

BIOQUIMICA

104

FLUORESCENCIA DE TSQ-Zn(II): UN ENSAYO RAPIDO, ESPECIFICO Y DE BAJO COSTO PARA DETERMINACION DE Zn(II) EN LIQUIDOS BIOLOGICOS (A fast, specific and low cost assay for Zn(II) determination in biological fluids using TSQ-Zn(II) fluorescence).

J. G. Reyes, M. Santander, P. Castro and D. J. Benos. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso; Depto. Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, U. de Chile y Dept. Physiology and Biophysics, University of Alabama at Birmingham.

La fluorescencia del complejo N-(6 metoxi-8-quinolil)-p-toluensulfonamida (TSQ)-Zn(II) en metanol puede usarse para la determinación de Zn(II) en líquidos biológicos. De los cationes Cd(II), Cu(II), Mn(II), Fe(III), Hg(II), Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ probados, sólo Cd(II) forma un complejo con propiedades fluorescentes similares al Zn(II). Sin embargo, los otros cationes pueden apagar la fluorescencia compitiendo con Zn(II) por unión con TSQ. Con concentraciones micromolares de TSQ es posible determinar Zn(II) a concentraciones 50-100 nM en presencia de un exceso de 30.000, 500, 60 y 33 veces de Mg²⁺, Ca²⁺, Fe(III) y Cu(II) respectivamente, lo cual permite usar el método en líquidos como suero, semen, líquido cefalorraquídeo, etc. El método requiere de deproteinización ácida de las muestras y utilizando el método de adición de estándares es posible determinar Zn(II) en presencia de algunos cationes interferentes. Este ensayo de Zn(II) es comparable (o mejor) en sensibilidad a otros métodos como espectrometría de absorción atómica o espectrofotometría con 4(2-piridilazo) resorcinol.

Financiado por Proyecto 90-0142, FONDECYT; Grants 8905 y 9016, Fund. Rockefeller, y Proyecto DGI-UCV 125.745/89.

106

PARTICIPACION DE LA FRACCION MICROSOMAL EN EL ESTRES OXIDATIVO DERIVADO DE LA REPERFUSION DE UN TEJIDO DESPUES DE UNA ISQUEMIA TEMPORAL. (Role of the microsomal fraction in the oxidative stress of a tissue reperused after a temporal ischemia). Campos R., Sanhueza J., Maureira E., Valdés J., Valenzuela A., Unidad de Bioquímica Farmacológica. INTA, Universidad de Chile, Casilla 138-11, Santiago.

El daño orgánico y funcional producido durante la reperfusión de un tejido sometido a una isquemia temporal es un hecho de importancia clínica y quirúrgica. Se ha postulado que el desarrollo de un estrés oxidativo tisular sería uno de los componentes importantes del daño tisular y funcional. Si bien la transformación de la enzima xantina deshidrogenasa en una oxidasa capaz de generar importantes cantidades de radicales libres prooxidantes ha sido considerada como una de las principales causas de este daño, el uso tanto clínico como experimental de inhibidores de esta enzima (alopurinol, oxipurinol) no produce una inhibición del proceso oxidativo.

Nuestro grupo, utilizando un modelo de isquemia-reperfusión en riñón de rata *in vivo*, ha caracterizado una activación de la función microsomal durante el proceso. Los microsomas obtenidos de riñones isquemizados y posteriormente reperfundidos durante diferentes lapsos de tiempo, muestran un activo consumo de oxígeno correlacionado con una gran producción de radicales libres tipo superóxidos además de una importante cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Estos resultados nos conducen a postular, además de la participación de la enzima xantina oxidasa, un rol para los microsomas en el estrés oxidativo en un tejido isquémico. En forma complementaria, hemos realizado cinéticas de la variación de concentraciones de glutatión reducido y oxidado durante el proceso, así como también hemos estudiado la cinética de la conversión deshidrogenasa-oxidasa de la enzima involucrada en el metabolismo de la xantina. El propósito de este trabajo, que forma parte de un proyecto mayor, es demostrar el posible rol protector que podrían ejercer algunos inhibidores de la función microsomal en el daño oxidativo originado en un tejido expuesto a un proceso de isquemia-reperfusión.

Financiado por FONDECYT 1194-90 y Programa de Estudios Avanzados. U. de Chile.

105

REACCIONES DE COMPUESTOS INDOLICOS CON RADICALES LIBRES (Reactivity of Indolic Compounds towards Free Radicals) Faure M.*, Montoya N. y Lissi E. Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile.

