

SOCIEDAD BIOQUIMICA DE CHILE

I REUNION ANUAL

19 - 20 y 21 de Mayo de 1977

SEDE

UNIVERSIDAD DE CHILE - TALCA

PARTICIPANTE

DIRECCION

ANEXO IV.

Informes sobre Reuniones de Sociedades
Científicas

ANEXO IV - 1

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

I Reunión Anual

Esta reunión se realizó en la Universidad de Chile, Sede Talca los días 19, 20 y 21 de mayo de 1977.

PROGRAMA

- I. Simposios sobre regulación biológica: Se realizaron tres sesiones con la participación de los siguientes investigadores:
 - a. Regulación génica
Drs. Jorge Allende, José Minguell, Arturo Yudelevich y Manuel Krauskopf como moderador.
 - b. Regulación neuroendocrina
Drs. Manuel de la Lastra, Elisa Marusic, Juan Roblero y Héctor Croxatto como moderador.
 - c. Regulación de la actividad enzimática
Drs. Jaime Eyzaguirre, Arsenio Morán, Tito Ureta y Hermann Niemeyer como moderador.

- II. Simposios sobre enseñanza: Se realizaron tres sesiones con la participación de los siguientes investigadores:
 - a. Enseñanza de Postgrado
Drs. Orlando Alarcón, Luciano Chiang, Federico Leighton, Hermann Niemeyer y Joaquín Luco como moderador.
 - b. Enseñanza de pregrado en Fisiología y Microbiología
Drs. Juan Concha, Elisa Marusic, Mario Penna y Ramón Rosas.
 - c. Enseñanza de pregrado en Bioquímica
Drs. Jaime Eyzaguirre, Carmen González, Carmen Grado, Leopoldo Pavesi y Aída Traverso como moderador.

III. Avances de tesis doctorales: Presentaron sus trabajos los siguientes investigadores:

María de la Luz Cárdenas, Sergio Basaez, Rodrigo Bravo, Nelson Díaz (este trabajo le sirvió como incorporación a la Sociedad), Raúl Errázuriz, Manuel Krauskopf, Octavio Monasterio y Aldo Solari (a estos dos últimos tesisistas, este trabajo les sirvió como incorporación a la Sociedad).

IV. Incorporación a la Sociedad: Presentaron además trabajos de incorporación a la Sociedad de Bioquímica los siguientes investigadores:

Marco Arancibia, Alicia Carrasco, Luis Corcuera, Benito Gómez, Gustavo González, Carlos Herrera, Oscar León, Carlos Otero, Eduardo Silva, Rosa Troncoso, María Lila Vera y Fernando Zambrano.

De los 15 investigadores que presentaron trabajos de incorporación fueron aceptados 14 como nuevos socios.

ASISTENTES A LA REUNION

Asistieron en total entre 190 y 200 personas desglosados en la siguiente forma:

SANTIAGO

| | | |
|-----------------------|--------------|-----------------|
| Universidad Católica: | 22 docentes, | 7 alumnos |
| Universidad de Chile: | 49 docentes, | 13 alumnos |
| Universidad Técnica : | 1 docente | |
| CONICYT | : | 1 representante |

VALPARAISO

| | |
|-----------------------|------------|
| Universidad de Chile: | 6 docentes |
|-----------------------|------------|

ARICA

| | |
|-----------------------|------------|
| Universidad de Chile: | 2 docentes |
|-----------------------|------------|

ANTOFAGASTA

| | |
|-----------------------|------------|
| Universidad de Chile: | 4 docentes |
|-----------------------|------------|

IQUIQUE

| | |
|-----------------------|-----------|
| Universidad de Chile: | 1 docente |
|-----------------------|-----------|

LA SERENA

| | |
|-----------------------|------------|
| Universidad de Chile: | 4 docentes |
|-----------------------|------------|

CONCEPCION

Universidad de Concepción: 9 docentes, 14 alumnos

TEMUCO

Universidad de Chile : 2 docentes

VALDIVIA

Universidad Austral : 6 docentes

TALCA

Universidad de Chile : 30 docentes, 25 alumnos

Universidad Católica : 5 docentes

Universidad Técnica : 1 docente

TOTAL 143 docentes, 59 alumnos

APORTES PARA EL FINANCIAMIENTO DE LA REUNION

Las siguientes instituciones proporcionaron ayuda:

| | | |
|--|------|-----------|
| CONICYT | : \$ | 5.000.00 |
| Sociedad de Biología de Chile | : | 6.000.00 |
| U. Católica (Vicerrectoría Académica) | : | 4.000.00 |
| Programa Regional de Adiestramiento de Postgrado en Ciencias Biológicas para Países del Area Andina PNUD/UNESCO, RLA 76/006 (Parte de estos fondos fueron proporcionados por la Universidad de Chile a través de este programa). | : | 19.394.48 |

Universidad de Chile, Sede Talca. Aparte de tomar a su cargo la organización local de la Reunión se destacan los siguientes aportes:

- Salas de sesiones y equipos electrónicos y de proyección
- Promoción en prensa y radio
- Transcripción de documentos (resúmenes de los trabajos presentados, los cuales se entregaron a todos los asistentes).
- Impresión del Programa de la Reunión
- Fiesta de Clausura y Casino

- Personal de Secretaría, electricista y personal auxiliar
- 2 buses para transporte de los Congresales los tres días de la Reunión
- Invitación a los Drs. Joaquín Luco, Premio Nacional de Ciencias y al Dr. Héctor Croxatto, Premio de la Academia Pontificia.

Universidad Católica, Sede Talca

- Alojamiento para 14 asistentes
- Almuerzo de Bienvenida

Pensionado Universitario "Irma Salas" Talca

- Alojamiento para nueve alumnos

Universidad de Concepción

- Ayuda para alojamiento y comida para los investigadores que participaron en los Simposios y Bus para el transporte de investigadores y alumnos desde Concepción a Talca y regreso a Concepción.

Universidad Austral de Chile

- Ayuda para alojamiento y comida para algunos investigadores y movilización a Talca ida y vuelta.

Universidad de Chile, Santiago, (Vicerrectoría de Administración)

- 1 bus para transporte de socios a Talca.

Cooperativa CALTYL (Talca)

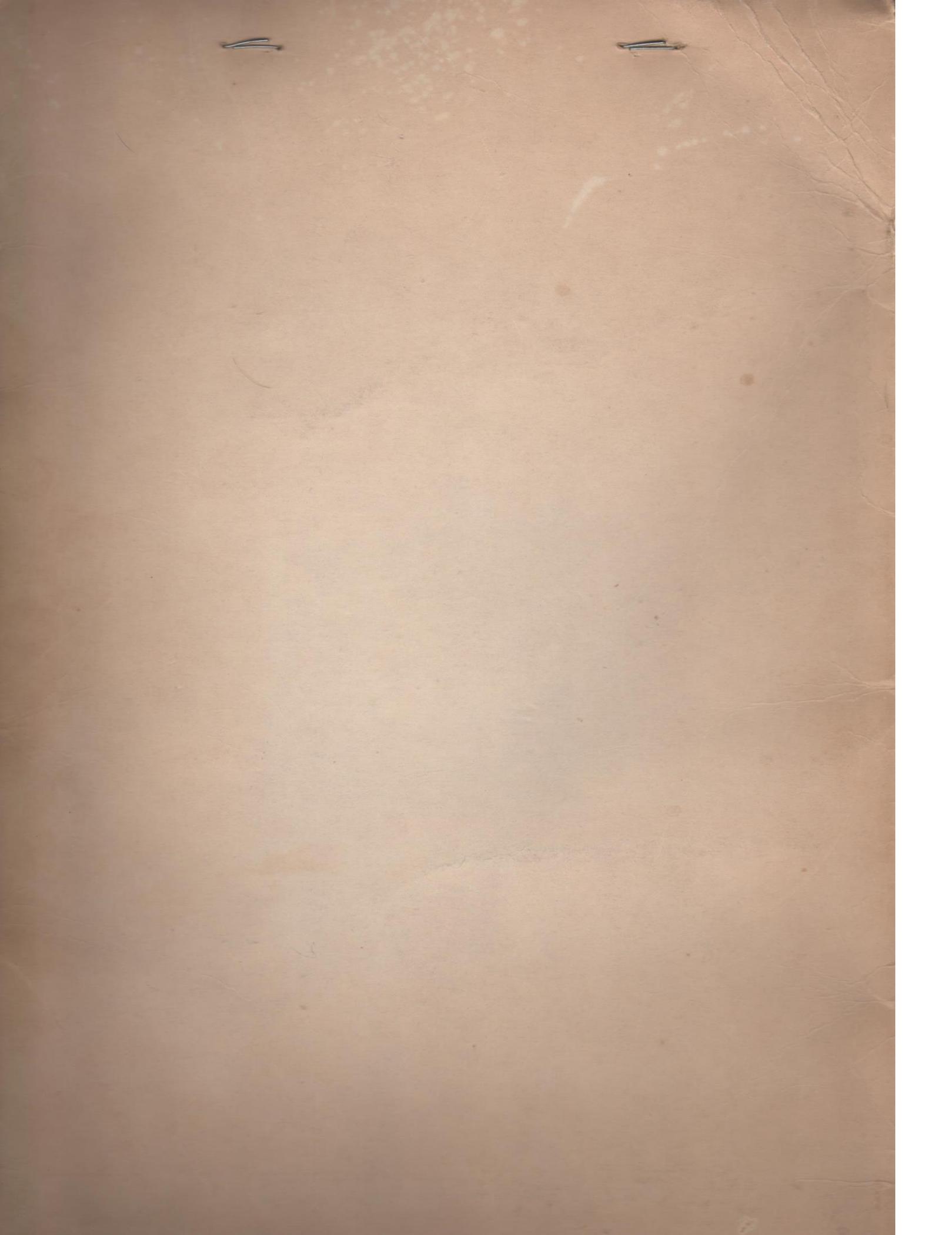
- Confección de carpetas para Resúmenes.

CEREMONIA INAUGURAL

A las 19:15 horas del día jueves 19 se inauguró oficialmente la I Reunión Anual.

El Sr. Víctor Hugo Riedemann, Director del Centro de Investigación Científica de la Universidad de Chile, Sede Talca, dió la bienvenida a los asistentes a esta Reunión, a nombre del Vice Rector de la Sede.

El Presidente de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Dr. Jaime Eyzaguirre inauguró este evento científico. A nom



bre de CONICYT habló el Sr. José Manuel Cousiño, Jefe del Departamento de Fomento de esta Institución.

La Srta. Nelia Fonseca Celmonte, Profesora de Ritmo Auditivo de la Carrera de pedagogía de Educación Musical, le dió el realce musical a esta Ceremonia con varias interpretaciones en piano. La Canción Nacional e Himno de la Universidad de Chile fueron interpretados por el Coro de Camara de la Universidad de Chile, Sede Talca dirigido por el Sr. Claudio Maldonado Díaz, Profesor de Conducción Coral.

