	100	Chico Y.	127
		Carrillo N.	28, 144, 175	Chiong M.	189
		Cartier L.	76	Chirido F.	173
		Caruso C.	157	Chornomaz E.	145
		Carvajal M.L.	136	Cifuentes V.	74

C

Cabada M.	92
Caballero de Castro A.	131, 133
Cabanas M.L 143, 144	

<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Ciochini A.	162	Crupkin M.	130	Delgado de Layño A.M.A.	188
Ciuffo G.M.	103, 104	Cruzado M.	95	Delgado M.A.	158
Claeysens M.	25	Cullen D.	58, 71	Delgado O.	134
Claus J.	176	Cumino A.C.	141	Demarco I.	101
Clément P.	73	Cunningham M.	125	Depino A.	112
Clérico E.M.	118	Curá J.A.	153	Desimone M.F. 135	
Climint C.	38	Curatti L.	75, 141	Desplats P.A.	62
Cocca C.	107	Curtino J.A.	186	Di Mascio, P.	34
Cochella L.	181, 186	Curto L.	105	Di Paolo N.	112
Collados L.	76	Czibener C.	170	Di Pietro S.M.	120
Collavino M.M.	174			Díaz A.R.	126, 157
Colombo M.I.	70, 82, 89			Díaz L.E.	135
Comerci D.J.	171			Díaz Ricci J.	161
Comín B.	35			Díaz-Araya G.	36
Concha I.	191			Díaz-Gómez M.I.	188
Concha I.I.	83			Díaz-Quintana A.	33
Concha M.I.	49			Diema C.D.	55
Conde R.B.	95			Diez M.	102
Conde R.D.	150, 151, 174			Dinamarca J.	189
Conforti P.	122			Disous C.	164
Coñombo M.I.	70			Dominici F.	106
Constantini M.H.	188			Donis R.	177
Contín M.A.	122, 123			Donolo A.	173
Contreras I.	97			Dorta F.	53
Contreras L.	146			Dreon M.	125
Contreras-Martel C.	50, 55			Droppelmann C.A.	191
Corach D.	107, 108			Du Jardín P.	142
Corcuera L.J.	189			Duek P.D.	61
Cordano G.	85			Dulout F.N.	100
Cordero J.	89			Dunand S.	108
Cordo C.	151			Durán H.	93
Cordo S.	175			Duriez P.	52
Cornejo Maciel F.	105				
Cornejo P.	84				
Coronel C.E.	117, 184				
Correa O.S.	135				
Corsini G.	39, 74				
Cortassa S.	171, 136, 168				
Cortés P.	160				
Cortez N.	175				
Cortiñas T.	99				
Corvi M.	173				
Coso O.	96				
Costa C.S.	169				
Costas M.	96				
Coto C.E.	177				
Cotten M.	29				
Coulombie F.	178				
Courreges M.C.	176				
Coutelier J.P.	90				
Cozarín M.E. 142					
Craig P.O.	117				
Cricco J.A.	117				
Cristodero M.	90				
Croci M.	107				

D

D' Angelo A.M.	101
D' Alençon C.	41, 64
D'Alessandro M.E.	123
D'Alessio A. C.	61
D'Angelo M.	181
D'Angelo M.C. 152	
D'Antuono A.	172
Dagnino A.	76
Dagnino- Subiabre A.	81
Daleo G.	148, 138
Damasco M.C.	85, 189
Damiani M.T.	89
Damonte E.	175
Daniotti J.L.	69, 110
Dardanelli M.	151
Darvas Z.	106
David Gara P.M.	145
Davio C.	56, 103
De Blas G.	83, 89
De Castro R.	174
De D' Angelo P.	99
De Forchetti M.	146
De Giori G.S.	160, 161
De Guzmán S.	99
De Ioannes A.	63, 67
De Ioannes P.	63, 72
De la Canal L.	146
De la Cerda B.	33
De la Fuente A.	39
De la Iglesia R.	73
De la Rosa M.A.	33
De la Sota R.L.	91
De la Vechia C.	149
De Las Rivas J.	121
De los Santos E.B.	127
De Meis L.	25
De Mendoza D.9, 48, 126, 156, 157, 168, 169	
De Prat Gay G.	110, 111
De Tezanos Pinto F.	120
Deglin M.	76
Del Papa M.	173
Delacre M.	153
Delfino J.M.	117