Moléculas que incluyen el grupo indol son sustratos potenciales para reacciones radicalarias y de transferencia de electrón. Esta reactividad las hace susceptibles de ser degradadas por los radicales, pero a su vez les confiere la capacidad de jugar un rol protector del daño inducido por radicales libres, tanto por la captura de los radicales como a través de un proceso de reparación. Con el fin de evaluar las variables que determinan la reactividad de estos compuestos se analizó una serie de indoles sustituidos respecto de: a) oxidación inducida por radicales peroxidados; b) capacidad antioxidante en la oxidación inducida del cumeno; c) capacidad antioxidante en la auto-oxidación de homogeneizado de cerebro; d) capacidad protectora frente a la inactivación de lisozima promovida por radicales oxigenados generados en la termólisis azo-bisamidinopropano. En fase homogénea, la reactividad de los distintos indoles considerados está relacionada a su potencial de oxidación. En sistemas microheterogéneos (homogeneizado de cerebro) la capacidad antioxidante está determinada por su potencial de oxidación y por su grado de incorporación a las micro-fases lipídicas.

(*). Becario de la Fundación Andes.

107

EFFECTO PROTECTOR DE ANTIOXIDANTES FRENTE AL STRESS OXIDATIVO PROVOCADO POR INGESTA DE ALTAS DOSIS DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS. (Protective effect of antioxidants on the oxidative stress caused by ingestion of high doses of polyunsaturated fatty acids). Garate, M. y Garrido, A., Unidad de Bioquímica Farmacológica. INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: A. Valenzuela).

El consumo de aceite de pescado con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), en especial ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Docosahexaenoico (DHA), induce cambios en la estructura de membranas biológicas, provocando un incremento en la susceptibilidad de inducción a lipoperoxidación.

Por otra parte, es conocido el efecto estabilizador sobre el aceite de pescado, de compuestos antioxidantes como DL α Tocoferol y algunos flavonoides naturales.

La suplementación con aceite de pescado aumenta el riesgo de lipoperoxidación, tanto en microsomas hepáticos inducidos enzimáticamente como membranas de eritrocito inducidos no enzimáticamente.

Nuestro objetivo es el estudio de la potencial acción protectora de antioxidantes como DL α Tocoferol y Quercetina (flavonoide natural) sobre distintos sistemas biológicos.

La ingesta de aceite de pescado al cual se le ha adicionado antioxidante (1 g / Kg), muestran que DL α Tocoferol posee efecto protector en membranas de eritrocito, no así en Microsomas Hepáticos, frente a la acción producida por el aceite sin antioxidante, en cambio no se encuentra efecto protector de Quercetina en estos sistemas, en las mismas condiciones.

Adiciones suprafisiológicas de DL α Tocoferol muestran que los microsomas son susceptibles de ser protegidos por el antioxidante, para lo cual se busca su concentración óptima.

En el sistema de homogeneizado de cerebro, no hay variación en la lipoperoxidación espontánea en ratas suplementadas con aceite frente a ratas controles, sin embargo, el aceite con DL α Tocoferol o Quercetina, tiende a disminuir la lipoperoxidación.

Se encontró variaciones significativas con una probable respuesta adaptativa del plasma de rata tratada con aceite, el cual inhibe la lipoperoxidación en mayor grado que plasma de rata control; el efecto de adición de DL α Tocoferol al aceite es de una mayor inhibición de lipoperoxidación frente al aceite sólo y la adición de Quercetina no altera el efecto del aceite sólo.

Financiado por FONDECYT 952/89.

108

MODULACION DE LA W Y W-1 HIDROXILACION DEL ACIDO LAURICO POR FACTORES NUTRICIONALES. (Modulation of lauric acid W and W-1 hydroxylation by nutritional factors). Orellana, M., Valdés, E. y Gil, L. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Acido Láurico es un ácido graso de 12 carbonos que está presente en los lípidos de la dieta. El citocromo P-450 microsomal hepático oxida a este ácido graso saturado generando 2 productos: los ácidos 12-hidroxi láurico (W) y 11-hidroxi láurico (W-1). En un trabajo previo a éste, utilizando ácido araquidónico (A.A.) como sustrato, encontramos que la desnutrición proteico energética (DPE) disminuye la producción de todos los productos de oxidación del A.A. con excepción de los W y W-1 hidroxi derivados (Orellana et al. Arch. of Biochem. and Biophys. 274, 251-258, 1989). Se ha demostrado que la W y W-1 hidroxilación de ácidos grasos son catalizadas por 2 enzimas citocromo P-450 diferentes, denominadas P-450 Law. y W-1 hidroxilasa. Con el objeto de verificar si estas hidroxilasas son moduladas por el estado nutricional, se incubaron microsomas de hígado de ratas controles, desnutridas (DPE) y realimentadas utilizando Acido Láurico como sustrato. Los ácidos W y W-1 hidroxi láurico fueron analizados por HPLC mediante una técnica desarrollada en nuestro laboratorio. La DPE aumentó al triple el metabolismo total del Acido Láurico, aumentando ambas hidroxilaciones. Al realimentar estas ratas, reponiéndoles las proteínas de la dieta, el metabolismo del Acido Láurico disminuyó debido principalmente a la menor producción del W derivado.