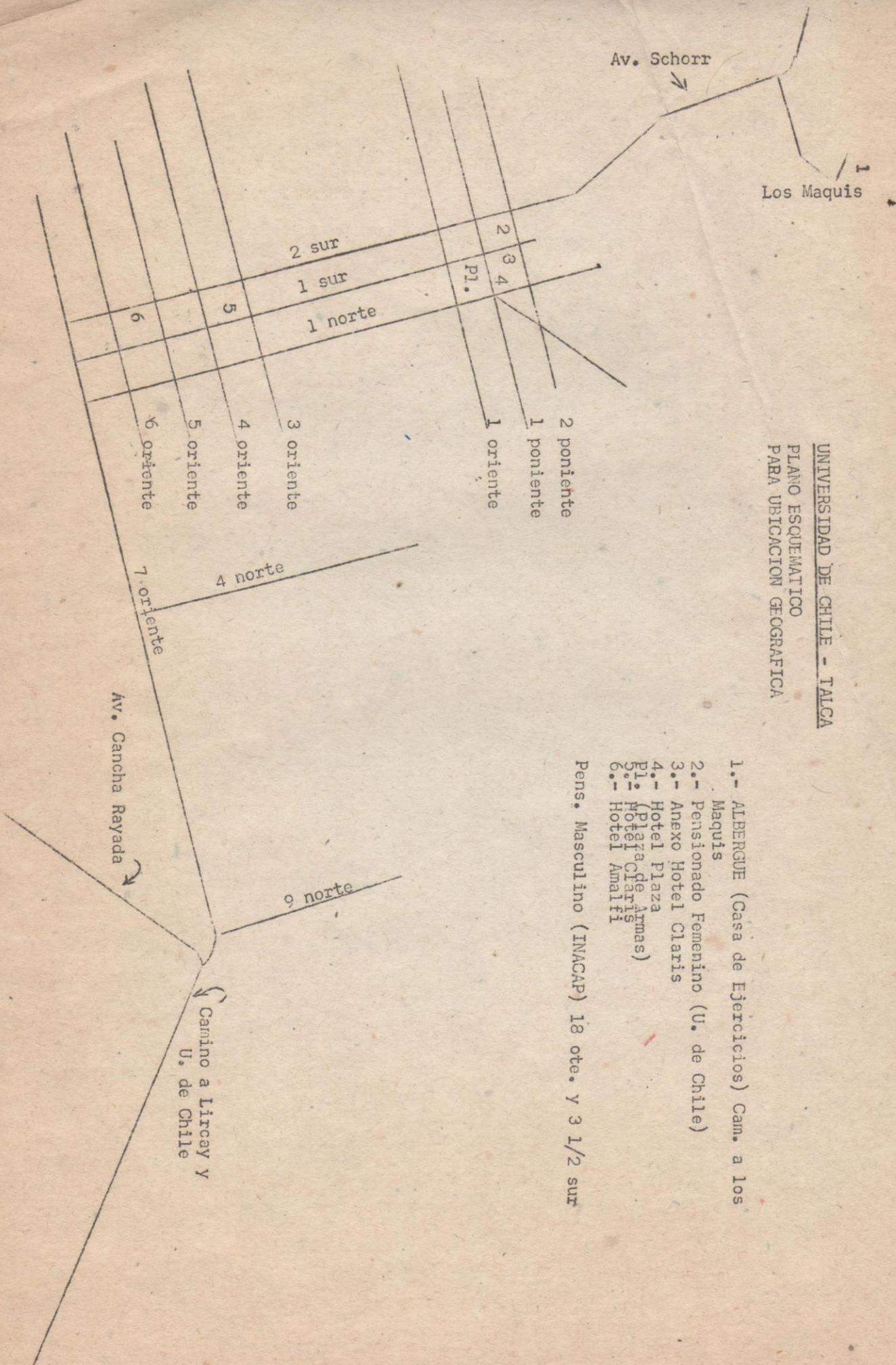
COCKTAIL DE DESPEDIDA

El día 21 de mayo a las 22:00 horas, se ofreció en el Casino de la Universidad de Chile, una amena fiesta de despedida.

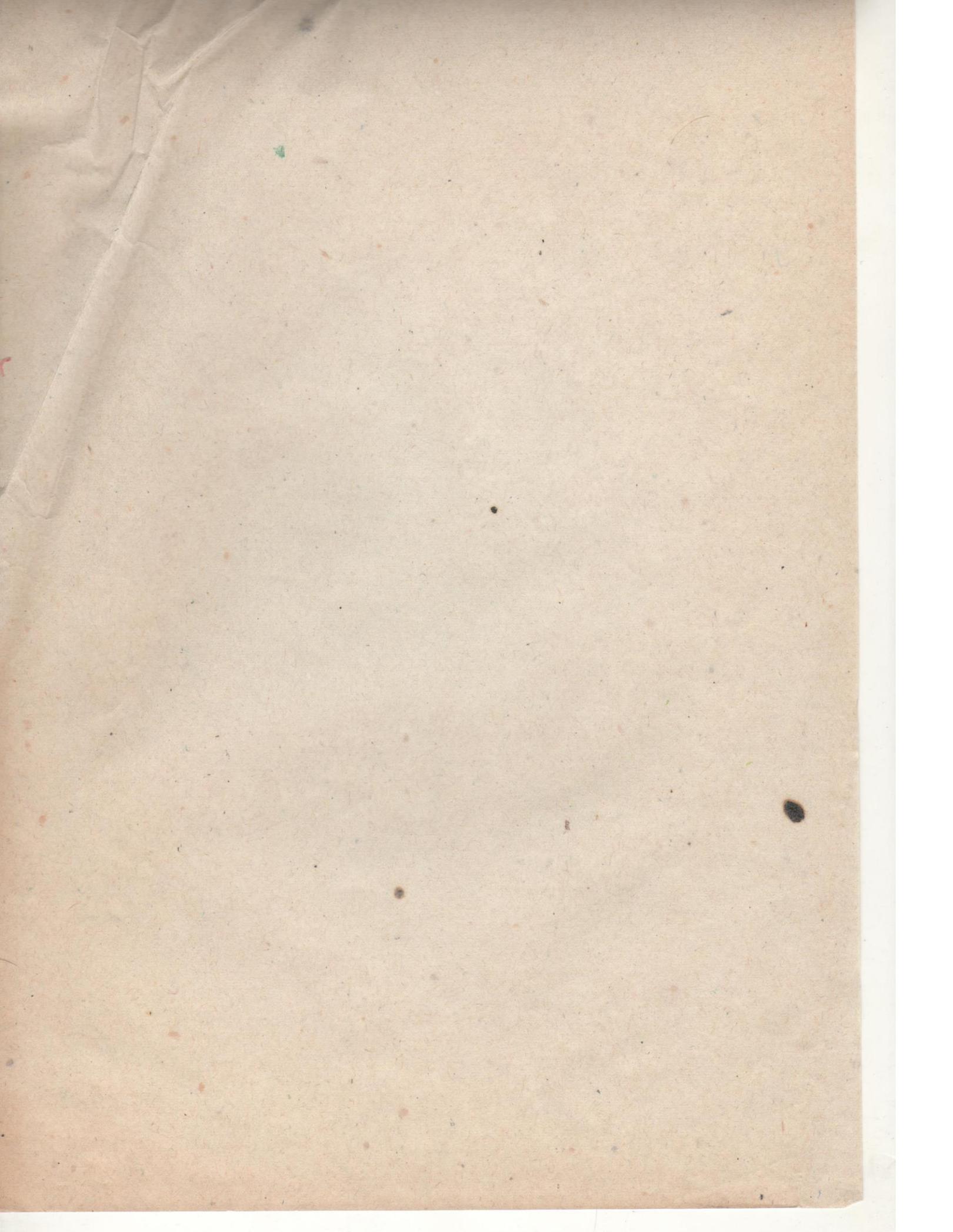
La música estuvo a cargo de la Orquesta "Grupo Musical" de la Carrera de Música de la Universidad. Actuó también el excelente conjunto coral "Armonía" cuyos integrantes son alumnos de la Universidad.

SANTIAGO, Julio de 1977

UNIVERSIDAD DE CHILE - TALCA
 PLANO ESQUEMATICO
 PARA UBICACION GEOGRAFICA



- 1.- ALBERGUE (Casa de Ejercicios) Cam. a los Maquis
- 2.- Pensionado Femenino (U. de Chile)
- 3.- Anexo Hotel Claris
- 4.- Hotel Plaza
- Pl. (Plaza de Armas)
- 5.- Hotel Claris
- 6.- Hotel Amalfi
- Pens. Masculino (INACAP) 18 ote. y 3 1/2 sur



I REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE
Simposio sobre Enseñanza de Postgrado
Universidad de Chile
Sede- Talca

19, 20, y 21 de Mayo de 1977

Esbozo de problemas y lineamientos de posibles acciones en materia de entrenamiento de postgrado, puntos sobre los cuales podría conversarse en esta Asamblea o después en los pasillos.

HERMANN NIEMEYER

1. Existe una diversidad de planes de educación de postgrado en Biología, en cuanto a nivel y a naturaleza de ellos. Por ejemplo, programas más o menos formales de perfeccionamiento de postgrado, de Master o Magister en diversas especialidades, y de Doctorado en Ciencias, con diversas submenciones. Algo de esto se acaba de exponer.
2. Una pregunta condensa una preocupación que con frecuencia surge. ¿Es necesario hacer planes uniformes? A mi entender lo importante sería fijar a escala nacional solo el nivel de las actividades y no tratar de uniformar los planes o programas, de modo que cada uno pudiera tener algunas peculiaridades proporcionales por las características del centro de estudio donde se realizan.
3. Otra pregunta ¿Cual es la capacidad de las universidades chilenas para hacer postgrados y en que disciplinas o áreas? Varias de ellas estarían al parecer en condiciones de desarrollar programas de perfeccionamiento de postgrado en las disciplinas biológicas que nos preocupan, hasta el grado de Magister. No es tan obvia esta capacidad cuando se trata de programas de doctorado, asunto que vale la pena analizar. En la Universidad de Chile, por ejemplo, todavía puede seguir funcionando el Programa de Doctorado en Bioquímica, pero no así el de Fisiología, en el cual está suspendida la aceptación de nuevos postulantes por reducción del número de investigadores necesarios para atenderlos, por debajo de lo que se considera masa crítica. En Microbiología no hay programa formal, pero parece urgente fomentar la formación de microbiólogos en el país al nivel de doctorado.

4. Para el desarrollo de los programas de doctorado me parece indispensable la existencia de grupos diversos de investigadores en la disciplina, lo hace indispensable la estrecha colaboración de todos los científicos del país que trabajan en ella, ya que no existen centros aislados que puedan cubrir una gama rica de temas de investigación, base de un doctorado. ¿ Como fomentar esa colaboración ? ¿ Es necesaria una acción más allá de la meramente personal?
5. Profesores y alumnos del doctorado debieran tener facilidades para su movilización dentro del país para enseñar y aprender en cursos y seminarios y para participar en proyectos de investigación en otros centros nacionales. ¿ Qué debe proponerse y a quién para cumplir este objetivo?
6. La evaluación de los recursos humanos necesarios para ejecutar a satisfacción los programas de doctorado, saldrá espontáneamente de la encuesta sobre grupos de investigación, que está realizándose. Hay que diseñar un mecanismo que permita mantener al día esta encuesta, lo que permitiría conocer el flujo de investigadores desde Chile al exterior y desde afuera hacia Chile, así como desde los centros de investigación hacia otras instituciones. ¿Cuál sería este mecanismo? es un tema por discutir.
7. Al establecer el tamaño actual de los grupos de investigación en diversas áreas y subáreas de las ciencias biológicas, será una tarea proponer mecanismos para lograr en plazos prudentes, aumentar o crear grupos que realicen investigación y docencia superior en áreas que aparezcan deficitarias. Es forzoso identificar esas áreas, lo que es otra tarea, sobre la cual pueden desde ya iniciarse conversaciones. Es necesario discutir también cuáles pueden ser esos mecanismos enriquecedores de recursos humanos, para así proponerlos a las universidades a los gobiernos y a las organizaciones internacionales.
8. Por ejemplo, podría ser necesario reforzar con científicos provenientes del exterior algunas áreas específicas en cada disciplina, mientras en otras posiblemente sea necesario enviar al extranjero a jóvenes que hayan completado la formación que el país puede darles. Hay que dar precisión a estas ideas. Parece imprescindible aumentar los esfuerzos para conseguir el retorno de científicos chilenos ya formados que se encuentran en el extranjero. Muchos de ellos desean volver, si se les garan-

tizan facilidades de trabajo y medios de subsistencia razonables. Hay que preocuparse de saber quienes son, cuando se vendrían y qué puede ofrecérseles.

