

Noticiero de **BIOLOGIA**

ISSN 0717 - 0459

Organo Oficial de la Sociedad de
Biología de Chile

REUNION ANUAL CONJUNTA

**XXI Reunión Anual de la Sociedad de
Bioquímica y Biología Molecular de Chile**

**XII Reunión Anual de la Sociedad de
Biología Celular de Chile**



22 al 25 de Septiembre 1998

**Hotel Villa del Río
Valdivia - Chile**



FUNDACION
CHILENA
PARA
BIOLOGIA
CELULAR

**REPORTAJE:
La Biotecnología en Chile**

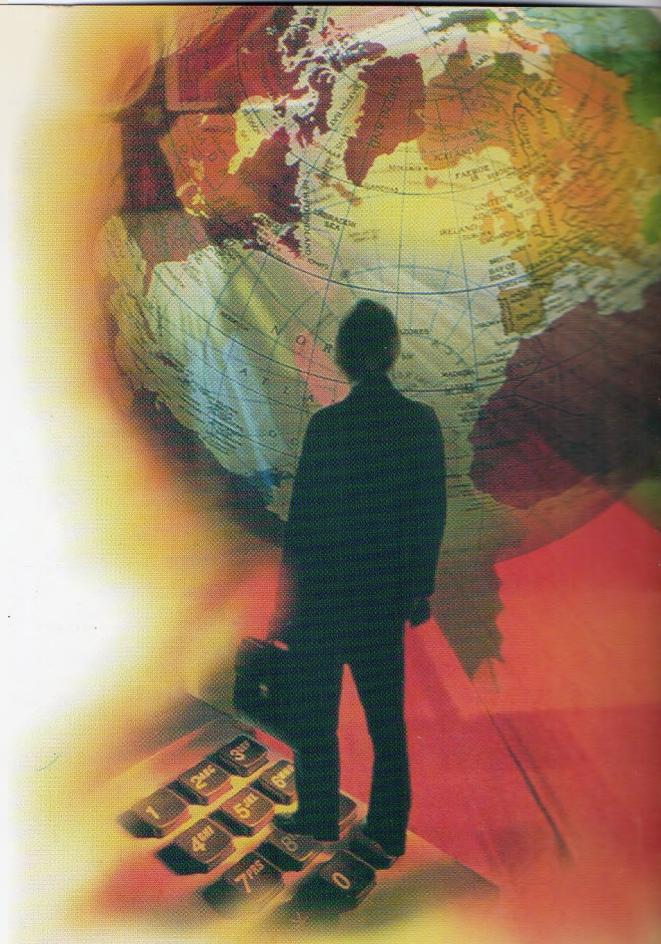


INGEMED[®]
INGENIERIA MEDICA S.A.

Desde 1994, año de su creación, Ingemed, Ingeniería Médica S.A. ha establecido contacto con importantes empresas a nivel mundial para traer a Chile una amplia gama de productos y satisfacer las necesidades de los investigadores nacionales. Nos hemos preocupado de que todas las empresas que representamos sean innovadoras y cumplan con los estándares de calidad exigidos a nivel internacional.

Nuestro estrecho contacto con ellos ha dado paso a una fluida relación que nos permite no sólo responder cada vez con mayor rapidez a nuestros clientes sino también lograr ventajas comparativas en materia de precios.

Buscamos satisfacer sus requerimientos mediante un permanente contacto que nos permita establecer una relación de larga duración con mutuos beneficios.



Representante exclusivo de:

BIO-RAD

R&D
SYSTEMS

OXIS
International, Inc.

NOTICIERO de la SOCIEDAD de BIOLOGIA de CHILE

Director Responsable:

Dr. Jorge Martínez W.

Representante Legal:

Dra. M. Cecilia Hidalgo T.

Director Reemplazante:

Dr. Miguel Bronfman A.

Dirección:

María Luisa Santander 0363,

Providencia - Santiago

Teléfono: 209 3503

Fax: 225 8427

**Directorio de la Sociedad de
Biología de Chile:****Presidenta:**

Dra. M. Cecilia Hidalgo T.

Vice-Presidente:

Dr. Nibaldo Inestrosa C.

Secretario:

Dr. Felipe Barros O.

Tesorero:

Dr. Miguel Bronfman A.

Directores:

Dra. Rosalba Lagos M

Dr. Enrique Brandan S.

Presidente anterior:

Dr. Eugenio Spencer O.

EDITORIAL

LA EMPRESA DE LA BIOTECNOLOGIA

En el presente número de nuestra revista nos ocupamos del tema de la Biotecnología. ¿Es un tema la Biotecnología? Sin duda que sí, y por varias razones.

En primer lugar, esta rama de la Biología reside en un espacio fronterizo entre la ciencia más bien disciplinaria -a cuyos códigos y ritual estamos adaptados- y el universo de la aplicación y el vínculo con la empresa productiva, en cuyo entorno nos movemos con bastante menos expedición, con sospechas recíprocas y, en general, con pocos y malos resultados.

En segundo lugar, es obvio que las potencialidades de la Biotecnología son enormes y abarcan los más variados ámbitos. A diario nos enteramos por la literatura especializada de nuevos hallazgos, nuevas patentes o descubrimientos en el campo de las disciplinas que abren un horizonte muy amplio de aplicaciones biotecnológicas. Esta realidad ha sido considerada por los científicos nacionales y asumida como una tarea posible. De este modo, tras años de enconados esfuerzos, un número pequeño pero significativo de biólogos nacionales han comenzado a explorar el campo de la Biotecnología desde sus particulares disciplinas.