Estos resultados indicarían que la DPE aumentaría el contenido o actividad de los Citocromos P-450 Law. y W-1 hidroxilasa. También sugieren que la actividad de estas isoenzimas sería modulada en distinto grado por el contenido proteico de la dieta.

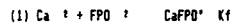
Financiado por el Proyecto 0863 FONDECYT

110

MECANISMO DE ABSORCION DEL MONOFLUOROFOSFATO DISODICO EN EL TRACTO GASTRO INTESTINAL (Disodium monofluorophosphate absorption mechanism in the gastro-intestinal tract). Villa, A. y Carrasco E., Unidad de Bioquímica Farmacológica. INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: E. Spencer).

Dentro de los diversos tratamientos existentes para la osteoporosis, destaca la administración de fluoruro ya que este es el único agente farmacológico que estimula la actividad osteogénica. Debido a los efectos secundarios asociados al uso de fluoruro de sodio, se ha propuesto la utilización del Monofluorofosfato disódico (MFP) como una alternativa ventajosa. Sin embargo, el mecanismo y sitio principal de absorción del MFP administrado oralmente, no se han determinado claramente.

Dada la importancia farmacológica que tiene el conocimiento de estos procesos y en base a resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio hemos postulado que este mecanismo está asociado a la formación de un complejo neutro del anión monofluorofosfato y el calcio presente en las secreciones gastro-intestinales ó adicionado previamente al MFP; según la reacción (1).



Hemos determinado el valor de Kf a 25°C como 185215 (unidades molares). Este complejo sería liposoluble y al penetrar la membrana en el sitio de absorción sería hidrolizado por fosfatasa alcalina, generando fluoruro iónico y ortofosfato en el sistema circulatorio, manteniéndose una gradiente de concentración de MFP a través de la membrana. Utilizando un modelo animal se ha determinado, *in vivo*, la importancia relativa de la absorción gástrica e intestinal del MFP, midiendo su concentración residual en el contenido luminal después de 30min. de haber sido administrado, encontrándose los valores de absorción gástrico en el rango 30-40%.

Se ha determinado el aumento del fluoruro plasmático que ocurre en dicho periodo, así como también se han caracterizados las actividades de fosfatasa alcalina en los diferentes segmentos del tracto gastro-intestinal. Los resultados obtenidos en este estudio, que es parte de un proyecto más amplio, permiten concluir preliminarmente, que el mecanismo propuesto es razonablemente válido.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1201-90.

109

ESTIMULACION DE LA SECRECIÓN BILIAR DE COLESTEROL POR SIMVASTATIN, UN INHIBIDOR DE LA SINTESIS HEPATICA DE COLESTEROL. (Stimulation of biliary cholesterol output by Simvastatin, an inhibitor of hepatic cholesterologenesis) Amigo, L., Morales, M.N. y Bronfman, M. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina y Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Una nueva clase de drogas son usadas para el tratamiento de la hipercolesterolemia, éstas son inhibidoras competitivas de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, enzima limitante en la biosíntesis del colesterol (Col). Ellas reducen la síntesis de colesterol y estimulan la síntesis de receptores para lipoproteínas de baja densidad. Nuestro objetivo fue examinar el efecto de Simvastatin (SV) en la secreción de los lípidos biliares y en el metabolismo hepático de Col. Se utilizaron ratas Wistar (150-210g), alimentándolas con 2 a 50 mg% de SV en la dieta. Se tomaron muestras de bilis para determinación de lípidos biliares. En plasma e hígado se determinó la concentración de Col. En otros experimentos se estudió la esterificación de Col en hepatocitos aislados. Los resultados muestran un aumento significativo de aproximadamente 600% en el débito de Col y 80% en el de Fosfolípidos (FL) en ratas alimentadas 16 días con 20 mg% de SV. Con dosis entre 2% y 50% de SV en la dieta, el aumento fue entre 60-600% y para el FL fue entre 20-100%. Se observó un aumento de Col y FL ya a las 24 hrs de tratamiento con 20 mg% de SV. El Col-ester hepático aumentó en un 100% y el Col total un 25%, probablemente por aumento en la captación sinusoidal de Col lipoproteico ya que la síntesis hepática de Col-ester está disminuida en hepatocitos aislados de ratas tratadas. **Conclusión:** 1) El efecto hipocolesterolemiante de SV se acompaña de un aumento marcado en la secreción biliar de Col y podría tener efectos litogénicos. 2) El aumento de Col biliar podría ser secundaria a una disminución de la esterificación hepática de Col.