9. Del análisis de las encuestas sobre estudios universitarios de pregrado resulta sin duda la necesidad de incrementar la formación de postgrado de los docentes. Sería conveniente estudiar y proponer, no se a quien un sistema de becas que permitiera o facilitara esta actividad.
10. Un aspecto importante sobre el cual deberemos informarnos es el del destino actual y futuro de nuestros estudiantes de postgrado. Imagino que también lo será con respecto a los estudiantes de pregrado vinculados por principio directamente a la investigación biológica. ¿ Quien los utiliza en este momento? ¿ Quien los utilizará en un futuro cercano previsible? ¿ Estamos formando gente para trabajar en el exterior? ¿ La universidad chilena? ¿ los necesita? Y si los necesita ¿dispondrá de los recursos para disponer de ellos? La industria chilena ¿ los necesita?
11. Un último problema que tendremos que discutir en algún momento es el de los recursos materiales necesarios para la investigación científica y para la formación de investigadores y profesionales de buen nivel. No es asunto baladí por cierto y deberemos abordarlo con seriedad y precisión, informando a universidades, gobiernos y organizaciones internacionales de nuestro estado de cosas y de las necesidades previsibles en un futuro inmediato.

Dejo al Señor Presidente que decida, por donde empezar en esta sucesión, un tanto desarticulada, de preguntas y problemas por analizar. Con toda seguridad, de la conversación surgirán otros nuevos y más interesantes. De eso se trata. Espero que el análisis de todo el material de datos e ideas que recojamos en el transcurso del año nos permitirá elaborar con seriedad un plan de desarrollo de la Biología en el país.

HNF.cbg.

Otra meta es analizar los sistemas formales que contribuyen a la formación de investigadores en biología básica, es decir, examinar los planes de estudio y los grupos de docencia universitarios que los sustentan. Es fácil comprender que hagamos un experimento que nos permita explicar un poco el sentido que se da por la enseñanza de postgrado, especialmente en las carreras claramente profesionales. Esta es la realidad de la Región Andina, donde los profesores de enseñanza media los que enseñan biología, sin que existan necesidades específicas.

I REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

Simposio sobre Enseñanza de Postgrado

Universidad de Chile

Sede-Talca

19, 20 y 21 de Mayo

EXPLICACIONES SOBRE LOS SIMPOSIOS DE ENSEÑANZA

Nuestro país no ha escapado a esta realidad, lo que es notorio en la generación mayor de investigadores chilenos, aunque aquí hay ahora y no desde hace mucho tiempo, los destinados a formar investigadores. De esta manera, nos preocupamos por algunos aspectos de la enseñanza de biología en carreras profesionales, incluyendo una elevación del cuerpo docente en algunas profesiones.

Hermann Niemeyer
Presidente de la Comisión Nacional
Coordinadora en Chile del Programa
Regional RIA 76/006

En esta primera Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile destinada fundamentalmente a la presentación de trabajos de investigación bioquímica, estamos haciendo un experimento nuevo. No se trata de medir algunos parámetros de una reacción enzimática curiosa, sino de preocuparse de la enseñanza de algunas disciplinas biológicas básicas y de hacer participar en esta preocupación a docentes universitarios de todo el país. Como es habitual, no sabemos cual será el resultado del experimento, pero, como de costumbre, lo emprendemos con la ingenuidad y la fé de que va a resultar bueno, "publicable" se diría en jerga de laboratorio.

Dentro de las actividades del programa Regional de Adiestramiento de Postgrado en Ciencias Biológicas para Países del Area Andina PNUD-UNESCO, RIA 76/006, los gobiernos de los países participantes adquirieron el compromiso de presentar a los organismos internacionales en el plazo de dos años un plan de desarrollo de la biología básica en la Región Andina; Tremenda y aplastante tarea! Pero, bajo la conducción atinada del Coordinador Técnico del Programa Regional, Dr. Jorge E. Allende, se está procediendo con calma, por etapas con ánimos de ser eficientes.

Una de las metas del presente año es realizar un catastro de los grupos de investigación en biología básica en el país, para lo cual se está haciendo una encuesta sencilla que tiende a la identificación de centros de investigación biológica y a la evaluación aproximada de la productividad de los científicos que allí trabajan. El estilo del formulario fué establecido en el seno del Comité Directivo del Programa Regional, ya que será utilizado en los seis países participantes.

Otra meta es analizar los sistemas formales que contribuyen a la formación de investigadores en biología básica, es decir, examinar los planes de estudio y los grupos de docentes universitarios que los cumplen. Es fácil comprender que hagamos un análisis de los programas de postgrado existentes o en proyecto, asunto que abordaremos hoy. Pero es forzoso explicar un poco el sentido que tiene la preocupación por la enseñanza de postgrado, especialmente cuando se trata de carreras claramente profesionales. Esta inquietud se origina en la realidad de la Región Andina, donde es muy frecuente que sean médicos, farmacéuticos, agrónomos, veterinarios o profesores de enseñanza media los que hacen investigación en biología básica, sin que existan mecanismos propios destinados a la formación de científicos. Nuestro país no ha escapado a esta realidad, lo que es notorio en la generación mayor de investigadores chilenos, aunque aquí hay ahora y no desde hace demasiados años, Facultades o Institutos destinados a formar investigadores y a otorgar grados académicos. De esta manera, nos sentimos obligados a indagar sobre algunos aspectos de la enseñanza de ciencias básicas en carreras profesionales, incluyendo una apreciación del cuerpo docente en algunos parámetros muy fundamentales.

Con este propósito se han realizado unas encuestas muy simples, analizables por computación y que pueden ser útiles en todos los países participantes en el Programa Regional. Sus resultados serán presentados en Simposios de enseñanza adjuntos a reuniones científicas de carácter nacional.

En esta Reunión de la Sociedad de Bioquímica, en asociación con la Sociedad de Biología de Chile, trataremos aspectos de la enseñanza de Bioquímica, Fisiología y Microbiología fisiológica. A principios de Septiembre, en el seno de la Sociedad de Genética, también en conjunto con la Sociedad de Biología, se analizará la enseñanza de Genética, Biología Celular, Anatomía macro y microscópica y Biología del desarrollo. Por último, en la clásica Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile y con la activa participación de otras Sociedades científicas chilenas, se abordará la enseñanza de Botánica, Ecología y Zoología.

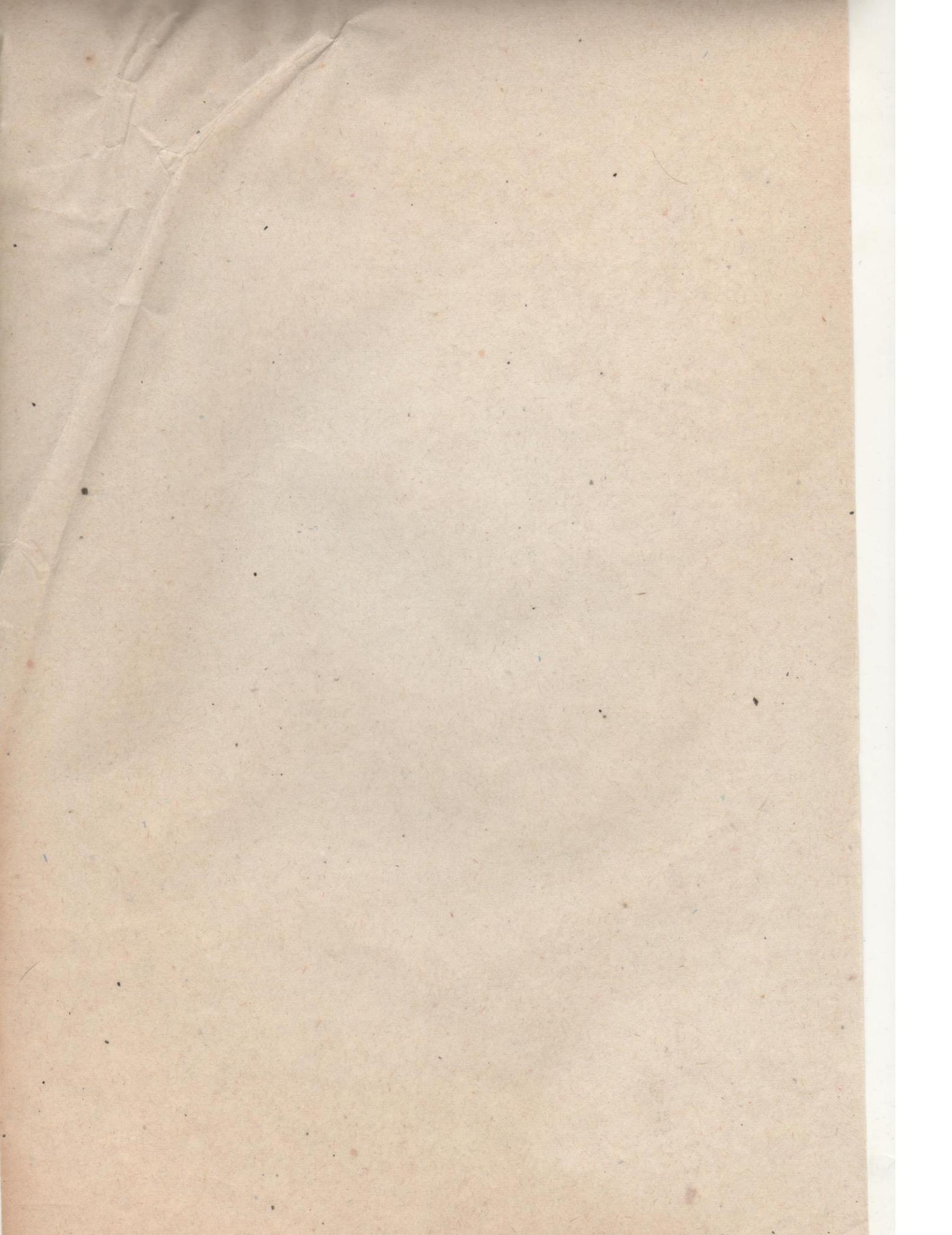
No nos preocuparán los detalles programáticos ni saber si la enseñanza es adecuada para la formación de los profesionales a los cuales está destinada. El tema fundamental es el aprovechamiento de la base biológica, con sus acompañantes de fí-

sica, matemática y química de esas carreras para contribuir a la formación de biólogos en sus múltiples especialidades

Una última meta propuesta para este año es plantear problemas que pueden ser derivados de las encuestas y de la conversación comunitaria en los Simposios. De aquí derivarán tareas para buscar sus soluciones y que deberemos cumplir durante el próximo año, hasta llegar a la elaboración del plan solicitado sobre desarrollo de la Biología básica en el país y luego en la Región.

Tenemos seguridad de que la contribución de cada uno de los participantes en esta Reunión va a resultar de mucho beneficio a la consecución de los propósitos señalados. Doy gracias en forma anticipada por estas contribuciones.

HNF.cbg.



Trabajo de Incorporación

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL APARATO DE GOLGI

(Biochemical characterization of the Golgi complex)

M. Rojas, M. González, M. Morales, E. Brandan, E. González, R. Persico y F. Zambrano
Laboratorio de Fisiología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Area Santiago Oriente.

El aparato de Golgi es química y enzimáticamente distinto a los otros organelos subcelulares. Para hígado y riñón de rata, la galactosiltransferasa es enzima marcadora del complejo golgiano, envuelta en la modificación de glicoproteínas durante la secreción. Además de lipoproteínas y glicoproteínas el complejo golgiano está envuelto en la secreción de albúmina, una simple proteína. Sin embargo, no participa en la síntesis de esfingomiélin, fosfatidilcolina, o triglicéridos presentes en las lipoproteínas secretadas. En riñón, el cual es rico en glicolípidos, la PAPS:cerebrósido sulfotransferasa, está localizada predominantemente en el aparato Golgi. Evidenciándose con lo anterior, la función golgiana de modificar glicolípidos como también mucopolisacáridos y proteínas.

El presente trabajo está orientado a demostrar que la calicreína, agente hipotensor es secretada por el aparato de Golgi y un posible rol de sulfátidos en membranas plasmáticas.