Parte de la experiencia que los científicos nacionales han ganado en la práctica de la Biotecnología está vertida en sus opiniones, que constituyen el reportaje que presentamos en este número de Noticiero. Como el lector podrá apreciar, la forma como nuestros biotecnólogos colaboradores enfrentan el tema del desarrollo de la Biotecnología es diversa y seguramente es así como debe ser. Nuestra revista se ha planteado desde su fundación el objetivo de servir de lugar de expresión de las opiniones de nuestros socios y ésta es otra oportunidad para ejercer el sagrado derecho a la discrepancia. Esperamos que de discusiones como ésta pueda surgir el embrión de una política que estimule el desarrollo de un área de la Biología que puede tener un papel trascendente en el desarrollo económico nacional.

Cecilia Hidalgo T.

Presidenta

Sociedad de Biología de Chile

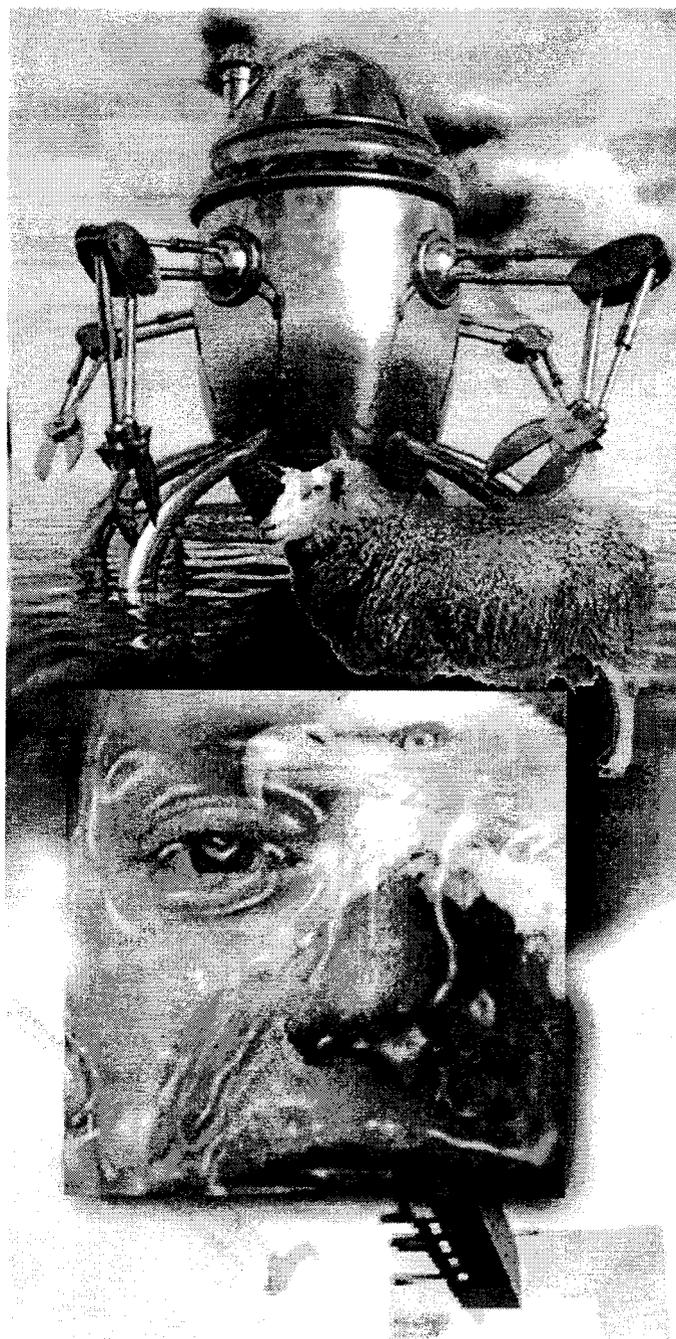
REPORTAJE:

La Biotecnología en Chile

Del mismo modo como ocurre en otros países, a partir de las dos últimas décadas se ha comenzado a desarrollar en Chile una ciencia que vincula el conocimiento básico con la aplicación, la industria y los negocios: La Biotecnología. No hay discusiones respecto de la importancia de desarrollar Biotecnología en Chile. Las preguntas son otras y tienen que ver más con el cómo, con quien, qué área en forma prioritaria etc.

Con el propósito de propiciar una productiva discusión sobre el tema, convocamos a distinguidos biólogos nacionales quienes, desde las particularidades de su trabajo disciplinario, hacen alguna forma de Biotecnología. Los convocamos a contestar el siguiente cuestionario:

1. *¿Qué entiende usted por Biotecnología?*
2. *Por favor, describa de un modo resumido las características de su línea de investigación y las fuentes de financiamiento que la sustentan.*
3. *Desde su punto de vista, ¿cómo ve el futuro de la Biotecnología a nivel universitario?*
4. *¿Cómo calificaría usted el esfuerzo que hace el Estado para el desarrollo de la Biotecnología?*
5. *En su trabajo de investigación ¿ha tenido interacciones con la empresa privada? ¿qué experiencias ha recogido de esta interacción? ¿considera Ud. que la empresa nacional es un socio adecuado para el desarrollo de proyectos biotecnológicos?*



FERNANDO ACEVEDO BONZI

Profesor Titular de la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Católica de Valparaíso. Presidente (s) del Comité Nacional de Biotecnología-CONICYT

1. En mi concepto, la Biotecnología es el cuerpo de conocimientos destinados a aprovechar las potencialidades de los sistemas celulares y sus componentes para la producción de bienes y servicios. En ella participan científicos, ingenieros y tecnólogos, ya que la Biotecnología es esencialmente multidisciplinaria.