111

DISMINUCION DE LA SOBREVIDA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE EMBRION DE POLLO Y HEP - 2 POR DROGAS FOTOSENSIBILIZANTES (Decrease of cell survival of chick embryo fibroblast and Hep - 2 by photosensitizer drugs). Cortés, M.P., Glena, C., Fernández, E., Navarrete, E., Arrau, J. y Cárdenas, A.M. Laboratorio de Fotobiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Se estudió la capacidad fototóxica del ácido nalidixico (AN) y del ácido oxolínico (AO) sobre la sobrevivencia celular de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) y HEP-2 (líneas celular cancerígena de la ríngine humana). Suspensiones de FEP o HEP-2 (4×10^7 células/ml), en presencia de distintas concentraciones de las drogas fotosensibilizantes (5 μM - 500 μM), se irradiaron por cinco minutos con una lámpara de mercurio de media presión provista de filtro pyrex ($\lambda > 290$); la sobrevivencia celular se determinó contando el número de células capaces de formar monocapa 24 h después de la irradiación, usando como colorante azul de tripán. Los resultados mostraron una relación inversa entre la sobrevivencia celular y la concentración de droga adicionada al medio, siendo AN más fototóxico que AO sobre ambos tipos de células. Estos resultados se correlacionaron con estudios de fototoxicidad sobre eritrocitos humanos, realizados en nuestro laboratorio. Se discuten los resultados.

Proyecto UV-12/89 DICYT, Universidad de Valparaíso

112

LOS FOTOSENSIBILIZADORES 13²-HIDROXICLOROFILIDA Y 13²-HIDROXIFEOFORBIDA EN CELULAS CANCEROSAS. (The photosensitisers 13²-Hydroxychlorophyllide and 13²-Hydroxyphorbide in cancer cells). Schoch S. (1,2), Lempert U. (1), Moser J.G. (3) 1: Instituto Botánica Universidad München, München R.F.A., 2: Instituto Química Universidad Católica Valparaíso, Profesora Visitante del D.A.A.D., 3: Instituto de Medicina Laser Universidad Dusseldorf, Dusseldorf, R.F.A. (Patrocinio: L. Zúñiga).

Se ha determinado que *Chlorella protothecoides* contiene la enzima clorofilasa que cataliza la hidrólisis de clorofila a y b originando clorofilida a y b. Se describe las condiciones requeridas para cultivar estas algas y producir clorofilidas. Las condiciones óptimas fueron: incubación del alga en una mezcla acetona con tampón de fosfato (10 mM, pH 7.2) en proporción 1:1 por 15-30 minutos a temperatura ambiente. Los pigmentos se extraen con mezclas de acetona y agua (50 a 80%). Después de un tratamiento con hexano, los pigmentos se separarán en una columna de sílica gel. Este último procedimiento transforma las clorofilidas en los productos hidroxilados. Se cuantifican los pigmentos por medio de los espectros de absorción, usando los coeficientes molares de extinción de las clorofilas.

Las células cancerosas (LoVo, ATCC (N° CCL-229) fueron cultivadas e incubadas con los pigmentos (concentraciones de 0.5 a 6 μ M) por 20 a 60 minutos. Después de ser lavadas, fueron irradiadas con luz laser (654 nm y 695 nm) de diferente energía, determinando su sobrevivencia. Se pudo constatar que estos fotosensibilizadores son muy promisorios para la aplicación fototerapia de cáncer.

114

ACTIVIDAD ECTOPICA DE LA γ -GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT) EN HIGADO PERFUNDIDO DE RATA (γ -Glutamyl transferase ectoactivity in perfused rat liver). Carrión, Y. y Videla, L.A. Depto. Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La GGT en hígado de maníferos inicia la degradación del glutatión (GSH) y se encuentra preferencialmente en la región de la membrana canalicular de los hepatocitos. Se evalúa la posible actividad GGT en el polo sinusoidal de la célula hepática (GGTe) en el modelo de hígado perfundido de rata.