La fracción golgiana es obtenida homogenizando riñón con 52% de sacarosa en buffer. 1 M Na fosfato pH 7.1 con posterior gradiente ascendente discontinua de sacarosa de 43.7, 38.7, 36.33 y 29% centrifugada a 100,000g por 60' en rotor S.W 25.2. La interfase 29/33 es rica en Golgi con su morfología típica al M.E. y enzimáticamente representa un \pm 70% de pureza.

Los resultados preliminares señalan que: la calicreína, glicoproteína renal, sería secretada o biosintetizada en el aparato de Golgi y el sulfátido sería responsable de la actividad Na K ATPasa sensible a ouabaina y no fosfatidilserina como se postula; además participaría en el transporte activo de Na y K.

Trabajo de Incorporación

ENERGIA Y EFECTO FOTODINAMICO EN LISOZIMA

Energy and Photodynamic effect in lysozyme

EDUARDO SILVA S.

Depto. de Macromoléculas, Instituto de -
Ciencias Químicas, Universidad Católica -
de Chile.

En trabajos anteriores se ha demostrado, que la mayor efectividad de la fotooxidación de lisozima sensibilizada por riboflavina (Rb) en relación a la obtenida con azul de metileno (mb), se debe a la formación de un complejo foto inducido entre la proteína y Rb. Continuando este estudio comparativo, se abordó el rol de la energía en el mecanismo de acción de estos dos sensibilizadores.

Lisozima se irradió con luz monocromática en presencia de Mb (621 nm) o Rb (452 nm) siendo la dosis de irradiación iguales a 21,3 J/m² seg. y 6,3 J/m² seg. respectivamente.

Irradiaciones realizadas a 38, 28, 18 y 4°C, muestran que la constante de reacción para la inactividad de la enzima, se comporta de acuerdo a Arrhenius en el caso de Mb y como anti-Arrhenius en presencia de Rb. Esto indica que probablemente la etapa de la reacción que comprende la formación de un complejo entre lisozima y Rb, se ve favorecida al descender la temperatura. Soluciones de lisozima que fueron irradiadas en estado sólido a -20°C y sometidas a la acción de la luz estando los respectivos colorantes presentes, mostraron también la fotoinactivación, siendo esta última mayor en el caso de las irradiaciones realizadas empleando Rb como sensibilizador. Esto refuerza una vez más, que el complejo proteína colorante, favorece la transferencia energética incluso en condiciones de baja energía y gran rigidez.

Se estudió el efecto del cociente de dosis absorbida (E/Mol min) sobre los rendimientos cuánticos referidos a la inactivación enzimática, observándose mayores rendimientos a dosis de absorción más altas. Este hecho se puede interpretar basándose en la presencia de reacciones en cadena, en la cual estarían involucrados fenómenos de transferencia de energía. Relacionando los valores de los rendimientos cuánticos y las intensidades energéticas de absorción a diferentes concentraciones de Rb, es posible demostrar que la Rb altera durante la fotooxidación, pierde sus propiedades como sensibilizador y por lo tanto la mayor efectividad de este colorante se debería exclusivamente a la formación de un complejo con la proteína.

Trabajo de Incorporación

ESTUDIOS IN VITRO DE LA UNIÓN DE TESTOSTERONA A DNA

In vitro studies on the binding of testosterone to DNA

ROSA TRONCOSO L., JOSE MINGUELL U.
(División de Bioquímica y Biofísica, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

En la mayoría de los tejidos estudiados testosterona (T) migra del citoplasma al núcleo asociada a un receptor del citosol, el que al unirse a cromatina regula el metabolismo del RNA nuclear. Sin embargo en médula ósea de rata solamente en el núcleo se ha encontrado receptor. Para plantear un modelo de acción de la hormona a nivel de cromatina es necesario aclarar el papel del receptor nuclear. T. se une a DNA y/o proteínas de la cromatina?. La presencia del receptor, aumenta la afinidad de T a DNA o a cromatina?.

El DNA se preparó a partir de núcleos aislados de médula ósea por salificación y detergente y se denatura por alcalinización y neutralización. La unión de T a DNA se midió por equilibrio de diálisis, ultracentrifugación o retención por filtros de DEAE-celulosa.

Se comprueba por equilibrio de diálisis y ultracentrifugación la unión de ³H-Testosterona a DNA denaturado. El sistema de filtros DEAE-celulosa-DNA también permite detectar unión, pero no da valores constantes. Testosterona se une tanto a DNA como a Cromatina, siendo menor la unión en este último caso. La adición de receptor nuclear al sistema no modifica el grado de unión.

Los resultados obtenidos demuestran la unión de testosterona a DNA denaturado. No es posible distinguir diferentes sitios de unión o sitios de alta afinidad. La baja unión de testosterona a cromatina demuestran que la mayoría de los sitios de unión estarían cubiertos. El hecho que el receptor no aumente la unión de T a DNA o a Cromatina, sugiere que la hormona libre es la que actúa a nivel de DNA y que el receptor es una forma de almacenamiento de la hormona a nivel nuclear.

Trabajo de Incorporación

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE ENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA Y DE
N-ACETIL-GLUCOSAMINA EN DERIVADOS INMOVILIZADOS EN SEFAROSA

(Affinity chromatography of D-glucose and N-acetyl-D-glucosamine phosphorylating enzymes on glucosamine derivatives immobilized on Sepharose)

OSCAR LEON y HERMAN NIEMEYER
(Departamento de Bioquímica, I.C.M.B.
Universidad de Concepción y Departamento
de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile)

Se estudió el comportamiento cromatográfico de tres enzimas fosforilantes de glucosa (A,B,D) y de N-acetilglucosamina-quinasa en derivados de sefarosa, que contienen glucosamina inmovilizada por medio de dos espaciadores, los ácidos 6-aminohexanoico y N-etilsuccinámico. Estos difieren en algunas propiedades, pero no significativamente en longitud, pudiendo influir en el proceso cromatográfico.

La sefarosa-6-aminohexanoil-2-desoxiglucopiranososa (I) se preparó a partir de CH-Sepharose que ya posee unido el ácido 6-aminohexanoico, al cual se fijó D-glucosamina por medio de la 1-etil-3(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). La sefarosa-N-etilsuccinamil-2-amino-2-desoxiglucopiranososa (II) se preparó a partir de CNBr-Sepharose 4B (sefarosa activada), tratándola con etilendiamina y anhídrido succínico, y la glucosamina se fijó con EDC.

La reacción de la sefarosa I con TNES (trinitrobenceno-sulfonato) sugirió la aparición de grupos amino protonados después de fijar la glucosamina, los que afectarían la cromatografía de la glucoquinasa. Esta interferencia se eliminó por acetilación con anhídrido acético de la sefarosa I, obteniéndose la sefarosa III.

En ausencia de KCl, hexoquinasa A de cerebro de rata no fue retenida en sefarosa III y hexoquinasa B, de músculo de rata, fue retenida parcialmente. La fracción retenida de hexoquinasa B eluyó con KCl con un máximo a 90 mM en un gradiente 0-300 mM. A una concentración de KCl 50 mM, glucoquinasa de hígado de rata y N-acetilglucosamina-quinasa (NAGA-quinasa) de bazo de rata y de vaca fueron totalmente retenidas. Glucoquinasa pudo ser eluida con glucosa 1M o con KCl 80 mM. NAGA-quinasa fue eluida parcialmente con N-acetilglucosamina 200 mM y totalmente con KCl a un máximo de 150 mM en un gradiente 0-300 mM. Al sembrar simultáneamente glucoquinasa y N-acetilglucosamina-quinasa en sefarosa III, ambas fueron retenidas a 50 mM KCl, pero solo la glucoquinasa eluyó con glucosa 1M. NAGA-quinasa fue eluida parcialmente con N-acetilglucosamina 200 mM y totalmente con KCl 200 mM.

En ausencia de KCl, hexoquinasa A no fue retenida en sefarosa II. Glucoquinasa fue retenida sólo parcialmente en ausencia de KCl y en presencia de KCl 50 mM y fue eluida tanto con glucosa 1M como con KCl con un máximo a 80 mM en un gradiente 0-300 mM. Hexoquinasa B y NAGA-quinasa fueron completamente retenidas en sefarosa II. Hexoquinasa B eluyó parcialmente con un gradiente de KCl 0-300 mM, y eluyó totalmente con glucosa 8mM. NAGA-quinasa eluyó completamente con N-acetilglucosamina 200 mM.

Los resultados indican que: 1) La naturaleza del espaciador influye en la conducta cromatográfica de las enzimas estudiadas en los derivados de sefarosa. 2) Al seleccionar apropiadamente las condiciones experimentales de retención y elución, sefarosa II es recomendable para la purificación de hexoquinasa B y N-acetilglucosamina-quinasa, y sefarosa III es excelente para la purificación de glucoquinasa.

FORMACION DE MOLECULAS RECOMBINANTES DE DNA Y SU EXPRESION GENICA
EN DIVERSOS SISTEMAS

Formation and genic expression of recombinant DNA molecules in several systems

Arturo Yudelevich S.

Laboratorio de Bioquímica. Departamento de Biología Celular, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.

Se discutirán varias técnicas para la obtención "in vitro" de moléculas recombinantes de DNA y como pueden ser estas clonadas y propagadas en sistemas vivo.

Se dará un énfasis especial a la expresión funcional de éstas moléculas recombinantes en distintas especies y a la regulación de este fenómeno.

REGULACION POST - TRANSCRIPCIONAL

Post-transcriptional regulation

Jorge E. Allende

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina (Norte)
Universidad de Chile

En procariontes las evidencias experimentales indican que la regulación de la expresión genética se efectúa principalmente a nivel de la transcripción.

En células superiores, sin embargo, la regulación post-transcripcional juega un papel importante en varios procesos como en el gatillamiento de la síntesis proteica en embriones animales y en la germinación de semillas vegetales. Algunas hormonas también parecen actuar a nivel post-transcripcional en sus efectos inductivos.

Se discutirán varios posibles mecanismos de regulación post-transcripcional - relacionada con:

- a) Procesamiento de mRNA;
- b) Estructura secundaria del mRNA;
- c) Represión de de secuencias iniciadoras del mRNA;
- d) Disponibilidad de componentes de la traducción, y
- e) Inhibición y desinhibición de ribosomas y factores de iniciación en la traducción.

MECANISMOS REGULATORIOS DE LA DIFERENCIACION CELULAR

Regulator y Mechanisms of cell differentiation

José Minquell

División de Bioquímica y Biofísica, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Universidad de Chile.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la diferenciación celular es muy escaso aún. Las dificultades para su estudio se derivan de la falta de algún modelo biológico simple que haga posible establecer las bases moleculares de esta acción. De entre los modelos biológicos más utilizados puede mencionarse el mecanismo hemopoyético y el oviducto del pollo, los cuales representan fenómenos típicos de diferenciación celular y de su regulación a nivel de la expresión génica.

I) Mecanismos Hemopoyético: Las células basales originan diversas líneas celulares que producen eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Las señales químicas que provocan la diferenciación hacia estas células son poco conocidas a excepción de la eritropoyesis. La hormona eritropoyetina (EP) induce este proceso cuando es reconocido por una célula sensible a la eritropoyetina (CSE) la que comienza a diferenciarse iniciando una serie de reacciones bioquímicas cuya determinante final es la síntesis de hemoglobina. Se postula que la CSE responde a la hormona en la fase G₂ y que esta acción no implica síntesis previa de DNA. La testosterona actuaría también a nivel de las CSE acelerando el ciclo celular, a fin de amplificar el número de CSE.

Los eventos moleculares provocados por ambas hormonas son la síntesis de un RNA heterogeneo de gran tamaño y de RNA ribosomal.

En base a un modelo experimental se postula la acción sinérgica de ambas hormonas tendientes a generar y controlar la síntesis de hemoglobina.