2.a. Ingeniería de Fermentaciones. Tiene como objetivo general desarrollar procesos técnica y económicamente factibles para la producción de metabolitos y enzimas por técnicas de cultivo de microorganismos silvestres, mutados y recombinantes en diversas modalidades: cultivos discontinuos, continuos y semicontinuos, cultivos sumergidos y en sustratos sólidos. Proyectos específicos en esta línea son la producción de lactasa, penicilina acilasa, alginato bacteriano, vacunas para peces y ácido giberélico.

El financiamiento proviene de la Universidad a través del concurso anual de proyectos de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados (ex Dirección General de Investigación y Postgrado) y de recursos externos tales como FONDECYT, FONDEF y fondos provenientes de organizaciones internacionales, tales como OEA, UNESCO, ONUDI y PNUD.

b. Lixiviación Bacteriana de Minerales. El objetivo general es el desarrollo de tecnologías aplicables en el país para el tratamiento bacteriano de minerales, en especial de cobre y oro. A partir de 1974 hemos trabajado con minerales sulfurados de cobre de baja ley, con relaves y con minerales concentrados, utilizando columnas percoladoras y tanques agitados mecánicamente. También hemos examinado en detalle los aspectos nutricionales y cinéticos de diversas cepas lixiviantes. Desde hace 5 años hemos centrado nuestros esfuerzos en la biooxidación de concentrados refractarios de oro. Se ha comparado el comportamiento de diversas configuraciones de biorreactores, se ha implementado un sistema de biooxidación continua y se ha cuantificado los procesos de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono.

Las fuentes de financiamiento son las mismas que en el caso anterior.

3. Creo que el futuro de la Biotecnología en Chile a nivel universitario es promisorio. De hecho ya es una realidad, como lo demuestran los numerosos proyectos de investigación en el área, los programas de pre- y post-grado, los cursos extraordinarios con profesores visitantes del extranjero, la actividad del Comité Nacional de Biotecnología de CONICYT, los congresos nacionales de Biotecnología (a fines de Septiembre se realiza el 4°), la participación en programas y redes internacionales tales como el Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología, el Programa regional de Biotecnología de América Latina y El Caribe, diversos programas Alfa y con la Unión Europea y numerosas otras acciones.

4. Como investigador del área uno tiende a pensar que siempre el Estado podía dar mas apoyo y mostrar una voluntad política más firme y pública de apoyo a la Biotecnología. Sin embargo creo que se debe ser justo y reconocer que en los últimos 15 y mas años se ha recibido un importante y creciente apoyo directo e indirecto, a través de instancias tales como el Comité Nacional, FONDECYT y FONDEF.

5. He tenido oportunidad de interactuar con diversas empresas del sector productivo, tales como CRAVAL, Pesqueras Unidas, Instituto de Salud Pública, Dos Alamos, Resiter, CODIPRA, Inducorn, Lefersa, Minera Panulcillo, CODELCO, Aquatic Health, Alpina Alimentos (Bogota, Colombia) y otras. Es una experiencia extraordinariamente valiosa, pero nada de fácil. Existe una dificultad clara en esta relación, que nace en parte por la poca tradición que existe al respecto en el país y por una mutua desconfianza que he creído percibir entre las partes. Esta situación ha mejorado notoriamente en los últimos años, pero aun se está lejos de poder aprovechar plenamente los indudables beneficios mutuos que reporta la fluida relación universidad-empresa.✻



MARIO ROSEMBLATT S.

Director Ejecutivo
Fundación Ciencia para la Vida



1. Creo que es importante ir un poco más allá de una simple definición de Biotecnología. Para los científicos de mi generación, que entramos al mundo de la ciencia en la segunda mitad de este siglo, hemos vivido cambios fundamentales en la forma de mirar y hacer ciencia. El advenimiento de la Biotecnología en la década de los 80 ha tenido un impacto importante en este respecto.

La Biotecnología involucra un enfoque multidisciplinario y está basada fundamentalmente en tres técnicas de reciente desarrollo: DNA recombinante, producción de anticuerpos monoclonales y cultivo celular. Estas tres técnicas, que forman la base de la ingeniería genética de microorganismos, plantas y animales han logrado, a través de la Biotecnología, integrar mejor que ninguna otra disciplina las distintas ramas de la biología. En mi opinión, este atributo de la Biotecnología de desdibujar los límites entre diferentes disciplinas, ha hecho desaparecer también las fronteras entre ciencia básica y aplicada. Esto debería llevar también a borrar la preocupación que pudiera existir entre algunos burócratas y científicos sobre la decisión de financiar un tipo de investigación u otra, aunque en este punto me adhiero al pensamiento de Louis Pasteur de que "no existe ciencia pura y ciencia aplicada, sino sólo buena ciencia".

2. Mis proyectos de investigación están en el área de la inmunología fundamental financiados por Fondecyt. La pregunta que intentamos responder en nuestro laboratorio es cuál es el mecanismo que determina que un linfocito inmaduro que tiene una migración no restringida se transforme en una célula con un "homing" específico hacia un cierto órgano linfóide secundario. Nosotros creemos que la respuesta está en un tipo especial de célula presentadora de antígeno -la célula dendrítica interdigitante (CDI)- que forma parte del estroma de cada órgano linfóide. Para confirmar esta idea trabajamos en aislar CDI de diferentes órganos que usamos como células presentadoras de antígeno a los linfocitos para posteriormente determinar la dotación de moléculas de adhesión que se inducen en cada caso. Sin embargo, dado que el número de linfocitos de una cierta especificidad que uno puede aislar de un ratón son extremadamente pocos, no es posible obtener mediante las CDI una población suficientemente grande de

linfocitos activados como para poder medir los cambios en los receptores de adhesión. Por eso para estos experimentos estamos usando linfocitos aislados de ratones transgénicos para el receptor de antígeno. En estos animales transgénicos la gran mayoría de los linfocitos T expresan una sola especificidad, y pueden ser activados masivamente con CDI "cargadas" con un péptido.