E

Echeverría C.	130
Ehrlich R.	120,
Eisel U.	112
Ellenberg P.	177.
Elola M.T.	119
Elorza A.	72
Eltit J.M.	36, 80
Encinas M.V.	190
Enciso S.	54
Erices A.	67
Erijman L.	132
Ermácora M.R.	118
Escobar M.E.	127
Espinosa C.	76
Espinosa J.	181, 186
Espinosa V.	58
Espinoza I.	75
Espinoza M.	34, 83
Esteves A.	120
Estévez C.	134
Estiúg G.	99

<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Evangelista de Duffard A.M.	171	Fontana C.	160	Gavazza M.	129
Eysaguirre J.	71, 72, 19	Fortino A.	123	Gazdar A.	77, 113
F					
Fabiano E.	153, 169	Fraga C.G.	34, 100	Gazzaniga S.	96
Fabra A.	149, 152	Franchi A.	117	Gebhard L.	118
Fachinetti M.M.	124	Franco L.	96	Gelman D. M.	95
Falus A.	106	Franco M.G.	136	Genta S.	94
Falzone T.L.95		Franke de Cazzulo 186		Gentili C.	104
Fardella C.	37	Frankel N.	61	Genti-Raimondi S.	108
Farías M.	158	Franze M.T.	180	Gerez de Burgos N.M.	181, 185
Farías R.	129, 161	Frey P.A.	59	Ghio S.	182
Favale N.	124	Fuchs J.S.	131	Ghiringhelli P.D.	178, 179
Favelukes G.	145	Fuentealba L.	82	Ghittoni N.	151
Feldmen M.F.	170	Fuentes L.B.	104	Giammona A.M.	124
Fenochio A.	108	Fuentes M.	49	Giangrossi G.	123
Fernández J.	167	Fuentes R. A.	66	Giardini J.E.	164
Fernandez J.	26, 78	Furland N.E.	128	Giarocco L.	141
Fernández K.	103	Furman C.	52	Giasson L.	104
Fernández M.L.	119	G			
Fernández N.	56, 103	Gabarain C.	182	Gil G.A.	55
Fernández R.	163	Gabardino J.	67	Giménez M.S.	94, 98, 101
Fernández T.M.	120	Gadaleta P.	178	Gioffré A.	171
Fernández V.	84	Gago G.	145	Giordano O.	74
Fernández-Lahore H.M.	130	Gajardo J.	47	Gi-raudo A.	159
Fernández-Maillot V.	146	Gajardo P.	85	Giraud C.G.	69
Ferrari A.	99	Galán J.E.	29	Giulietti A.M.	142
Ferraro G.	130	Galanti M.	75	Goda M.	94
Ferreira J.	67, 85	Galanti N.	74, 186	Godoy A.	147
Ferreiri D.U.	110	Galiano M.	122	Godoy A.V.	144
Ferreiro D.	111	Galindo M.	74, 75, 186	Goedelman C.	106
Ferrer S.	75	Gallego S.M.	148	Goicovich E.	77
Ferrero L.	39	Gallegos C.E.	127	Goldberg A.	178
Fidelio G.D.	129	Galliano M.	101	Goldszmid S.R.	95
Fiedler J.L.	76	Gallo M.	136	Gomes Barroso A.	182
Figueroa C.	81	Galván E.M.	91	Gomez Casati D.	168, 171
Figueroa J.	71, 103	Galván M.Z.	146	Gomez Dumm N.T.	124
Figueroa P.	54, 72	Gálvez A.	36, 56, 79, 191	Gómez E.B.	80
Figueira L.	108	Gamba G.	176	Gómez K.A.	90
Filipone M.P.	161	Garbarino P.E.	129	González B.	39, 73, 74
Finarelli G.S.	124	Garcés J.L.	50	González D.	107, 145
Fingerman M.	120	García - Olivares J.	79	González E.	53, 70
Fink N.E.	119	García A.F.	135, 154	González F.	76
Fiol D.	141	García C.J.	79	González L.	96, 105, 155
Fiser A.	182	García F.	125	González M.	48, 98
Fissolo S.	122	García L.	76	González M.J.	77, 78
Fitzsimons C.	106	García M.V.	146	González P.	81, 151
Flaviá M.M.	181, 186, 187	García -Pérez M.A.	38	González R.H.	183
Flocco C.G.	142	García V.	47, 159	González S.	77
Flores C.	71, 137	Garda H.	125	González S.A.	175, 180
Flores E.	75	Gardey L.	148	Gonzalez Videla R.	176
Flores M.	59, 121	Gargantini P.R.	152	González-Jara F.	56
Flury A.	108	Garretón V.	155	González-Nilo F.	59, 191
Foncea R.	34, 52	Garrido M.N.	185	Gori J.I.	153
Font de Valdez G.	131, 132	Garriz A.	145	Gorostizaga A.	105
		Gatica A.	57	Gorvel J.P.	162, 171
				Goud B.	70
				Grasselli M.	136