II) Oviducto de Pollo: El crecimiento, diferenciación y desarrollo del oviducto es inducido por estrógenos que llevan a la síntesis de ovoalbúmina. La progesterona también afecta el crecimiento durante un período definido. Esta hormona es reconocida por dos receptores citoplasmáticos, las cuales en forma de complejos hormona-receptor se combinara con RNA polimerasas y sitios aceptores en la cromatina, generando ovoalbúmina y avidina.

En base a estos dos modelos se presentarán una serie de ideas tendientes a explicar el mecanismo de diferenciación celular.

Trabajo de Incorporación

LA SECUENCIA AMINOACIDICA DE LA PREALBUMINA DE SUERO HUMANO

(The aminoacid sequence of human serum prealbumin)

Gustavo González y Robin E. Offord, Departamento de Química, Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales, Universidad de Chile, Valparaíso y Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Zoology, Oxford University, England.

La prealbúmina es la proteína involucrada en el transporte de las hormonas tiroideas y de la vitamina A en el plasma. Mientras la prealbúmina une directamente tiroxina y triioditironina, la unión de la vitamina A está mediada por otra proteína transportadora, la proteína que une retinol o RBP. La vitamina A está unida a la RBP la que a su vez está unida a la prealbúmina. Esta última posee dos sitios de unión para la tiroxina y cuatro para la RBP. La prealbúmina es un tetrámero compuesto de cuatro subunidades idénticas y de peso molecular 13.700. La determinación de la secuencia aminoacídica de la prealbúmina es necesaria para poder relacionar la estructura con la función, saber que partes de la molécula son las responsables de la capacidad que tiene la proteína para efectuar su función.

La estrategia ^{utilizada} para secuenciar la prealbúmina consistió en digerir la proteína con tripsina. Los péptidos resultantes en una primera etapa se purificaron por filtración en gel en una columna de Sephadex G-50. Las fracciones obtenidas se purificaron por cromatografía en papel y por electroforesis de alto voltaje en papel. Los péptidos trípticos resultantes se secuenciaron por el método "dansilo-Edman". Los péptidos de más de diez aminoácidos se fragmentaron previamente a su secuenciación. El ordenamiento de los péptidos trípticos se efectuó determinando el péptido N-terminal, el péptido C-terminal y caracterizando los péptidos quimotrípticos y pépticos de la prealbúmina completa.

Los resultados obtenidos permitieron determinar la secuencia completa de la prealbúmina utilizando la técnica de identidades parciales para el ordenamiento de los péptidos trípticos.

Con el conocimiento de la secuenciación de la prealbúmina es posible explicar algunas características químicas de la prealbúmina y dar el aporte necesario para la construcción del modelo tridimensional de la molécula.

Trabajo de Incorporación
DESHIDROGENASA DE D-ARABINOSA EN MUTANTES MORFOLO-
GICAS DE NEUROSPORA CRASSA

(D-arabinose dehydrogenase in morphological mutants
of Neurospora crassa)

Alicia Carrasco, Guido Pincheira y Tito
Ureta, Depto. de Biología, Facultad de -
Ciencias, Universidad de Chile.

Las características morfológicas del hongo Neurospora crassa dependen en gran parte, de la fisiología de la pared celular, constituida de un 60% de Hidratos de Carbono. La identificación y caracterización de enzimas relacionadas con el metabolismo de estos compuestos es de interés ya que se pueden presentar alteraciones que se relacionan con cambios morfológicos del micelio, como ocurre por ejemplo con glucosa 6-P deshidrogenasa y fosfoglucomutasa.

Utilizando la técnica de electrofóresis en gel de poliacrilamida se ha detectado la presencia de la deshidrogenasa de D-arabinosa-NAD. La enzima ha sido estudiada en la cepa standard 74-A (St. Lawrence) y en mutantes morfológicas. En tres de estas mutantes: col-13, col-15 y col-16, se encuentra una mayor actividad de deshidrogenasa de D-arabinosa. La movilidad electroforética y cromatográfica, parámetros cinéticos ($k_{arabinosa}$, k_{NAD} , especificidad de sustrato, pH óptimo, inactivación al calor)^m y físico-químico (peso molecular), no muestran diferencias en la enzima aislada de cepa silvestre y mutantes. Estos resultados sugieren que la enzima es la misma en Neurospora tipo silvestre y mutantes y que probablemente la alteración se deba a que los mecanismos de regulación de cantidad de enzima son los alterados.

Se han realizados estudios genéticos tendientes a determinar los centros de control estructural de la enzima, mediante cruzamientos y construcción de heterocariones. Estos nos indican que las alteraciones enzimáticas están determinadas por un par de alelos; que las características del tipo silvestre son dominantes sobre las alteraciones exhibidas por las mutantes y nos confirman que la alteración de actividad enzimática evidenciados por las cepas mutantes están determinados por una alteración de los centros de control que regulan la producción de enzima y no dependen de un control estructural por los genes de morfología.

Trabajo de Incorporación
DESHIDROGENASA DE D-ARABINOSA EN MUTANTES MORFOLO-
GICAS DE NEUROSPORA CRASSA

(D-arabinose dehydrogenase in morphological mutants
of Neurospora crassa)

Alicia Carrasco, Guido Pincheira y Tito
Ureta, Depto. de Biología, Facultad de -
Ciencias, Universidad de Chile.

Las características morfológicas del hongo Neurospora crassa dependen en gran parte, de la fisiología de la pared celular, constituida de un 60% de Hidratos de Carbono. La identificación y caracterización de enzimas relacionadas con el metabolismo de estos compuestos es de interés ya que se pueden presentar alteraciones que se relacionan con cambios morfológicos del micelio, como ocurre por ejemplo con glucosa 6-P deshidrogenasa y fosfoglucomutasa.

Utilizando la técnica de electrofóresis en gel de poliacrilamida se ha detectado la presencia de la deshidrogenasa de D-arabinosa-NAD. La enzima ha sido estudiada en la cepa standard 74-A (St. Lawrence) y en mutantes morfológicas. En tres de estas mutantes: col-13, col-15 y col-16, se encuentra una mayor actividad de deshidrogenasa de D-arabinosa. La movilidad electroforética y cromatográfica, parámetros cinéticos (k_m arabinosa, k_m NAD, especificidad de sustrato, pH óptimo, inactivación al calor)^m y físico-químico (peso molecular), no muestran diferencias en la enzima aislada de cepa silvestre y mutantes. Estos resultados sugieren que la enzima es la misma en Neurospora tipo silvestre y mutantes y que probablemente la alteración se deba a que los mecanismos de regulación de cantidad de enzima son los alterados.

Se han realizados estudios genéticos tendientes a determinar los centros de control estructural de la enzima, mediante cruzamientos y construcción de heterocariones. Estos nos indican que las alteraciones enzimáticas están determinadas por un par de alelos; que las características del tipo silvestre son dominantes sobre las alteraciones exhibidas por las mutantes y nos confirman que la alteración de actividad enzimática evidenciados por las cepas mutantes están determinados por una alteración de los centros de control que regulan la producción de enzima y no dependen de un control estructural por los genes de morfología.

Trabajo de incorporación

ESTUDIOS DE AMINOACIL-tRNA SINTETASAS EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS

(Studies on aminoacyl-tRNA synthetases in Xenopus Laevis oocytes)

Marco Arancibia y Jorge E. Allende
Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile

Con el objeto de determinar si las aminoacil-tRNA sintetisas reflejan in vitro las propiedades que in vivo ellas poseen, se usó en oocitos el método descrito por Deutscher y colaboradores para estudiar las aminoacil-tRNA sintetisas presentes en células animales que habían sido tratadas con tolueno para hacerlas permeables a sus sustratos incluyendo tRNA.

En los tratamientos con tolueno grupos de 50 oocitos se agitan suavemente con solución salina de anfibios que contiene tolueno (0.2 a 10%) durante 2 minutos a 0°. Para ensayar la aminoacilación se incuban los oocitos tratados con una mezcla para el ensayo normal de las aminoacil-tRNA sintetisas conteniendo ATP, tRNA y aminoácido radiactivo y se mide la incorporación de la radiactividad a material precipitable con ácido tricloroacético al 5%.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con tolueno a diferencia de lo observado por Deutscher con células hepáticas, causa la salida de aminoacil-tRNA sintetisas y de otras proteínas celulares del oocito. La seril-tRNA sintetasa, fenilalanil-tRNA sintetasa y la glicil-tRNA sintetasa se liberan en el medio de incubación y mantienen su actividad fuera de la célula. Se ha estudiado además el efecto del tratamiento con tolueno sobre la síntesis de proteínas y sobre la respuesta a hormonas del oocito. Estudiando la aminoacilación de tRNA de levadura específico para fenilalanina con una enzima parcialmente purificada y la aminoacilación de este mismo tRNA después de ser microinyectado en estas células se ha detectado una interesante diferencia entre los procesos in vivo e in vitro con respecto al efecto de la temperatura. La aminoacilación in vivo aumenta con la temperatura llegando a un máximo de reacción a 25°. A temperaturas superiores la actividad dentro de la célula disminuye bruscamente siendo la reacción a 37° inferior a la observada a 0°. La reacción in vitro sin embargo tiene un óptimo a 37°.

Los estudios realizados demuestran la utilidad de las técnicas que permiten comparar reacciones bioquímicas que ocurren en la célula viva con las que se pueden medir en el tubo de ensayo.

RELACION ENTRE NUCLEOTIDOS CICLICOS Y LA ACCION HORMONAL
SOBRE OOCITOS DE ANFIBIOS

Cyclic nucleotides and hormone action in the amphibian
oocytes system

Rodrigo Bravo

(Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Norte, Universidad de Chile)

Tutor : J.E.Allende

Colaborador: C. Allende

Progesterona y gonadotropina coriónica humana (hCG) producen la maduración de oocitos de anfibio aislados y cultivados in vitro lo que permite investigar el posible mecanismo molecular de la acción de estas hormonas. Se ha estudiado el efecto de progesterona y hCG sobre los niveles de cAMP y fosforilación de proteínas del oocito. Además se ha visto la acción de teofilina y papaverina, ambos inhibidores de la fosfodiesterasa de cAMP sobre los niveles de cAMP y la maduración meiótica.

La concentración de cAMP en los oocitos se analizó usando el método de Gilman et al. La fosforilación de proteínas se detectó micro-inyectando p^{32} -ATP a los oocitos incubados en presencia o ausencia de hormonas y posteriormente analizando las proteínas en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Luego el gel se ponía en contacto con placas de radioautografía para detectar la radio-actividad incorporada a proteínas. La maduración de los oocitos se analizó por observación directa de la ruptura nuclear.

Una hora después de tratar los oocitos con progesterona 10^{-7} M, los niveles de cAMP disminuyen a un 50%. El contenido de cAMP de los oocitos tratados se recupera alcanzando niveles normales a las 5 y 6 horas después de la acción hormonal. hCG también produce alteraciones en los niveles de cAMP, aumentando bruscamente llegando a las 2 horas a un 100% de incremento y retornando a los valores normales a las 3 horas. El análisis de las proteínas fosforiladas demuestran un claro aumento en la fosforilación total de las proteínas de los oocitos tanto nucleares como citoplasmáticas después de la acción hormonal. Teofilina y papaverina impiden las variaciones de cAMP provocadas por hCG y progesterona e inhiben la maduración de los oocitos a concentración de 1mM y 0,1 mM respectivamente. Experimentos preliminares indican que la acción de estos inhibidores podría estar relacionada con el transporte de Ca^{+2} en el oocito.