3. Creo que el futuro de la Biotecnología a nivel universitario, o más bien a todo nivel, está directamente relacionado con el futuro de la investigación científica en general. Estas no se pueden desligar ya que el desarrollo de la Biotecnología está íntimamente unido a los avances en Biología Molecular, Bioquímica, Genética, Microbiología, Inmunología, etc., Mientras en Chile mantengamos una ciencia básica saludable y competitiva el futuro de la Biotecnología será bueno. Se necesita fortalecer la ciencia en Chile con políticas que estimulen la transparencia dentro de la competencia. Yo no pienso que sea función de las Universidades incentivar la investigación en Biotecnología como una política universitaria. Después de todo en Biotecnología no puede separarse el proceso creativo del proceso productivo y la universidad no es un ente productivo. Pero sí puede confirmar su compromiso por la Ciencia y la investigación y por la preparación de los mejores científicos para que puedan ingresar al área de la Biotecnología. Esto no quiere decir que no se pueda realizar en la Universidad proyectos de investigación en temas de aplicabilidad más inmediata, y de hecho esto ocurre en nuestras Universidades, pero se debe mantener un balance que asegure una investigación de calidad ya sea que ésta esté destinada a servir a los científicos o al sector industrial o a los consumidores.

4. Existen estudios que señalan que para el sector industrial de manufactura el retorno social que resulta del gasto en I&D sobrepasa con creces al retorno privado. Desde esta perspectiva, si el beneficio social de la inversión en I&D es superior a las ganancias que obtienen las empresas, se justifica plenamente el que el Estado dedique fondos públicos a la investigación y a promover la inversión privada en este ámbito. Sin embargo, en nuestro país el Estado no visualiza el conocimiento como el motor del desarrollo nacional. Los instrumentos existentes para incrementar nuestra base científica y la innovación son insuficientes y descoordinados a pesar que tenemos una base de científicos altamente calificados para llevar a cabo esta función. El Estado debe invertir más en nuevos programas destinados a promover la innovación, sin reducir el actual esfuerzo en ciencia y debe jugar un papel central ordenando y coordinando mejor los planes exis-

tentes. Falta coordinación entre el sector académico nacional y el sector productivo y entre éstos y el sector innovador internacional, tanto académico como privado.

Otro ámbito donde el Estado debería implementar planes específicos y no lo ha hecho es el de la educación, tanto a nivel básico como superior. El factor humano es central en el desarrollo de una política de inversión en C&T. Deben aumentarse las becas de postgrado pero además deben iniciarse programas de becas que incentiven la incorporación de jóvenes Doctores en la industria nacional. El Estado chileno ha estado remiso en acciones de este tipo.

5. Partamos desde la última parte ya que es la más simple de responder. Yo creo que no es posible concebir el desarrollo de la Biotecnología sin la participación de la empresa privada. Creo que una de las razones por la cual la Biotecnología chilena no ha logrado despegar es precisamente por la falta de participación del sector privado. Y tampoco logrará hacerlo en el futuro si los empresarios chilenos no incorporan dos ideas centrales; que la Biotecnología es uno de los principales motores para el futuro desarrollo del país y que incluir Biotecnología en sus respectivos procesos productivos mejora la competitividad de sus empresas.

Mis contactos con el sector productivo nacional no han sido en el contexto de mis investigaciones, tal vez demasiado esotéricas para un empresario chileno, sino más bien dentro de mi trabajo de gestión académica que realicé en la Fundación Ciencia para la Vida. Consecuente con nuestro interés de actuar como un catalizador en la utilización de la Biotecnología por parte del sector industrial hemos intentado realizar contactos con algunos sectores que podrían hacer uso de biotecnologías. Estos contactos han sido difíciles y poco fructíferos.

A mi parecer existen tres obstáculos para la participación de los industriales chilenos en esta área; primero, creo que existe una cierta desconfianza por parte del sector industrial hacia el sector académico, en el sentido que no hemos aportado suficiente en la búsqueda de soluciones a los problemas que enfrenta la industria chilena. Segundo, los industriales no ven suficientes incentivos (tributarios) como para invertir parte de sus ganancias en I&D y reclaman acciones concretas del gobierno en ese sentido y tercero, los productores e industriales chilenos perciben la ciencia y el conocimiento como un aspecto más de la cultura, como la ópera o el fútbol, y no como una parte consubstancial al futuro desarrollo nacional. Sus aportes a la Ciencia se enmarcan dentro del mismo contexto que su ayuda a la pintura, la música o el deporte. Mientras no ocurra que el sector productivo internalice la idea que la Ciencia es el motor del desarrollo, ellos continuarán marginados de este importante esfuerzo nacional. *

PABLO VALENZUELA V.
Presidente Fundación Ciencia para la Vida
Presidente Bios Chile IGSA
Vicepresidente Chiron Corporation

1. En forma breve, Biotecnología para mí es el uso de las ciencias biológicas en la actividad productiva.



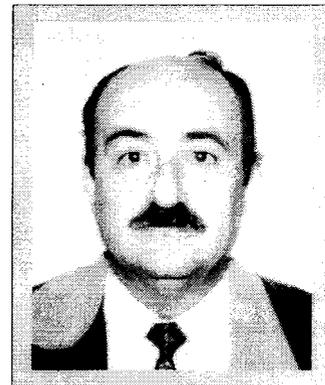
2. La línea de investigación principalmente incluye aplicaciones de la biología en el diagnóstico, prevención y control de enfermedades infecciosas en humanos y animales: hepatitis C, SIDA, enfermedad de Chagas, hantavirus, marea roja, enfermedades de salmonídeos, y otras. Están financiadas por la Fundación Ciencia para la Vida, empresas comerciales, Corfo y Fondecyt.