Hígados de ratas Sprague Dawley alimentadas fueron perfundidos con solución Krebs-bicarbonato pH 7,4 a 37°C. Luego de 15 min de estabilización, se infundió el sustrato artificial de GGT, γ -glutamyl-p-nitroanilida (GGpNA) (0,1-0,8 mM) y se determinó p-nitroanilina (pNA) a 405 nm en muestras de perfusado efluente tomadas cada 2 min, en ausencia y presencia de 8 mM glicil-glicina (GG), aceptor del grupo γ -glutamilo.

Los resultados muestran la capacidad del hígado para metabolizar GGpNA a nivel sinusoidal, en condiciones en que su utilización intracelular es mínima (Alcohol 7, 339 (1990)). La producción de pNA en ausencia de GG corresponde a hidrólisis y autotransferencia de GGpNA (A) y es aumentada en presencia de GG (B). La diferencia (B-A) corresponde a GGTe, la cual presenta un comportamiento hiperbólico, con una Km aparente de 0,33 mM y Vmax = 50 nmol/g hígado/min, correspondiendo a un 20% de la actividad total medida en homogeneizados hepáticos. La actividad GGTe podría cumplir un rol importante en la degradación del GSH circulante, permitiendo la reutilización de los productos de síntesis de novo de GSH a nivel intracelular, lo cual sería de particular relevancia en condiciones de toxicidad que conllevan un aumento de la GGT total. (FONDECYT 987/1990 - DTI, Universidad de Chile)

113

PROTEOGLICANOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL CANINO. Silva, N., Farías, G., Garcés, H., Rivera, A. Dpto. Patología Animal Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile.

Se estudia la conformación de la matriz extracelular del disco intervertebral canino a través de la extracción de proteoglicanos y su caracterización bioquímica e histoquímica. Se conoce la importancia de ellos pero no bien su distribución en las diferentes zonas del disco y su relación con procesos patológicos.

Se trabajó con discos intervertebrales de la zona lumbar de caninos adultos entre 3 y 5 años de edad. Se realizaron cortes histológicos para ser sometidos a la acción de colorantes catiónicos: Azul de Toluidina, Azul de Alciano y Safranina. Otro grupo de muestras fueron separadas, aislando zona externa e interna del anillo fibroso y núcleo pulposo para someterse a la extracción de Gag's de acuerdo a la técnica de Nakano et al (1986) y luego determinar el ácido urónico por la reacción del carbazol, electroforesis y espectrofotometría U.V. y visible de los extractos puros y sometidos a la acción de los colorantes, comparados con patrones comerciales de Gag's y extracto de cartilago nasal canino.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se establece que el disco intervertebral canino contiene principalmente condroitinsulfato, pero en diferentes proporciones en las zonas estudiadas p.e. en la zona externa del anillo fibroso existe una menor concentración de Gag's totales, mientras que en la zona interna y núcleo pulposo la concentración es mayor, en una relación 1:3. Los cortes histológicos fijados y teñidos con los mismos colorantes catiónicos presentan igual afinidad, lo que indica que efectivamente la mayor o menor tonalidad obtenida se relaciona con los Gag's presentes en la matriz extracelular del disco intervertebral. Esta es una de las bases de estudio para el análisis posterior de procesos patológicos.

Proyecto DTI 2939 - 8922

115

FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA DEPLECION DE GLUTATION (GSH) HEPATICO EN HIPERTIROIDISMO (Factors contributing to liver glutathione depletion in hyperthyroidism). Fernández, V., Barros, S., Simizu, K. y Junqueira, V. D. Ciencias Biológicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile e *Instituto de Química, Universidad de Sao Paulo.

El hipertiroidismo experimental conduce a una condición de estrés oxidativo en concomitancia con una depleción de GSH hepático, con 50-60% de caída a los 3 días de tratamiento con triiodotironina (T₃). Este menor nivel de estado estable de GSH podría deberse a cambios en alguno de los mecanismos de aporte y utilización que regulan el nivel de GSH hepático, y que son objeto del presente estudio.

Se evalúa el efecto de T₃ (0.1 mg/kg peso durante 3 días consecutivos) en ratas Wistar macho alimentadas sobre: (a) la velocidad de recambio fraccional (VRF) de GSH, mediante un pulso de cisteína-S₃₅ (200 μ Ci/kg peso), determinando el decaimiento específico (cpm/mol GSH) y el recambio neto (R) (nmol/g hígado/min); (b) la actividad de γ -glutamyl transferasa (GGT) en homogeneizados hepáticos incubados con γ -glutamyl-p-nitroanilida y glicil-glicina; (c) las velocidades de eflujo canalicular (EC) y sinusoidal (ES) de GSH, medido en muestras de bilis (ratas anestesiadas) y de perfusado hepático (hígado aislado y perfundido), respectivamente.