AVANCE DE TESIS

Postulación de un mecanismo para la cinética sigmoidea de la glucoquinasa

Postulation of a mechanism for sigmoidal kinetics of glucokinase

Cárdenas, M.L. (con la colaboración de E. Rabajille)

Tutor: Dr. H. Niemeyer

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, U. de Chile

La glucoquinasa de hígado de rata presenta una función de saturación sigmoidea para glucosa y manosa. El coeficiente de Hill n_H , usado como índice de sigmoicidad y sin implicaciones de mecanismo, es alrededor de 1,5-1,6 con ambos sustratos; en cambio la función es hiperbólica con 2-desoxiglucosa ($n_H = 1,0$). En presencia de concentraciones crecientes de manosa, usada como inhibidor competitivo, disminuye la sigmoicidad de la función de saturación de glucosa, descendiendo el valor de n_H y ascendiendo el valor de $K_{0,5}$ gluc; por ejemplo con manosa 20 mM (aproximadamente 2 veces su $K_{0,5}$) n_H varió de 1,6 a 1,0 y $K_{0,5}$ gluc de 5,0 a 32,5 mM. N-acetilglucosamina (NAGA) que no es sustrato de la glucoquinasa, pero es inhibidor competitivo, también hizo hiperbólica la función de saturación con glucosa. Por ejemplo con NAGA 10 mM (25 veces su K_i) $n_H = 1,0$ y $K_{0,5}$ gluc = 268 mM. Con manosa y con NAGA se observó una menor inhibición de la fosforilación de glucosa a medida que la concentración de ésta descendía por debajo de 3 mM aproximadamente.

El grado de sigmoicidad de la función de saturación para glucosa es función de la concentración de Mg-ATP. La disminución de este sustrato es el ensayo enzimático hasta una concentración de 0,05 mM (10 veces menor que su K_m) hizo hiperbólica la función de saturación para glucosa con $n_H = 1,0$ y con disminución de $K_{0,5}$ gluc a concentraciones de Mg-ATP superiores a 10 veces su K_m el valor de n_H parece estabilizarse en un valor de 1,6.

Los resultados presentados serían compatibles con un modelo en el cual la glucosa se une a dos especies enzimáticas diferentes: la enzima libre y el complejo binario Enzima-ATP, estando favorecida cinéticamente la secuencia de formación de producto que implica la unión de glucosa a la enzima libre. La ineficacia de diversos tratamientos de la glucoquinasa (calentamiento, cambios de pH y fuerza iónica) fotooxidación, tratamiento con agentes desnaturalizantes) destinados a desensibilizar la enzima y hacer hiperbólica su función de saturación para glucosa apoya el modelo propuesto.

Se está trabajando en un programa de computación para determinar los valores de las constantes de la ecuación de velocidad y establecer si hay compatibilidad entre los datos experimentales y el modelo propuesto.

Estudios de estructura y función del ácido Ribonucleico de transferencia

(Studies on the structure and function of transfer ribonucleic acid)

KRAUSKOPF, MANUEL

Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

El tRNA es la molécula adaptadora que permite la selección de un aminoácido y su correcta ubicación en la cadena polipeptídica. En el cumplimiento de los procesos que posibilitan estos eventos, el tRNA actúa a través de sitios de reconocimiento, parte de los cuales han sido motivo del presente estudio. La interacción específica más crucial está dada por aquella en que se obtiene la esterificación de un aminoácido a la posición 2' o 3' hidroxilo de la ribosa del extremo 3' Aco terminal por acción de las aminoacil-tRNA sintetetas. Se ha demostrado que fenilalanil-tRNA sintetasa de levadura y Neurospora crassa puede cargar con fenilalanina a varias especies de tRNA de E.coli. Esta heteroaminoacilación heteróloga ha sido usada para:

a) Diseñar métodos de purificación y aislamiento de especies puras de tRNA de E.coli, a través de la incorporación de un aminoácido hidrofóbico a algunas especies de tRNA, aumentando así su retención en columnas de BD celulosa.

b) Confirmar la hipótesis de Dudock acerca del sitio de reconocimiento tRNA-fen-tRNA sintetasa, irradiando varias especies de tRNA de E.coli a 335 nm para obtener una modificación estructural localizada que afectaba la esterificación enzimática del aminoácido.

c) Analizar las posibles diferencias en configuración entre tRNA y aminoacil tRNA.

Se discutirán los resultados obtenidos en cada uno de estos estudios, como también otros en relación a la participación de los tRNAs en la regulación de la biosíntesis de proteínas.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE RIBOSOMAS PROVENIENTES DE OOCITOS
DE XENOPUS LAEVIS

Regulation of the activity of *Xenopus laevis* ribosomes

Errazuriz, R.

Tutor: Dr. Jorge Allende

(Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Norte, Universidad de Chile)

El proceso de maduración del oocito y el desarrollo temprano del embrión gatillado por la fertilización resultan en un aumento de la síntesis de proteínas que podría ser explicada en parte por una activación de ribosomas preexistentes. Al estudiar in vitro la síntesis de proteínas en oocitos crecidos, se ha encontrado un inhibidor de la traducción presente en la fracción sobrenadante. Se considera importante relacionar la actividad y características de este inhibidor con el posible mecanismo que gatilla la síntesis proteica en esos procesos.

Se ha estudiado la síntesis de polifenilalanina dirigida por Poli U a partir de ^{14}C , phe-tRNA en sistemas derivados de ovario de *Xenopus laevis* y germen de trigo. Este sistema, por lo tanto, se limita a medir el proceso de elongación en la traducción. Las enzimas provienen de un sobrenadante de 105.000x g precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 40 y 80% de saturación y posteriormente dializado (F. dial). Los ^{14}C ribosomas han sido obtenidos de homogeneizados por centrifugación diferencial y finalmente lavados con NH_4Cl 0,5 M.

Al hacer sistemas híbridos (F. dial. de oocitos y ribosomas de trigo o vice versa) se observa actividad de síntesis de polifenilalanina; sin embargo esta no se produce cuando la F. dial, y los ribosomas provienen de oocitos. La F. dial, de oocitos se comporta como un inhibidor de la síntesis proteica cuando se adiciona a un sistema con F. dial, de trigo y ribosomas de oocito. No se observa inhibición cuando se utilizan ribosomas de germen de trigo. La inhibición desaparece por preincubación del F. dial, a 50%. El inhibidor afecta la fijación de aa-tRNA catalizada por el factor EF-1. La inhibición se puede revertir al agregar cantidades crecientes de ribosomas de oocito al medio de incubación, lo que apoyaría la idea que la acción inhibitoria es sobre los ribosomas.

Se piensa llevar a cabo la purificación del inhibidor presente en el citosol, con el fin de caracterizarlo y establecer su posible rol fisiológico.

SISTEMAS VASODEPRESORES HUMORALES DE ORIGEN RENAL EN LA REGULACION
DE LA PRESION SANGUINEA

Renal vasodepressor substances and blood pressure regulation

Juan Roblero S.

Laboratorio de Fisiología, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Goldblatt, hace más de cuarenta años, demostró que al pinzar parcialmente la arteria de un riñón, producía en el perro un estado de hipertensión transitoria.- La extirpación del riñón contralateral producía un nuevo estado de hipertensión, - ahora de una manera sostenida. Si en estos animales se realiza el trasplante de un riñón procedente de un animal normotenso, la presión se normaliza.

Esta observación sugiere que el riñón participa en la regulación de la presión sanguínea a través de un doble mecanismo. En los últimos treinta años, diversos autores han señalado la participación de factores presores y antipresores en el control de la presión sanguínea. Estas investigaciones parecen señalar que la hipertensión es el resultado de un desbalance entre factores que tienen una acción opuesta sobre la presión.

Diversos estudios sobre mecanismos antihipertensivos han señalado la importancia de sistemas humorales de origen renal con efecto natri-urético-vasodilatador, entre los cuales se destacan los sistemas integrados por las prostaglandinas y el sistema calicreína-cininas.

Discutiremos aquí la participación del sistema calicreína-cininas como uno de los mecanismos antihipertensivos que tendría la capacidad de atenuar o modular los efectos de agentes vasoconstrictores.

En 1968, Croxatto demostró que el sistema calicreína-cininas está relacionado con ciertos estados hipertensivos, al describir que la calicreína urinaria está significativamente disminuída en ratas hechas hipertensas según la técnica descrita por Grollamn.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio, en riñones aislados y perfundidos han demostrado que la calicreína renal es liberada a la sangre circulante. - Estos resultados sugieren que la calicreína podría tener un rol a nivel sistémico.

MECANISMOS NEUROENDOCRINOS EN LA REGULACION DEL BALANCE DEL
SODIO EN MAMIFEROS

Elisa T. Marusic

De vital importancia en la evolución de los vertebrados ha sido el desarrollo de mecanismos que mantengan en el organismo un contenido normal de sodio y por ende una circulación normal acompañada de una distribución adecuada de los líquidos tisulares.

El sistema nervioso y endocrino interactúan en la regulación del balance de sodio influyendo principalmente en la secreción de una hormona retenedora de sal, la aldosterona. Este mineralocorticoide es regulado por un complejo sistema multifactorial que incluye los niveles plasmáticos de sodio y potasio, el ACTH, el sistema renina-angiotensina y algún factor de origen central aún no esclarecido. En nuestro laboratorio se han desarrollado una serie de trabajos tendientes a esclarecer el sistema regulador de la aldosterona y determinar la importancia relativa de los factores antes señalados. Con este objetivo se ha trabajado en diversas especies: hombre, perro, y rata a diferentes niveles: organismo intacto, glándula aislada y en partículas subcelulares. Parte de los hallazgos obtenidos serán presentados y discutidos en base a una hipótesis central sobre la influencia mutua de los iones sodio y potasio en el control de la aldosterona.

CONTROL NEUROENDOCRINO DE LAS FUNCIONES DE REPRODUCCION EN
LA HEMBRA

Neuroendocrine control of the female reproductive functions

Manuel de la Lastra B.

Laboratorio de Endrocrinología, Depto. de Fisiología y Embriología del Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Las funciones de reproducción en los mamíferos están sometidas a un control muy preciso y desconocido en muchos aspectos.

El sistema de control que opera en la hembra adulta tiene como características en las especies con ovulación espontánea:

- 1.- Poseer un componente de "acción tónica" complementando por otro de "acción cíclica", situados ambos en el sistema nervioso central.
- 2.- Disposición "en cascada" de los varios componentes del sistema, lo que permite el ingreso de numerosas señales provenientes del medio interno en sus diversos niveles.
- 3.- Conexión de los elementos integrantes del sistema de control por neurotransmisores adrenérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos en el sistema nervioso central y por hormonas peptídicas, glicoproteicas y esteroidales en las otras etapas sucesivas. Estas hormonas actúan primariamente sobre la estructura inmediatamente siguiente de la cascada; pero tienen la capacidad de modificar la función de estructuras superiores del eje por feed back positivo o negativo.
- 4.- El sistema de control está ampliamente abierto al mundo externo del cual recibe numerosas señales que sirven para sincronizar los ciclos de reproducción con ciclos de la naturaleza, de modo de asegurar para las crías una óptima disponibilidad de alimentos y condiciones climáticas adecuadas.
- 5.- En el sistema de control participan elementos endocrinos de naturaleza transitoria como el cuerpo lúteo de ciclo estral o menstrual y con la placenta del período de gravidez.

Se discutirá la forma de interacción de los diversos elementos del sistema de control.

Trabajo de incorporación

DEGRADACION TERMICA Y FOTOQUIMICA DE DIMBOA EN SOLUCIONES ACUOSAS

(Thermal and photochemical degradation of Dimboa in aqueous solutions)

CORCUERA, L.J., ARCAYA y G.A. TRAVERSO
(Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago)

DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona) es un ácido hidroxámico que se encuentra en maíz y otras gramíneas. Este compuesto sería importante en el metabolismo mineral de la planta y en la protección de gramíneas contra ataques de insectos, hongos y otros patógenos. El estudio del rol biológico de este compuesto se ha visto dificultado por su inestabilidad en soluciones acuosas (Woodward, Corcuera, Helgeson y Upper, *Plant Physiology* 56 (supplement): 53, 1975). La estabilidad de DIMBOA fue medida en diferentes condiciones de temperatura y pH. La degradación de DIMBOA es rápida, siendo el principal producto MBOA (6-metoxi-benzoxazolinona). Sin embargo, la degradación de DIMBOA no es cuantitativa (hasta un 75% del rendimiento teórico máximo, dependiendo de las condiciones usadas para la degradación). Soluciones de DIMBOA (pH 6, buffer succinato, $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) fueron irradiadas a diferentes longitudes de onda seleccionadas entre 2.300 y 3.400 Å usando un monocromador. DIMBOA demostró actividad fotoquímica, la que fue seguida por espectroscopía de absorción ultravioleta, observándose que los productos de descomposición son distintos a los de la degradación térmica. Independientemente de la longitud de onda, la fotólisis condujo a los mismos productos, lo que sugiere un único estado excitado fotoquímicamente activo. La sensibilidad fotoquímica de DIMBOA es lo bastante grande como para que la iluminación normal de laboratorio produzca una descomposición significativa en 24 hrs.