3. Excepto de la primera etapa, que es el conocimiento y descubrimiento, creo que la Biotecnología no es una actividad propia ni prioritaria dentro de la universidad. Con muy importantes excepciones, las actividades relacionadas con la Biotecnología en la universidad son mal enfocadas, muy distantes de la actividad productiva y en la práctica irrelevantes.

4. Hoy en día no hay una política de Estado en esta área en nuestro país (a diferencia de todos los países desarrollados incluyendo varios en desarrollo como Brasil, Corea y otros). El "esfuerzo" que hace el Estado en Chile lo calificaría como altamente insuficiente, descoordinado e irrelevante para el país.

5. Por muchas razones, que sería largo de mencionar, la empresa en Chile no está participando de la revolución biotecnológica. En aquellos casos en que he tenido un contacto serio con las empresas he tenido una muy buena experiencia. Creo que es importante insistir que la empresa es el único socio relevante para el desarrollo de proyectos biotecnológicos. Aquí y en la quebrada del ají. *

ANDRÉS ILLANES F.
Profesor Titular
Escuela de Ingeniería Bioquímica
Universidad Católica de Valparaíso



1. Biotecnología puede ser definida como el uso de sistemas biológicos para propósitos tecnológicos, esto es, la producción de bienes o servicios.

2. Mi línea de trabajo principal es la biotecnología de enzimas, tanto en sus aspectos de producción de biocatalizadores, como de su utilización. En la actualidad estoy desarrollando dos áreas. La primera, ya bastante avanzada, es el desarrollo de modelos de comportamiento de reactores con enzimas inmovilizadas, considerando el fenómeno de inactivación térmica. Hemos demostrado que sustratos y productos de la reacción son moduladores de la estabilidad térmica de la enzima (usualmente no considerado), siendo de gran relevancia para el comportamiento de reactores enzimáticos. Hemos trabajado con penicilina acilasa inmovilizada y actualmente estamos trabajando con una lactasa de levadura, fruto de un proyecto FONDEF concluido el año pasado. Esta línea de trabajo ha sido financiada por FONDEF (Proyecto AN-02, ya concluido) y por FONDECYT (proyectos 1950966, concluido, y 1971029 actualmente en ejecución). La segunda área, en una etapa inicial se refiere al uso de enzimas inmovilizadas en sistemas no convencionales. Actualmente hemos iniciado un proyecto de síntesis de antibióticos β -lactámicos con penicilina acilasa inmovilizada en sistemas con cosolventes orgánicos. De momento estamos trabajando con una enzima comercial de *E. coli* con financiamiento interno; el próximo año deberemos iniciar el trabajo con una enzima de *B. megaterium*, cuya tecnología de producción fue desarrollada en el proyecto FONDECYT 193761, para lo que esperamos obtener recursos de FONDECYT.

3. Me parece que en Chile existe una excelente base de recursos humanos y aceptables recursos de financiamiento para la investigación en Biotecnología. Chile ha sido tradicionalmente un país de mucha solidez en ciencias biológicas, existiendo diversos grupos de excelencia reconocidos internacionalmente. En el área de Biotecnología vegetal existen importantes grupos y aportes hacia el área agropecuaria, en la Universidad de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad Austral. En el área de ingeniería de bioprocesos existen a lo menos tres grupos de relevancia y reconocimiento internacional en la Universidad Católica de Valparaíso, la Universidad de Chile y la Pontificia Universidad Católica de Chile. En el campo de la Biotecnología ambiental, también hay un número significativo de investigadores en el campo en diversas Universidades (Concepción, Católica de Valparaíso, Santiago de Chile, La Frontera, por nombrar las principales). En el área de biohidrometalurgia nuestro país dispone de varios grupos de reconocido prestigio y productividad, principalmente en la Universidad de Chile y la Universidad Católica de Valparaíso.

4. Los programas gubernamentales, FONDECYT, FONDEF y FONTEC, representan un aporte significativo en recursos para el desarrollo de la Biotecnología. A través de ellos, se han financiado proyecto de investigación de excelencia, proyectos de integración con el sector productivo, proyectos de desarrollo de oferta (proyectos de equipamiento) y proyectos de desarrollo productivo. La participación del sector Biotecnología en los tres programas es destacada y refleja el nivel de oferta de conocimientos en el área. Los aportes del Estado han crecido de manera notable en la última década, no obstante que prevalecen deficiencias de equipamiento, derivadas de la situación presupuestaria del sistema universitario. Los programas de intercambio internacional y movilidad académica, especialmente con la Comunidad Europea, han tenido también un desarrollo importante en el campo de la Biotecnología. En este aspecto sí resulta deficitaria la relación con EE.UU., muy disminuida y restringida casi exclusivamente al programa Fullbright (donde la biotecnología no es área prioritaria) y a programas bilaterales inter institucionales.