El tratamiento con T₃ no modificó el EC de GSH, incrementando en ES (86%), el R (62%) y la actividad de la GGT (130%). El efecto neto sobre el ES representa un 90% del aumento en el R, por lo que la mayor utilización de GSH por la GGT podría ser relevante en la depleción de GSH hepático en el hipertiroidismo. (FONDECYT 987-1990; Departamento Técnico de Investigación, Universidad de Chile).

116

ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE LA REACCION ALDOLASA *in vivo* MEDIANTE MUTANTES DE *E. coli*. (Study of the equilibrium of the aldolase reaction *in vivo* using *E. coli* mutants).

Babul J., Clifton D. y Fraenkel D.G. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Harvard Medical School, EE. UU.

La reacción que cataliza la aldolasa no está en equilibrio *in vivo* en *E. coli*. Al crecer las cepas con glucosa marcada en C-6 se obtiene fructosa-1,6-bisP (FBP) marcado principalmente en C-6, en vez de estar las posiciones C-6 y C-1 igualmente marcadas. Es posible que la aldolasa o la triosa-P isomerasa constituyan un paso limitante, o que una de las reacciones no sea muy reversible *in vivo*. Al disponer de cepas con niveles elevados de aldolasa, que no presentan diferencias en la utilización de glucosa con respecto a la silvestre, es posible averiguar si existe equilibrio entre triosas-P y FBP.

Cepas clonadas, con niveles de aldolasa cinco veces (fba-5) y 30-40 veces (fba-40) mayores que las cepas control (fba-1), se crecieron aeróbicamente en un medio completo hasta la fase logarítmica temprana, se resuspendieron en medio mínimo y se incubaron a 30 en presencia de nitrógeno, 6-14C-glucosa 0,2% y cloramfenicol, en un volumen de 4-10 ml. El FBP presente en extractos perclóricos neutralizados, se aisló por cromatografía de intercambio iónico en un cromatógrafo líquido acoplado a un contador de radioactividad y se convirtió enzimáticamente en glicerol-P y 3-P-glicerato, los que se separaron por el mismo procedimiento para determinar el % de la marca en el C-1 y C-6.

Los valores aproximados de la marca en el C-1 fueron: fba-1, 25 %; fba-5, 35 % y fba-30-40, 50 %. Esto indica que en las células en reposo existe un equilibrio parcial entre los reaccionantes, el cual es completo en la cepa con los niveles más altos de aldolasa y que la cantidad adicional de enzima, por sobre la de la cepa silvestre, funciona *in vivo*. (Financiado por Harvard Medical School, Fondecyt y Fundación Andes).

118

DIABETES EXPERIMENTAL EN RATAS: MODULACION DE LA UDP-GLUCURONILTRANSFERASA MICROSOMAL HEPATICA. (Experimental diabetes in rats: modulation of hepatic microsomal UDPGT) Vega, P., Gaulle, C. y Del Villar, E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U. de Chile. (Patrocinio: L. Gil).

En la diabetes mellitus hay un trastorno importante en el metabolismo endógeno. Es de interés por lo tanto, estudiar la influencia de este estado en las vías metabólicas y disposición a las drogas mediante el uso de modelos animales. La diabetes inducida por aloxano se asemeja a la diabetes mellitus dependiente de insulina. Las reacciones de conjugación catalizadas por la enzima UDP-Glucuroniltransferasa (s), son los procesos más importantes que determinan la inactivación y excreción de xenobioticos.

En este trabajo se estudia en forma comparativa, la alteración de la membrana microsomal inducida por la diabetes y la capacidad de glucuronización *in vitro* en ratas de ambos sexos. El estado de diabetes se obtuvo con una dosis i.v. de aloxano (50mg/Kg). Un grupo de ratas diabéticas recibió 3 dosis de insulina lenta (3 U/100g). En microsomas hepáticos de ratas: controles, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina, se midió la actividad UDPGT para diversos sustratos.

Se obtuvieron diferencias importantes en las actividades catalíticas estudiadas y en la activación por detergente, por efecto de la diabetes y por el sexo. Los resultados sugieren que la diabetes interfiere con el efecto estimulador de las hormonas androgénicas en el metabolismo en ratas machos. Este efecto ocurriría a niveles hepático y de la glándula pituitaria porque la activación *in vitro* de la UDPGT no abolió las diferencias metabólicas.