Trabajo de Incorporación

"EFECTO DE LA GONADOTROPINA CORIONICA SOBRE LA CAPTACION DE
AMINOACIDOS EN OOCITOS DE ANFIBIO"

"The effect of chorionic Gonadotropin on AminoAcid uptake
by Amphibian Oocyte"

CARLOS OTERO, RODRIGO BRAVO y JORGE
ALLENDE.

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile

Se ha estudiado el efecto de gonadotropina coriónica humana (hCG) sobre la permeabilidad de aminoácidos y su incorporación a proteínas en oocitos de anfibios. Se analizó también la relación entre el proceso de maduración meiótica y la permeabilidad, ambos eventos provocados por hCG en éstas células.

Oocitos en grupos de 5 en triplicado se incubaron en solución salina a 22° con amino ácido radioactivo (20µM) en presencia o ausencia de 60 unidades/ml de hormona. La radioactividad total dentro del oocito se utilizó como medición del aminoácido entrado en la célula. La radioactividad TCA precipitable fue usada como medición de la incorporación del aminoácido a proteínas.

hCG aumenta la permeabilidad del oocito frente a los 8 aminoácidos estudiados. Este aumento se debe a una reducción en la K_t sin afectar la $V_{máx}$. Con fenilalanina se observó que la hormona reducía el K_t para este aminoácido de $2,8$ a $1,4 \times 10^{-4}M$ y para la lisina de $5,8$ a $1,1 \times 10^{-4}M$. El efecto estimulador no requiere de síntesis de proteínas pero es dependiente de pH y temperatura. El incremento en la permeabilidad de aminoácidos, va acompañado de una estimulación de la incorporación del aminoácido exógeno en las proteínas celulares. Análisis de las proteínas sintetizadas en células tratadas en presencia y ausencia de hCG por medio de geles de poliacrilamida bidimensionales denotan diferencias cuantitativas y en menor grado cualitativas. Otras hormonas que producen maduración (estradiol y progesterona) no afectan la entrada de aminoácidos al oocito. Además la concentración requerida para provocar maduración es menor que la necesaria para aumentar la permeabilidad.

Inhibidores de la maduración como teofilina y papaverina no afectan al estímulo provocado por hCG. Los datos anteriores indicarían claramente que el aumento de permeabilidad de aminoácidos y la maduración meiótica son eventos que si bien son gatillados por la misma hormona pueden dissociarse.

Trabajo de Incorporación

ESTUDIOS IN VITRO DE LOS RIBOSOMAS CITOPLASMATICOS DE EUGLENA GRACILIS

In vitro studies of cytoplasmic ribosomes of Euglena Gracilis

BENITO GOMEZ.

Laboratorio de Bioquímica, Instituto de
Ciencias Biológicas, Universidad Católica
de Chile, Santiago.

Los ribosomas citoplasmáticos de Euglena gracilis se dividen en dos grupos tomando en consideración su estabilidad "in vitro". Aquellos provenientes de células en fase estacionaria de crecimiento presentan una degradación localizada en la subunidad mayor del ribosoma en comparación a la estabilidad observada en los ribosomas de células en fase exponencial. Esta diferencia de estabilidad "in vitro" podría ser una manifestación de la existencia de dos estados diferentes dependiendo del estado fisiológico de la célula, exponencial o estacionaria. Si fuese así, éstos estados ribosomales deberían reflejarse en otras propiedades y actividades medibles de los ribosomas.

El estudio fue realizado con ribosomas citoplasmáticos de Euglena gracilis, variedad bacillaris. La marcación isotópica de los ribosomas se hizo con L-leucina-1-C¹⁴ o L-leucina-4,5-H³ y los análisis de sedimentación en gradientes de sacarosa. Los ensayos en síntesis de polifenilalanina se hicieron midiendo la capacidad de incorporación de fenilalanina-C¹⁴ dirigida por poli-U.

Por marcación isotópica se pesquizó un intermediario de la degradación de la subunidad mayor del ribosoma "estacionario" y que la degradación ocurre por pérdida, principalmente, de RNA. La actividad en síntesis de polifenilalanina de los ribosomas "estacionarios" es 20-40% de la encontrada en los ribosomas "exponenciales". El citoplasma de células estacionarias inhibe específicamente la actividad de los ribosomas "exponenciales". Células creciendo exponencialmente al ser trasladadas a un medio pobre sufren una pérdida progresiva de RNA.

Se demuestra la existencia de dos poblaciones ribosomales dependiendo del estado fisiológico celular implicando que existirían mecanismos regulatorios que alteran la estructura y eficiencia del ribosoma de Euglena.

Trabajo de Incorporación

MODIFICACION DE INSULINA POR SEMISINTESIS

Semisynthetic modification of insulin

CARLOS HERRERA C, y ROBIN E. OFFORD
Depto. de Macromoléculas, Instituto de
Ciencias Químicas, Universidad Católica
de Chile.

La molécula de la hormona insulina está constituida por dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por enlaces disulfuro. Las modificaciones químicas que se le hacen normalmente modifican simultáneamente ambas cadenas. Si se desea modificar una sola cadena es necesario recurrir a técnicas selectivas. El objetivo de este trabajo pretende evaluar un nuevo método selectivo para modificar insulina por reemplazo del aminoácido amino terminal de la cadena B (B-1).

El método de D.J. Saunders consiste en acilar 2 grupos amino libres (Gly A-1 y Lys B-29) utilizando Benzoil Metionina en ambiente alcalino. El tercer grupo amino (Phe B-1) queda desprotegido y puede ser removido. Utilizando técnicas químicas para síntesis de enlaces peptídicos se introducen nuevos aminoácidos en la posición B-1. Finalmente después de desproteger utilizando CN Br en ambientes ácido se obtiene la insulina modificada.

Los aminoácidos introducidos fueron L-Ala, L-Val, m-I-L-Phe y 3-I-L-Tyr. Sólo B-1-L-Ala-insulina y B-1-L-Val-insulina produjeron algunos cristales romboidales similares a los de insulina nativa por cristalización según Schlichtkrull. B-1-m-I-L-Phe insulina y B-1-3-I-L-Tyr no cristalizaron por el método de Schlichtkrull.

El método de D.J. Saunders es más simple que otros métodos selectivos de modificación de insulina pero representa inconvenientes relacionados con la desprotección de los grupos previamente protegidos. Parecería que el daño ocasionado a la molécula de insulina sería pequeños ya que en dos de los reemplazos se pudo obtener algunos cristales.

QUINASA FOSFOMEVALONICA DE HIGADO DE CERDO. PURIFICACION
Y PROPIEDADES

Phosphomevalonate kinase from pig liver. Purification and properties

Sergio Bazaes V.

Tutor: J. Eyzaguirre

(Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Santiago).

La quinasa fosfomevalónica cataliza la fosforilación del 5-fosfomevalonato a 5-pirofosfomevalonato a expensas de ATP. Esta enzima se ha descrito en diversas fuentes y el conocimiento que de ella proporciona la literatura bioquímica es muy preliminar.

La enzima se purificó de la fracción soluble de hígado de cerdo obtenida por centrifugación del homogenizado a 100.000 g, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE celulosa y Bio Gel P-150.

La quinasa 5-fosfomevalónica presentó un peso molecular de 22.000, obtenido por centrifugación en gradiente de sacarosa y cromatografía en Bio Gel P-60. Los estudios de velocidades iniciales revelaron cinética hiperbólica para ambos sustratos y un mecanismo secuencial de reacción. El pH óptimo estuvo en un rango de 7.5 - 9.7. La enzima presentó susceptibilidad a inhibición por 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato) siendo la inhibición revertida por ditioneitol o mercaptoetanol. Además el 5-fosfomevalonato protegió de la inactivación por el reactivo modificador. Las k_m aparentes para ambos sustratos no fueron alteradas en la enzima parcialmente modificada. La enzima fue además inactivada por piridoxal-5'-fosfato presentando la inhibición cinética de primer orden y siendo dependiente de la concentración del inhibidor. La inactivación fue revertida por lisina o por diálisis pero no después de tratar la enzima modificada con NaBH_4 . El 5-fosfomevalonato protegió a la enzima de la inactivación por piridoxal-5' fosfato.

Se concluye que la quinasa 5-fosfomevalónica de hígado de cerdo, una proteína de bajo peso molecular presenta uno o más grupos sulfidrilos y un grupo amino primario esenciales en o en las cercanías del sitio activo.

MODIFICACION QUIMICA DE GLUCOQUINASA

Chemical modification of glucokinase

Monasterio O.

(Departamento de Bioquímica, I.C.M.B., Universidad de Concepción y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

Tutor: H. Niemeyer

Observaciones sobre la influencia del pH en la velocidad máxima y en los valores de semi-saturación ($K_{0,5}$) de glucoquinasa sugirieron la existencia de un residuo de aminoácido, importante para la actividad enzimática, que por su pK alrededor de 7, podría corresponder a histidina. La fotooxidación catalizada por rosa de bengala (tetraiodo-tetracloro-fluoresceína), que destruye específicamente los residuos de histidina de proteínas bajo ciertas condiciones experimentales, inactivó la glucoquinasa en un 80% a los 60 minutos de exposición a la luz a 0° , con una constante de inactivación de primer orden de $1,25 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. En presencia de ambos sustratos (glucosa y Mg-ATP) hubo protección de la enzima, que parece deberse fundamentalmente al ATP, ya que protegió aun en ausencia de Mg^{2+} .

La glucoquinasa, que es una enzima-SH, pierde su actividad al ser incubada a 0° sin agentes protectores de tioles. Con una enzima muy purificada se observó una cinética de inactivación bifásica, caracterizada por una fase 1 rápida con $k_{\text{inact.}} = 3,98 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, seguida de una fase 2 lenta con $k_{\text{inact.}} = 0,71 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$. La inactivación fue revertida totalmente por DTT (ditiotreitól) 5 mM y parece ser producida por el oxígeno. El glicerol al 20% suprimió la fase 1 de inactivación, sin modificar la fase 2. Cada sustrato aisladamente no protegió a la glucoquinasa, sin embargo en la mezcla de ensayo de la actividad enzimática no ocurrió inactivación.

El DINB (5,5' -ditiobis (2-nitrobenzoico) inactivó a la glucoquinasa y su efecto fue totalmente revertido por DTT. La mayor acción del DINB se observó en la fase 2 de inactivación: a 0,1 mM, $k_{\text{inact.}} = 1,55 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ y a 1,0 mM, $k_{\text{inact.}} = 5,7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$.

Provisoriamente se puede concluir que en la glucoquinasa existen:

- 1) Residuos de histidina modificables por fotooxidación que podrían estar en el sitio activo, y
- 2) Grupos tioles esenciales para la actividad enzimática, de los cuales habría al menos dos poblaciones con diferente susceptibilidad a la oxidación.

REACCIONES INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO DEL RNA DE TRANSFERENCIA
EN OCITOS DE ANFIBIOS

Reactions related to the processing of transfer RNA in Amphibian oocytes

Aldo Solari

(Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Santiago Norte, Universidad de Chile).

Tutor: J.E. Allende

En este trabajo se ha explorado el fenómeno de procesamiento de los tRNAs en oocitos de X. laevis, con el estudio de algunas enzimas que participarían en distintas etapas de este procesamiento como ser tRNA metilasa y tRNA nucleotidil transferasa ya sea "in vitro" así como la actividad enzimática "in vivo" mediante la técnica de microinyección.