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Graumann R.	77
Grave L.	29
Graziano M.	148
Gribaudo G.	160
Grigera P.	177
Griñó B.	85
Groppa M.D.	54
Gruel N.	94
Guajardo M.H.	125
Guajardo V.	102
Guasch V.	102
Guberman A.S.	106, 112
Gudesblat G.E.	61, 154
Güerci A.	100
Guerrero A.	85
Guerschberg L.	101
Guido M.E.	55, 129
Guiñazu M.F.	84
Guinovart J.J.	28
Guixé V.	50, 60, 86
Gutierrez A.M.	126
Gutierrez J.	57, 72
Gutierrez M.	99
Gutiérrez A.	107

H

Hallak M.	122
Hampp E.	149
Harfi I.	142
Hébert E.M.	161
Hecht H.J.	182
Hegyesi H.	106
Hellman U.	33, 122
Heluane H.	134
Henríquez J.P.	82
Heras H.	125
Hermida E.B.	134
Hernández S.	100, 129
Herrera C.	48
Herrera E.	64
Herrera F.	190
Herrera P.	60
Hervás M.	33
Hetherington A.M.	154
Hetz C.	39
Heuck A.P.	68
Hidalgo P.	60
Hitschfeld C.	98
Holuigue L.	60, 155
Hozbor D.	167

I

Iannucci N.B.	136
Ielpi L.	157, 158
Igarreta P.	85, 189

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Iglesias A.A.	168, 171
Iglesias L.	133
Iglesias M.M.	119
Iglesias S.	135
Igoillo Esteve M.	186
Imarai M.	81
Imschenetzky M.	57, 64, 66, 72
Inestrosa N.C.	27
Iñón de Iannino N.	162, 167
Inoue S.	94
Irazoqui F.J.	120, 121
Iribarren A.M.	133, 136
Isla M.I.	143, 150
Isse B.	129
Iusem N.	54, 61, 154
Ivaldi M.S.	186

J

Jabalquinto A.M.	49
Jácamo R.	180
Jacuelín D.	159
Jammett A.	137
Jara P.	67
Jaureguiberri B.	137
Jiménez M.S.	143
Jiménez Ortiz V.	74
Johnson A.	68
Jordana X.	54, 72
Jordano J.	145
Juárez A.	173
Juárez Tomás M.S.	163
Juri Ayub M.	182

K

Kadener S.	108, 112
Kalergis A.	67
Kalisz K.	182
Kausel G.	103
Kedinger C.	29
Kemmerling U.	96
Kerber N.L.	135, 154
Kesten E.M.	131
Kettlun A.M.	58, 76
King T.P.	122
Kirchherr V.	112
Kissen R.	142
Kleiman D.	100, 101
Kobarg J.	133
Koenig C.	51, 78
Kölliker-Frers R.	100
Koritschoner N.	109
Kornbliht A.	108, 112
Kramer P.	108
Krapp A.R.	28
Krautwurst H.	191

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Krieger M.	51, 69
Kudla J.	152
Kukuljan M.	66