PROYECTO B - 2666 - 9034 DTI

117

ESPECIES DISOCIADAS DE ARGINASA DE HIGADO HUMANO Y LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA ENZIMA. (Dissociated species of human liver arginase and the quaternary structure of the enzyme). Echeverría, V., Torres, C., Carvajal, N., Godoy, M., Silva, P. Depto. de Biología Molecular, Universidad de Concepción. (Patrocinio: M. Puchi).

La arginasa de hígado humano es una enzima oligomérica formada por subunidades iguales, cuya interacción depende de la presencia de Mn^{2+} . Hasta el momento, sólo el empleo de la enzima inmovilizada ha permitido el estudio de especies monoméricas de arginasa. Aun cuando la mayor parte de las evidencias disponibles sugieren una estructura tetramérica, también se ha sugerido una estructura trimérica para la enzima. Junto con el interés por aportar evidencias adicionales para la estructura oligomérica de la enzima, este trabajo forma parte de un estudio destinado a encontrar condiciones que posibiliten el análisis de la actividad catalítica de especies monoméricas en solución, además de facilitar el análisis de la interacción de la enzima con el metal activador.

Los resultados obtenidos muestran que a pH 8 y en presencia de maleato 10 mM, la enzima se disocia en especies dimericas. Se observó, además, la presencia mayoritaria de especies monoméricas cuando una preparación de naturaleza en urea 8 M y luego renaturada a pH 8 en Tris-maleato 20 mM, $MnCl_2$ y 2-mercaptoetanol 1 mM, fue cromatografiada en una columna de Sephadex G-200 equilibrada con el mismo buffer. Se estudió, además, la distribución electroforética de especies entrecruzadas con diámetros. Los resultados muestran la presencia mayoritaria de especies dimericas, lo que concuerda con la estructura previamente sugerida en base a estudios con la enzima inmovilizada.

Financiado por FONDECYT 90/0261.

119

MODULACION FARMACOLOGICA DE LA PROSTAGLANDINA H SINTETASA Y ALDEHIDO DESHIDROGENASA. (Pharmacological modulation of prostaglandin H synthase and aldehyde dehydrogenase). Guivernau, M. Tampier, L. Dpto. Farmacol. Fac. Med. U. de Chile.

La prostaglandina H sintetasa (PGHS) es responsable de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas; la aldehído deshidrogenasa (ALDH) de la oxidación del acetaldehído (ACH), metabolito activo del etanol. La modulación de estas enzimas asume especial relevancia en los efectos cardiovasculares del alcohol, tal como la reacción flushing utilizada en el tratamiento del alcoholismo. En este trabajo estudiamos la interacción de diversos fármacos con estas enzimas. La actividad de PGHS se estudió midiendo por radioinmunoensayo la producción vascular de prostaciclina en aortas de ratas Wistar incubadas en Krebs con 10 μ M de propranolol, dipiridamol, furosemida o captopril solos y asociados a (ACH). La actividad de ALDH se estudió en mitocondrias hepáticas de animales tratados con estos fármacos e incubadas con (ACH) 100 μ M, midiéndose su tasa de desaparición por cromatografía gaseosa. Furosemida, propranolol, captopril (C) y dipiridamol (D) estimularon la síntesis de prostaciclina vascular; (C) y (D) potenciaron el efecto estimulante de (ACH) sobre prostaciclina. Los 4 fármacos inhibieron la actividad de la ALDH hepática responsable de la desaparición de (ACH) del organismo. Estos resultados plantean la posibilidad terapéutica de desencadenar la reacción flushing e inducir rechazo al consumo de etanol en presencia de niveles bajos y no tóxicos de (ACH). Además, sugieren que la ingestión de alcohol en pacientes tratados con alguno de estos fármacos debiera en lo posible contraindicarse. FONDECYT 0988-88; DTI-U. de Chile M-1975-8813.

120

INTERACCION ENTRE ALDOLASA Y FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA INMOVILIZADA. (Interaction between aldolase and immobilized fructose-1,6-bisphosphatase). Berlien, G., León, O., Ludwig, H. y Siebs, J.C. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Con el objeto de estudiar la probable interacción entre Fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) y otras enzimas del metabolismo de carbohidratos, se unió covalentemente FBPasa de riñón de cerdo a Sepharose-4B a través de un espaciador formado por dihidrazida adipica y etilenglicol-(bis-succinimidil)-succinato.

La FBPasa inmovilizada presentó una menor afinidad por los inhibidores AMP y fructosa-2,6-bisfosfato respecto a la enzima libre, y no fue activada por el ión potasio.