Se ha podido caracterizar las tRNA metilasa "in vitro" según requerimientos, encontrándose que tRNA de E. coli resulta ser un excelente sustrato y que el donador de grupos metilos es S-Adenosil metionina. Sin embargo tRNA de oocitos no es sustrato para las enzimas, lo cual sugiere éste se encontraría totalmente metilado. También se ha caracterizado "in vitro" la tRNA nucleotidil transferasa, observándose que requiere CTP, ATP y tRNA hidrolizado en el terminal 3'. Al analizar la capacidad sustrato de tRNA de oocitos, se encontró que solo es capaz de incorporar AMP, lo cual indicaría que este segmento está parcialmente hidrolizado, sugiriendo que el terminal CCA está expuesto a un activo recambio.

La microinyección de tRNA cuyo terminal 3' ha sido removido químicamente en oocitos ha permitido estudiar la actividad de tRNA nucleotidiltransferasa "in vivo". Con este fin se ha inyectado tRNAP^{he} de levadura que se ha oxidado (tRNACCA^{ox}), tRNA que ha perdido la Adenosina 3' terminal y conserva un fosfato 3' (tRNACC^{ox}-P), tRNA que ha perdido la Adenosina monofosfato (tRNACC) y el tRNA que ha sufrido la remoción total de la última citosina monofosfato (tRNAC). Oocitos preincubados en buffer Holtfreter con (14C) - phe se inyectaron con distintos tRNAs tratados y se incubaron en el mismo medio, luego han sido extraído con fenol 50% y se midió la radioactividad ácido insoluble de la fase acuosa. Los resultados muestran que sólo tRNA-CC y tRNA-C pueden ser reparados y por ende aminoacilados. Estas demuestran que la tRNA nucleotidil transferasa o una actividad con especificidad y características similares es funcional "in vivo" en la reparación de tRNAs que han perdido su terminal 3'.

APORTE MOLECULAR A LAS RELACIONES EVOLUTIVAS DE
ANFIBIOS ANUROS

Molecular contribution to the evolutionary relationships in anuran amphibians

Nelson F. Díaz

(Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
U. de Chile)

Tutor: Tito Ureta A.

Los Anfibios Anuros son en Chile unas treinta especies pertenecientes a dos grandes Familias. Esta fauna incluye Géneros cuya antigüedad puede estimarse de su registro fósil que, como en *Caudiverbera*, se remontan al período Terciario. Esto implica una larga historia evolutiva que resulta difícil establecer sobre bases exclusivamente morfológicas, dado que no se acompaña de divergencias notables entre los taxa. Es posible entonces postular la utilidad de nuevos criterios que contribuyan a esclarecer la historia evolutiva del grupo.

Se han estudiado representantes de 18 especies chilenas, estableciendo los patrones electroforéticos de proteínas totales y Lactato Deshidrogenasas (LDH) en plasma sanguíneo y cristalinos, y los patrones cromatográficos de Hexoquinasas en hígado. Los cristalinos muestran una variación en el número (de 2 a 5) y proporciones relativas de isoenzimas de LDH. Con estos criterios puede atribuirse a cada especie un patrón isoenzimático característico. Esto constituye un aporte molecular para agrupar en ocho Géneros las especies estudiadas, separando genéricamente especies anteriormente integradas al Grupo *Nodosus* dentro del Género *Eupsophus*. Cromatograficamente se separan en hígado cuatro hexoquinasas: A, B y D en los Bufónidos y algunos Leptodactylidos; C, B y D en el resto de los Leptodactylidos estudiados. Si se correlaciona la ocurrencia del patrón C, B, D y de registro fósil en algunas especies, puede atribuirse a este patrón un carácter primitivo. Esto permite postular la mayor antigüedad de algunos géneros, y señalar hitos y precedencias en esquemas evolutivos ya propuestos. Se discutirá un nuevo esquema evolutivo complementando nuestra información molecular con datos paleontológicos y cromosómicos, en el cual es particularmente importante la ubicación de *Eupsophus coppingeri*. Esta especie parece mostrar caracteres que le darían el carácter de grupo ancestral.

REGULACION INTEGRATIVA POR NUCLEOTIDOS CICLICOS

Integrative regulation by cyclic nucleotides

M. Sapor-Hagar

Laboratorio de Química Fisiológica y Patológica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

La mayoría de las hormonas contribuyen a regular los niveles enzimáticos celulares. Así el glucagón, al aumentar los niveles de AMP cíclico (cAMP) en determinados tejidos, coordina integrativamente el metabolismo: estimula la glicogenolisis, lipólisis y gluconeogénesis a la vez que disminuye la síntesis de glucógeno la lipogénesis y la glicolisis. Se discuten, en forma coordinada, los sistemas enzimáticos y los mecanismos implicados (regulación transcripcional y/o traduccional y fosforilación por proteinkinasa), así como los resultados que hemos obtenido in vivo en hígado de ratas sometidas a diferentes dietas, hormonas e inyección de dibutiril-cAMP. Con dibutiril-cAMP hemos obtenido una inhibición del 62% de la lipogénesis en glándula mamaria, coincidiendo con un 60% de disminución en la actividad de las principales enzimas lipogénicas. Esto sugiere que la disminución post-parto del cAMP favorecería la síntesis de lípidos de la leche y que los niveles opuestos entre sí de cAMP y cGMP, que hemos detectado en la preñez y lactancia, podrían mediar la lactogénesis producida por las hormonas.

El estudio de la enzima lipogénica G6P-deshidrogenasa hepática nos lleva a plantear la posibilidad de que el cAMP regule su actividad no sólo por reprimir su síntesis, sino también porque, al inducir la síntesis de γ -glutamyltransferasa (GGT), podría llevar a una mayor degradación del glutatión oxidado, compuesto que contrarresta la inhibición de la G6PDH por NADPH. Igualmente, la inducción de GGT, primera enzima del ciclo del γ -glutamilo para el transporte de aminoácidos, facilitaría la gluconeogénesis, proceso que también el cAMP estimularía al regular la síntesis y actividad de algunas enzimas gluconeogénicas.

COMPLEJOS MUTIENZIMATICOS, COMPARTAMENTALIZACION, ISOENZIMAS Y REGULACION METABOLICA : UNA VISION INTEGRADA (E HIPOTETICA)

Multienzyme complexes, Compartmentation, Isoenzymes and metabolic regulation: An integrated (and hypothetical) View.

Tito Ureta

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Tradicionalmente se ha considerado al citoplasma amorfo (=líquido sobrenadante) como un sistema celular en el que las reacciones metabólicas ocurren según procesos estocásticos. En este esquema las enzimas solubles de vías metabólicas funcionarían "de izquierda a derecha" o viceversa según las necesidades metabólicas de la célula expresadas en concentraciones de algunos metabolitos claves (ATP, ADP, NAD, NADH, citrato, etc.) que afectarían directamente a enzimas marcapaso con propiedades regulatorias.

Por otra parte, la existencia demostrada de pools independientes de intermediarios y de isoenzimas solubles en prácticamente todas las etapas del metabolismo permite postular una hipótesis sobre la organización molecular del citoplasma en que se consideran las vías metabólicas como reacciones encadenadas unidireccionales catalizadas por isoenzimas específicas asociadas como complejos multienzimáticos.

Se presentarán argumentos en favor de esta hipótesis, las consecuencias que de ella derivan y los modelos experimentales que permitirían su demostración.

REGULACION DEL METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN MOLUSCOS. CARACTERIS-
TICAS Y PROPIEDADES DE LA PIRUVATO QUINASA

Regulation of the Carbohydrate Metabolism in the mollusc. Characteris-
tics and properties of pyruvate kinase.

A. Morán S.

Departamento de Bioquímica, Instituto de
Ciencias Médico Biológicas, Universidad
de Concepción.

Diversas investigaciones demuestran que una característica de los moluscos, es
tá relacionada con la capacidad de almacenar cantidades altas de glicógeno, 5 a 40%
del peso corporal.

Estas reservas son parcialmente movilizadas durante los períodos de anaerobic-
sis a que, por efecto de las mareas, deben someterse estos animales. Quedan de es-
ta manera cubiertos los requerimientos energéticos de los tejidos y el fosfoenol pi-
rúvico generado por la glicolisis es llevado hacia los productos finales: succinato
y alanina en anaerobiosis o piruvato en aerobiosis.

Una de las enzimas comprometidas en la regulación de los procesos glicolíticos
y gliconeogénicos es la piruvato quinasa, cuya actividad, en las diversas especies
estudiadas, es modulada a través de estimulación alostérica, por fosfoenol piruvato
y fructosa 1-6 difosfato. Es inhibida por alanina, fenil alanina y ATP, inhibido-
res alostéricos, cuya acción inhibitoria en general es dependiente del pH. Los re-
sultados obtenidos por nosotros estudiando la inhibición de piruvato quinasa de Lo-
co de Mar por fenil alanina es, en este caso, relativamente independiente del pH -
pues los valores de $I_{0.5}$ para pH 7.0, 7.4 y 8.0 son: 0.37, 0.39 y 0.17 mM de fenil
alanina con valores para el coeficiente de Hill de 2.01, 1.86 y 1.60 respectivamen-
te. Este comportamiento la distingue de la otras estudiadas, aún cuando al igual -
que las demás, el efecto inhibitorio es anulado por bajas concentraciones de fructo-
sa 1-6 difosfato.

TRABAJO DE INCORPORACION

ENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA EN MUCOSA DE INTESTINO DE RATA. (GLUCOSE PHOSPHORILATING ENZYMES IN RAT INTESTINAL MUCOSA)

VERA M.L. CARDENAS, M. L. NIEMEYER, H. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Departamento de Biología, Universidad de Chile, Sede Antofagasta.

No está suficientemente definido el número de isozimas fosforilantes de glucosa presentes en la mucosa del intestino delgado de rata. Se sabe que existen enzimas de K_m baja (hexoquinasa), pero no han sido caracterizadas adecuadamente. Por otra parte es discutible la presencia de la isozima de K_m alta (glucoquinasa). Complica la situación de estas isozimas, el hecho que se presenten tanto en el citosol como asociada a las mitocondrias, y en proporción variable según la dieta del animal.

El homogenizado al 20% de la mucosa del intestino delgado de ratas bien alimentadas con dieta normal se centrifugó a $105.000 \times g$ durante 60 minutos, y del líquido sobrenadante se aislaron las enzimas. Se separaron 3 fracciones enzimáticas capaces de fosforilar glucosa por medio de la cromatografía en DEAE-celulosa con gradiente de concentración de KCl. Las que eluyen a concentraciones aproximadas de 55 mM y 115 mM corresponden a hexoquinasas (E.C. 2.7.1.1.) A y B respectivamente; la que eluye a 270 mM corresponde a una N-acetilglucosamina-quinasa (NAGA-quinasa) (E.C.2.7.1.59) con actividad quinásica secundaria para glucosa. No se encontró glucoquinasa.

Las hexoquinasas se purificaron parcialmente por medio de filtración en gel (Sephadex G-200) y por cromatografía de afinidad en Sepharosa-N-(6-aminoheptanoil-2-amino-2-deoxiglucopiranososa).

Se estudiaron algunas propiedades de las hexoquinasas. El peso molecular fué de 94.000 ± 2.000 para A y B, respectivamente. Las K_m -glucosa fueron $3,07 \times 10^{-5}M$ y $9,61 \times 10^{-5}M$ para A y B respectivamente. La especificidad de sustrato fué similar a la descrita para hexoquinasas en otros tejidos.

Propiedades de la N-acetil-glucosamina-quinasa : El peso molecular fué de 56.000. La K_m -n-acetil-glucosamina fué de $2,14 \times 10^{-5}M$.

La presencia de la NAGA-quinasa explicaría los resultados obtenidos por Anderson y col (1975), y que fueron interpretados como debido a la presencia de glucoquinasa en el intestino.