L

La Torre J.	177
Lagares A.	167, 173
Lagos R.	39, 49, 59, 74, 75
Laivenieks M.	49
Lamattina L.	42, 147, 148
Lantos C.P.	85, 189
Lapeña A.	110, 111
Lara H.E.	76
Larcher F.	93
Larí S.	80
Larrondo L.F.	58, 190
Latorre, R.	33
Lavandero S.	36, 56, 79, 80, 191
Lavista Llanos S.	40
Lazar E.	106
Lederkremer R.M.	135
Ledger T.	73, 74
Lee W.N.P.	35
Lefimil C.	58
Leguizamón E.	176
Leighton F.	34, 51, 52, 102
Leisewitz A.	80
Lemos B.	56, 103
León G.	72
León O.	58
León R.	74
Lepek V.	172
Levin M.	182
Lewkowicz E.	133
Leyton C.	77, 78
Li Y.	68
Liggieri C.	122
Lima C.	135
Lioy V.	127
Lisa A.	159, 161
Llambías E.B.C.	188
Llanos L.	59
Lobo G.	181, 187
Lobos S.	58, 71
Lodeiro A.	145
Lodeyro A.F.	186
Lojo M.M.	179
Lombardo Y.B.	123
Longhi S.	90
Lopes C.	133
López A.	96
López A.C.	170
López Díaz F.	109
López F.	161
López García S.	145

<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>	<i>Autor</i>	<i>Página</i>
López L.A.	83	Martelotto L.	92	Millinarski A.	76
López L.M.I.	118	Martín C.	172	Milrad S.	146
López M.	49, 59	Martín M.	156, 168	Minahak C.	155, 161
López M.V.	174	Martínez A.	159	Minahk C.	161
López N.	163, 180	Martínez C.	74	Minguell J.J.	67
López P.	156	Martínez D.	183	Minna J.	113
Lopez P.H.H.	120, 121	Martínez J.I.	79	Minnard J.	167
López Solís R.O.	96	Martínez M.	155, 172	Miquel A.	137
López V.	49	Martínez Noel G.	142	Miquel J.F.	68, 69, 85.
Lotito S.B.	100	Martínez -Oyanedel J.	55	113	
Loyola C.	190	Martínez P.	47, 81	Miranda D.	67, 97
Lozano M.	177, 179	Martínez R.	100	Miranda M.V.	149
Lucchesi G.	159, 161	Martinez, G.R.	34	Miranda S.	51, 52
Ludwig H.C.	59	Martínez-Lorenzo M.J.	171	Miyazaki S.S.	134
Lujan H.D.	184	Martínez-Oyanedel J.	50	Mladovan A.	56
Lumbreras V.	146	Martin-Nizard F.	52	Modolell J.	40
Lupano C.E.	134	Martone C.B.	167	Moenne A.	61
M					
Macció D.	149	Marusic E.T.	98	Molas L.	154
Maccioni H.J.F.	69, 91, 110	Marzocca M.	177	Molgó M.	77
Machado-Domenech E.	154, 181, 185	Marzolo M.P.	68	Molina A.	143
Machinandiaarena M.F.	138, 148	Mas F.	50	Molina C.	78
Maffia E.	118	Maskin L.	61	Molina G.	76
Magnerelli G.	101	Massa E.	121	Molina H.	68, 69
Magni Ch.	156	Massouh E.J.	176	Molina-Heredia F.P.	33
Magri M.L.	149	Maté S.M.	126	Molinari E.	93
Maitra A.	77, 113	Mathieu P.A.	90	Molledo B.	63
Maldonado C.	97	Mattar A.	99	Monasterio O.	39, 49, 59, 75, 192
Maldonado E.	61	Mattio N.	118	Monczor F.	56, 103
Maldonado E.N.	127, 128	Matus V.	73	Monferran C.G.	91
Maldonado S.	135	Maugeri D.	186	Monge P.	93
Maloberti P.	56	Maya J.D.	47	Monqaut L.	159
Mamaní A.	161	Mayor R.	65	Montagna A.	181
Mangone C.P.	135	Mayorga L.	82, 83, 89	Montanari A.	92, 186
Manrique J.M.	175, 180	McCarthy C.	178	Montecchia M.	154
Mansilla M.C.	168	Medeiros, M. H. G.	34	Montecino M.	57, 64, 66, 72
Mansilla S.	102	Medina J.	85	Montemartini-Kalish M.	182
Mante Caza A.	94	Medina J.H.	99	Montero J.	37
Manzano M.	73	Medina M.I.	151	Monti M.R.	132
Marchant L.	62	Medina R.	66	Montoya M.I.	80
Marcozzi C.	168	Medina V.H.	91	Mora G.	47
Marder M.	90, 99	Mele P.G.	56	Mora J.R.	65
Mardones P.	51, 69	Meléndez J.	79	Morais Ribeiro B.	179
Margni C.	126	Méndez B.	163	Morales M.P.	36, 80
Marín M.C.	84	Mendoza C.	57	Morán A.	155
Maringolo C.	150	Mendoza H.	85	Morcelle del Valle S.	122
Marino C.	135	Mendoza I.	79	Mordoh J.	94, 95
Mariño K.	135	Mercerat J.R.	120	Morelli S.	104
Marino M.	108	Mericq V.	76	Morello A.	47
Marino V.	90	Mesa R.	82	Morello H.	91
Mariscotti J.	161	Meza-Basso L.	53	Moreno de Colonia S.M.	135
Marmunti M.	126	Miatello R.	95	Moreno J.E.	61
Marra C.A.	86	Michaut M.	83, 89	Moreno M.	68, 69
Marshall G.	51, 102	Milanesi L.	93	Moreno S.	104, 142
		Milanesio P.	151	Morero R.	155
		Miller J.	125	Morilla M.J.	92, 186