5. Sí he tenido relación con empresas nacionales a partir de 1985, a través de proyectos del FDP de CORFO, de FONDEF y de convenios de asistencia técnica. La relación con la empresa es en esencia compleja, por la dificultad de conciliar intereses y expectativas. En el campo específico de la Biotecnología de procesos, las empresas han experimentado una progresiva transnacionalización en los últimos cinco años. Así es como en la actualidad la mayoría de ellas es de carácter transnacional, con casas matrices en países europeos o en EE.UU., donde se localizan sus departamentos de I&D. En tales circunstancias la relación en el campo de la I&D se vuelve dificultosa y la empresa manifiesta muy poco interés en la oferta local de conocimientos. En general, los convenios de asistencia técnica se llevan a cabo sin mayores tropiezos, dado que en este caso los objetivos y compromisos están claramente establecidos. Algo similar (aunque no tengo experiencia personal directa) ocurre en el caso de los proyectos FONTEC, donde la empresa está fuertemente comprometida en el desarrollo del proyecto. Con



ROMILIO ESPEJO T.
Profesor Titular
Jefe del Area Nutrición Básica y Ciencias de los Alimentos
INTA, Universidad de Chile

1. Biotecnología es la aplicación del conocimiento a procesos productivos que pueden ser realizados con seres vivos o partes de ellos.

2. Estudio de las comunidades microbianas que participan en procesos biotecnológicos con nuevos métodos de la biología molecular y aplicación de este conocimiento para mejorarlos con diferente profundidad, hasta generar en algunos casos procesos esencialmente nuevos.

3. La Universidad tiene un futuro limitado a parte de las actividades necesarias para hacer realmente Biotecnología. La Universidad tiene como misión incorporar el nuevo conocimiento producido por la investigación a la sociedad pero su aplicación a procesos productivos sólo puede realizarla en conjunto con empresas, debido a que la evaluación de las modificaciones es una práctica empresarial que considera muchos factores fuera de la biología. La universidad en esta forma sólo puede participar efectivamente entregando el conocimiento y asesorando su aplicación a demandas por las empresas de procesos. Generalmente estas demandas son de procesos simples que pueden implementarse o desarrollarse porque no están protegidos legalmente. En algunos casos de descubrimientos científicos con aplicaciones puede buscar un socio empresarial para manejar y explotar este desarrollo. Repito, la Universidad sólo puede realizar parte de las actividades necesarias para hacer Biotecnología efectivamente.

4. Escasos y mal orientados.

5. He tenido interacciones en forma muy diversa y en forma importante como miembro de una compañía de tecnologías. La experiencia principal es que en nuestro medio sólo se puede aspirar al desarrollo de procesos factibles de lograr en un máximo de dos años. Esto imposibilita el desarrollo de procesos realmente nuevos. La empresa nacional es un socio adecuado para el desarrollo de procesos menores de no más de dos años de duración o para la implementación de procesos conocidos cuando se requiere la interpretación de aplicaciones del conocimiento ya logradas.

Imitando a los países desarrollados, hay en Chile un énfasis en el desarrollo de una Biotecnología que genere nuevos procesos o productos tal como ocurre en esos países. Chile no tiene posibilidades de competir en este caso, salvo considerando ventajas éticamente no aceptables como falta de la estricta reglamentación o vigilancia que ocurre en esos países. Chile sí tiene un inmenso campo en la aplicación del conocimiento a procesos en los cuales tiene ventajas comparativas como los silvoagropecuarios y mineros. Sólo incorporando conocimiento en estos procesos seremos capaces mantener las ventajas comparativas. Es muy difícil que Chile pueda transformarse en un productor de nuevas vacunas, fármacos u otros elementos donde la Biotecnología ha tenido un impacto mayor en el público. Nuestros biotecnólogos serán requeridos en las empresas tradicionales como productores de vinos, frutas, productos del mar, etc., no en las muy escasas empresas biotecnológicas, muchas de las cuales están basando su subsistencia económica en la entrega de servicios o como importadoras de productos relacionados con la Biotecnología. ✱

FONDEF ocurre una situación compleja, por cuanto el compromiso de la Empresa no siempre es todo lo sólido y permanente que se requiere y en ocasiones los cambios de entorno pueden despriorizar el proyecto cara a la empresa, con consecuencias muy negativas para su desarrollo. En el campo de la Biotecnología, existe una empresa de corte tradicional (vinos, cerveza, levadura de panificación y derivados) progresivamente transnacionalizada, una empresa usuaria de insumos biotecnológicos (principalmente en el campo alimentario y farmacológico), una incipiente industria biotecnológica de avanzada, un número importante de empresas con requerimientos de manejo de efluentes y una industria minera que utiliza en medida creciente las técnicas de biohidrometalurgia. De todas estos tipos de empresas, las más asequibles como socios me parecen las tres últimas. La industria biotecnológica tradicional está progresivamente transnacionalizada y los usuarios de insumos biotecnológicos son renuentes a incursionar en el campo. En cambio la empresa biotecnológica de avanzada por su propia esencia está vinculada a la oferta de conocimientos, dado que su subsistencia está fuertemente ligada a I&D. La aplicación de bioprocesos al tratamiento de efluentes industriales, principalmente RIL, es un área de enorme importancia coyuntural, donde las empresas están fuertemente motivada a invertir en la gestión y manejo de sus residuos. La industria minera es un ejemplo destacable donde la biotecnología ha transferido sus resultados desde el sector oferta al sector productivo. Las particulares características de nuestro país, como principal productor de cobre y el apoyo tanto nacional como internacional al campo de la biohidrometalurgia son en gran medida responsables de ese éxito. ✱

PATRICIO ARCE-JOHNSON
Profesor Auxiliar
Departamento de Genética Molecular y Microbiología
Pontificia Universidad Católica de Chile

1. Desarrollo y aplicación de tecnologías bioquímicas y biológicas que permiten mejorar o desarrollar procesos o productos, en que participan organismos o células, en beneficio de la humanidad y de su entorno.