Se cromatografió aldolasa pura de riñón de cerdo en una columna que contenía Sepharose-4B-FBPasa, observándose la retención de la proteína, la que en experimentos control con Sepharose-4B conteniendo el brazo espaciador sin la FBPasa, no se retuvo. La aldolasa retenida se eluyó con fructosa-1,6-bisfosfato (sustrato) o con cloruro de sodio. Sin embargo la concentración requerida para la elución fue mucho menor para el sustrato (200 μ M) que para NaCl (10 mM).

Al aplicar a la columna de Sepharose-4B-FBPasa una muestra de aldolasa parcialmente purificada, se observó la retención específica de esta enzima, lo que se demostró por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Los resultados obtenidos muestran una interacción específica entre aldolasa y FBPasa, enzimas que catalizan reacciones sucesivas en la gluconeogénesis, lo que abre interesantes perspectivas para el estudio de la formación de complejos multienzimáticos. (Financiado por proyectos: DID-UACH, S-87-37; FONDECYT, 188/89).

121

MODULACION DE LA MOVILIDAD LARVAL DEL "LOCO" POR EL ION POTASIO. (Modulation of "loco" larval mobility by K^+ ions). Canoas, E.O., Foster, R. y González, M. Unidad de Neurobiología Molecular, Fac. Cs. Biológicas, P. U. Católica de Chile.

El eventual cultivo del "loco" Concholepas concholepas, requiere del desarrollo de técnicas simples de manejo larval, factibles de ser implementadas a gran escala. En este contexto hemos comunicado previamente que el ión K^+ induce la sedimentación de larvas veligeras de "loco" (Arch. Biol. Med. Exptl. 22:R-184, 1989). Esto es muy interesante, porque la primera respuesta conductual de larvas competentes en asentamiento implica el sedimentar desde el plancton al bentos marino. En el presente trabajo se ha estudiado de que manera el efecto ejercido por el ión K^+ es modulado por la calidad del agua de mar (AM). Los resultados indican que la sensibilidad de larvas veligeras a concentraciones de 15 y 30 mM K^+ , es mayor en agua de mar artificial (AMA) que en AM natural filtrada (0,45 μ m). Pulsos repetidos de K^+ (30 mM), y posterior lavado de las larvas, determinan una recuperación menor de la movilidad larval en AMA que en AM natural filtrada. Por otro lado larvas expuestas a un pulso único de K^+ recuperan su movilidad más rápidamente en AM filtrada que en AMA. Estudios en marcha examinan los efectos de la salinidad y temperatura sobre la acción del ión K^+ .

En conclusión, metodologías simples que impliquen la manipulación de la composición iónica del AM podrían ser un paso necesario en el manejo del asentamiento larval en C. concholepas.

Proyecto FONDECYT Sectorial "Loco" 3502/89 al Dr. Nivaldo C. Inestrosa.

122

ACETILCOLINESTERASA: UN MARCADOR MOLECULAR UTIL PARA DEFINIR LA METAMORFOSIS DEL "LOCO". (Acetylcholinesterase: A useful molecular marker to define metamorphosis in "Loco")

Perelman, A. Unidad de Neurobiología Molecular, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El cultivo artificial del "loco" surge como potencial solución para estudios de repoblamiento de poblaciones naturales en extinción y también para la eventual producción de organismos en hatchery. Con este fin es necesario disponer de larvas competentes para las cuales no existen marcadores moleculares conocidos. Un parámetro interesante es la enzima acetilcolinesterasa (AChE) la cual está involucrada en la transducción de señales en el sistema nervioso de invertebrados marinos. Previamente, hemos comunicado la existencia y características bioquímicas de esta enzima.

Entre los resultados destacan que: (1) La actividad de la AChE aumenta durante el desarrollo hasta 3 órdenes de magnitud desde huevo a recluta, indicando que esta enzima puede ser utilizada como índice de diferenciación del "loco". (2) La razón entre la actividad AChE/BuChE aumenta específicamente en el período que va entre larvas veligeras a reclutas, sugiriendo que esta razón podría ser utilizada como índice de asentamiento larval.

(3) Estudios con reclutas recién metamorfoseados (1,8-2,5 mm) muestran la expresión diferencial de la forma globular G_2 de la AChE. Esto permite definir por primera vez en el "loco" una modificación molecular que acompaña a la metamorfosis de este muricido.

Financiado por Proyecto Sectorial Recurso "Loco" FONDECYT 3502/89 al Dr. Nivaldo C. Inestrosa.