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Morris P.	154
Mosso L.	37
Moutel S.	94
Moya G.	101
Mozzi F.	132
Muglia C.	175
Müller I.	137
Müller M.	182, 183
Müller Röbert B.	144
Munafó D.	70
Muñoz D.	71
Muñoz G.E.	60
Muñoz J.	183
Muñoz L.	183
Muñoz M.J.	54, 80
Muñoz P.	68, 83
Muñoz R.I.	97
Muñoz S.	85
Mura C.	83
Murdoch S.	33
Muriado H.	50, 72
Muro A.C.	134
Muschietti J.	143, 144
Musikant D.	177
Muzzopappa M.	40

N

Nader-Macías M.E.	163, 171
Nadra A.D.	110, 111
Nagel R.	157, 159
Nahmias C.	103
Natalucci C.L.	118, 120
Navarro del Cañizo A.	136, 149
Navarro J.A.	33
Navarro P.	67, 97
Nercessian D.	174
Nervi F.	69, 85, 113
Nestel D.	110
Nilo R.	155
Noain D.	95
Nojek I.	111
Norambuena L.	155
Nores G.A.	120, 121
Nores M.J.	184
Nores R.	109
Nova E.	192
Nowak T.	191
Nowicki C.	182
Nualart F.	82
Nudel B.C.	183
Nudel C.B.	183
Nuñez M.	63
Nuñez M.T.	52, 83
Nuñez -Millacura C.	52, 63
Nuñez V.	41, 63

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
O	
O'Relly D.	178
Obregón M.J.	100
Obregón W.	122
Ocaranza P.	36, 56
Ochoa B.	127
Okada S.	52
Olea N.	78
Olguín P.	66
Oliva C.	138, 148
Oliva H.	63
Oliva H.	63
Oliveira-Cruz L.	113
Oliver G.	168
Olivera N.	119
Oliveros L.	94
Olivieri F.	144, 145, 148
Oneto M.L.	131
Oppezzo O.	156
Orellana A.	62, 155
Orellana M.	102
Orellana O.	48, 58
Orellano E.G.	150
Orrego F.	102
Ortega F.	86
Ortega M.	97
Osorio A.	52
Osses N.	65
Osuna-Fernández R.	54
Otero C.	163
Ottaviani J.I.	100