2. Mi línea central de investigación es el estudio de virus patógenos de plantas, poniendo especial énfasis en los mecanismos moleculares de establecimiento de la infección y desarrollo de síntomas. Para ello, se utiliza como modelo de estudio *Arabidopsis thaliana* y el virus del mosaico del tabaco, que infecta esta planta. Técnicas de biología molecular, transformación de plantas e inoculación controlada del virus en su hospedero, permiten la caracterización de la infección del virus en la planta. Las principales fuentes de financiamiento han sido proyectos FONDECYT convencional y FONDECYT de líneas complementarias, Fundación Andes, y Proyectos FONTEC-CORFO.

3. En el corto plazo no veo un importante desarrollo biotecnológico a nivel Universitario. Distingo dos falencias importantes en este sentido. La primera se relaciona con una carencia de investigadores calificados que puedan desarrollar Biotecnología relevante para nuestro país a buen nivel. La segunda se refiere a un gran desconocimiento y quizás desinterés por parte de la comunidad científica, sobre los problemas que pudiesen ser resueltos con el quehacer de algún investigador en particular. Creo que ambas deficiencias se han ido paulatinamente corrigiendo, y supongo que en los próximos diez años la incidencia de las Universidades en este ámbito será considerablemente mayor.

4. Considero que el gobierno está apoyando el ámbito biotecnológico a través de proyectos CORFO y también CONICYT vinculados a la Biotecnología, aunque menos de lo que nuestro país requiere si realmente queremos salir del subdesarrollo. Sin embargo, este apoyo ha sido desordenado y carente de una orientación definida. En el año 1996 bajo el patrocinio del Ministerio de Agricultura y con el auspicio de FAO, se editó un documento de 124 páginas titulado: "Propuesta del Programa Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal de Chile". En dicho documento, diversos investigadores nacionales en conjunto con consultores internacionales, participaron en su elaboración. En él se definieron las áreas y políticas relevantes a seguir en esta materia, considerando desde luego la formación de investigadores a nivel de Doctorado, la definición de criterios para la selección y evaluación de proyectos en el área, y la recomendación de cuatro áreas prioritarias en las que se debía sustentar dicho programa, estas fueron: Transferencia de genes, Biología Celular, Análisis del genoma, e Informática. A la fecha, este Programa Nacional de Biotecnología no ha sido aplicado, lo que se ha traducido en un apoyo desordenado, carente de metas nacionales claras, objetivos definidos, y especialmente descuidando la formación de científicos jóvenes que nuestro país necesita, para enfrentar la demanda actual y los requerimientos que se avecinan.

5. Nuestro grupo ha interactuado con empresas privadas del ámbito agrícola y también forestal. La experiencia de tal vinculación ha sido formativa. El mundo empresarial tiene otro lenguaje, otras prioridades, otros tiempos, en general hay una distancia no fácil de vencer entre los científicos y los empresarios, pero se aprende.

Yo considero que definitivamente la empresa, es un socio adecuado para el desarrollo de proyectos biotecnológicos. Las empresas que gran parte de su producción se exporta y por tanto compiten con empresas internacionales, o aquellas que están en proceso de crecimiento, se han dado cuenta que la optimización de sus productos o procesos es fundamental para competir. En este punto la Biotecnología pasa a ser un eslabón vital, que si es bien administrada se recuperará con creces la inversión.



Comentario adicional:

Considero que es impensable fomentar el desarrollo biotecnológico, sin simultáneamente estimular la ciencia básica. El desarrollo biotecnológico, para que sea sustentable, novedoso y competitivo, debe estar estrechamente vinculado con el desarrollo científico. En ello, nuevamente los centros de excelencia tienen una función fundamental que cumplir, tanto en la formación de científicos de alto nivel que lideren la innovación tecnológica, como en la generación de conocimiento que a futuro pueda ser utilizado en dicha innovación.✻

RAFAEL VICUÑA E.
Profesor Titular
Departamento de Genética Molecular y Microbiología
Pontificia Universidad Católica de Chile



1. La Biotecnología consiste en el uso de organismos o de algunos de sus componentes con el fin de producir bienes y servicios. Es decir, en mi opinión se trata de un concepto que pertenece al terreno de los negocios más bien que al de la ciencia.

2. Desde hace unos doce años, nuestro grupo ha estado haciendo investigación en el tema de la biodegradación de la lignina. Para ello ha escogido como modelo de estudio al hongo basidiomicete *Ceriporiopsis subvermispora*. Los objetivos de nuestro trabajo han sido identificar y caracterizar las enzimas ligninolíticas del hongo, estudiar sus mecanismos de regulación y conocer la estructura y expresión génica del sistema ligninolítico. Entre los principales resultados obtenidos se pueden mencionar la identificación de numerosas isoenzimas de Manganese Peroxidasa (MnP) y lacasa, su purificación y caracterización y la resolución del mecanismo de producción de H₂O₂ extracelular. En el plano genético, hemos preparado genotecas cDNA y genómicas, secuenciando dos cDNAs de MnP, dos genes de MnP y uno de lacasa y hemos estudiado su expresión por Northern y RT-PCR. Estas investigaciones han sido

financiadas por FONDECYT, ICGEB de Trieste, PNUD y National Science Foundation de USA.

Si bien todos los estudios antes indicados son básicos, hemos tenido además algunas líneas de investigación biotecnológicas, todas las cuales se realizan o han realizado principalmente en los laboratorios de las empresas. Una de ellas es el biopulpaje, tema que ha preocupado a Celulosa Arauco y Constitución desde 1986. Habiendo la empresa pertenecido hasta hace unos años a un consorcio internacional de biopulpaje, actualmente abordamos el problema a través de una colaboración en un proyecto FONDEF que coordina el Dr. Javier González. También hemos desarrollado el bioplanqueamiento de pulpa de celulosa con enzimas, proyecto que también contó con apoyo del FONDEF y planta Arauco, y que se encuentra actualmente en aplicación a escala industrial. El tratamiento de efluentes ha sido una línea en la que hemos colaborado con el Dr. Bernardo González con el apoyo de diversas empresas. Por último, debe mencionarse el tratamiento de sólidos de la industria de la celulosa por biorremediación y fitorremediación, proyecto FONDEF que coordina el Dr. Miguel Jordán y que cuenta con el respaldo de planta Arauco y Bioforest.