P

Pacheco R.	63, 67
Pagés M.	43, 146
Paggi R.A.	167
Palacín M.	28
Palacios A.	130
Palacios J.	47, 161
Palacios J.L.	47
Palacios P.	39
Paladini A.C.	99
Palatnik J.	144
Palatnik J.F.	28
Palena C.	107
Pallardó F.V.	34
Panzetta-Dutari G.	109
Pardo M.F.	1120
Paredes R.	72, 186
Paredi M.E.	130
París I.	81
París R.	148
Parodi A.	26, 36
Parussini F.	186

<i>Autor</i>	<i>Página</i>
Pasquini J.M.	106
Passeron S.	104
Patel N.P.	25
Patrino L.	109
Patterson S.I.	117
Pavani M.	85
Pavet. V.	146
Paveto C.	181
Paz C.	105
Pechen D' Angelo A.M.	142, 188
Pediconi M.F.	127
Pedranzani H.	192
Peirano A.	71, 72, 190
Peiru S.	168
Penacino G.	108
Peña-Cortés H.	43, 53, 192
Pennacchiotti G.L.	128
Perales M.	152
Pereira C.	181, 186, 187
Pereyra E.N.	135
Pérez C.	78
Pérez D.D. 34, 51, 102	
Pérez E.A.	189
Pérez M.	83
Pérez P.F.	167
Pérez. P.	77
Pérez-Aguilar R.	94
Pérez-Flores L.	54
Pérez-Pantoja D.	73, 74
Perfetti X.	178
Perrat P.N.	179
Perticari A.	154, 173
Pezza R.	156, 158
Pfinzenmaier K.	122
Piacenza L.	184
Piard J.	160
Picotto G.	92
Pieckenestain F.	145
Pieper D.	73
Piergacomini V.	130
Pilloff M.G.	179
Pimentel F.	77, 113
Pinar M.B.	58
Pincheira M.	97
Pinedo M.L.	150, 151
Pinto R.	78
Pirpignani M.L.	122
Pistorio M.	173
Pitossi F.	112
Pizarro M.	68
Pizarro R.	156
Platero R.	153, 169
Pnacino G.	107
Poderoso C.	105
Podesta E.	56, 105

Al servicio de las Ciencias de la Vida

señalización

cultivo celular

inmunoquímica

biología celular



SIGMA-ALDRICH

DE ARGENTINA S.A.

Biología Molecular

Inmunoquímica

Cultivo Celular

Citoquinas, Factores de
Crecimiento y Hormonas

Biología Celular

Electroforesis

Cromatografía

Química de Proteínas

Reactivos
Generales

 SIGMA®

 ALDRICH®

 Fluka®

 Riedel-de Haën®

 SUPELCO

SIGMA-ALDRICH de ARGENTINA

Av. Pueyrredón 2446 PB C1119ACU Bs. As.
Tel.: (54 11) 4807-0321 0-810-888-7446
(54 11) 4807-0346
E-mail: cservice@sigma-aldrich.com.ar
SIGMA-ALDRICH ARGENTINA S.A. CORPORATIVA

ANEDRA

Sarmiento 1803 (1646) San Fernando
Tel.: (54 11) 4746-9200 Fax: (54 11) 4746-2637
e-mail: ventas@anedra.com.ar

DISTRIBUIDOR OFICIAL DE ARGENTINA

ARQUIMED

Arturo Prat 828 Santiago - Chile
Tel: (56 2) 634-6266 Fax: (56 2) 634-4633
web: www.arquimed.cl
e-mail: ventas@arquimed.cl
DISTRIBUIDOR OFICIAL DE CHILE

Auspiciadores

Alfatron
Amersham-Pharmacia Argentina
Andes Import
Arquimed
Biodynamics
Bios Chile I.G.S.A.
ETC International
Fermelo S.A.
Genesys
Life Technologies
Lobov y Cia. S.A.
Merck Química Chile Ltda.
Pharma Bril
Rainin
W. Reichmann y Cía. Ltda.
Roche
Sigma Aldrich Argentina
TLC Ltda.
Winkler Ltda.

Patrocinantes

DID, Universidad de Chile
Fundación Ciencia para la Vida
Fundación para la Biología Celular
PABMB
Pontificia Universidad Católica de Chile
Universidad Austral