3. En consideración a la definición de Biotecnología que he entregado anteriormente, me temo que no existe fluidez en la relación del mundo académico con el de la empresa. Es posible que se siga haciendo investigación de orientación biotecnológica muy meritoria, pero mientras ese esfuerzo no sea aprovechado en la obtención de productos que van a ser lanzados al mercado, no podemos decir que se está haciendo Biotecnología. Creo que la interrogante que hay que resolver es en que medida está dispuesta la comunidad de investigadores a involucrarse en Biotecnología de verdad. Si la respuesta es positiva, el futuro será auspicioso.

4. El Estado ayuda lo necesario a través del FONDEF y FONTEC. No le pido mucho más, salvo catalizar el encuentro entre investigadores e industriales. Estimo que más que el dinero, el factor limitante en estos momentos es la decisión de los investigadores a hacer Biotecnología. Si tenemos buenas ideas, la industria las recogerá y financiará.

5. Ya contestado en las preguntas anteriores.✱



FRANCISCO CANALES (1933-1998)

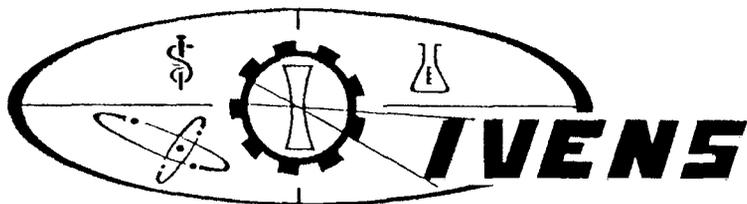


La noche del sábado 1° de agosto falleció Don Francisco Canales, por más de dos décadas colaborador de la Sociedad de Biología. Su deceso produjo una sensación de profundo pesar entre los socios y biólogos en general quienes compartieron con Don Pancho no sólo las labores propias de la Sociedad sino muchas otras instancias del andar de la Biología en Chile.

Instituciones como la Sociedad de Biología, la más importante sociedad científica nacional, convocan en su quehacer a una gama muy variada de personas, cada cual jugando un papel importante y a menudo silencioso. Por cierto los socios -y su actividad creadora- constituyen la esencia que le da el sentido y curso a la Sociedad, pero, su organización y administración -sin las cuales es muy posible que estas organizaciones no pudieran existir- es responsabilidad de otras personas, con otros talentos, otras urgencias, otras singularidades.

Por la naturaleza de su trabajo Don Pancho estaba en contacto muy directo con la membrecía. Cada visita suya servía de excusa para un ¿cómo anda? que era el prelude de una charla amistosa con una persona cálida con un don de gentes que parece viene con los años y con una voluntad a toda prueba para, llevando y trayendo, recorrer de arriba abajo esta inhóspita ciudad.

Por cierto que vamos a echar mucho de menos su franqueza, su alegría de vivir, su risa de ojos pequeños, sus acertados juicios sobre la vida, el trabajo y el fútbol, desde su perspectiva insobornablemente azul. Pensábamos que don Pancho era eterno y nos equivocamos, su ausencia se notará mucho más allá que en la tarea de entregar documentos, revistas u otros. Lo notaremos en la carencia de esa tibia interacción que caracterizaba a un caballero que ya no nos acompañará en las tareas de la Sociedad.



UNA EMPRESA CON 20 AÑOS
AL SERVICIO DE LA COMUNIDAD CIENTIFICA



Forma Scientific, Inc.

- Espectrofotómetros UV-Visible
- Espectrofotómetros FTIR
- HPLC / HPLC Masa
- GC / GC Masa
- Espectrómetros de Absorción Atómica.
- Analizadores de Carbono Orgánico Total (TOC)

Nikon.

Nikon Inc., Instrument Group

- Ultracentrífugas
- Centrifugas de Sobremesa
- Centrifugas Refrigeradas
- Centrifugas de Alta Velocidad

SUPELCO

- Hornos Microondas para Digestión
- Hornos Microondas para Det. de Humedad
- Insumos para Microondas

- Equipos para Banco de Sangre
- Freezers Ultrafríos
- Incubadores de Laboratorio
- Campanas de Flujo Laminar
- Gabinetes de Bioseguridad

SHIMADZU

- Microscopios uso Biológico e Industrial
- Microscopios para IVF e ICSI
- Microscopios para Electrofisiología
- Sistemas para Microfotografía
- Sist de Fluorescencia y Nomarski DIC
- Microscopios Estereoscópicos

SORVALL[®]
CENTRIFUGES

- Insumos de Cromatografía
- Cromatografía de Gases
- Cromatografía de Líquidos
- Estándares

CEM

Innovators in
Microwave Technology

IVENS S.A. – AVDA. LOS LEONES N° 1071 Y 1088 FONO: 2336014 2310741 – 2310736
FAX: 2310734 y 3341045 – CASILLA 3956 – SANTIAGO – CHILE
<http://www.netup.cl/ivens> E-Mail: ivens@netup.cl

**XXI REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR DE CHILE
XI REUNION ANUAL
SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR DE CHILE**

22 al 25 de Septiembre
Valdivia - Chile

HORA	MARTES 22	MIÉRCOLES 23	JUEVES 24	VIERNES 25
09:00- 09:30		SYMPOSIUM	SYMPOSIUM	
09:30- 10:00		ON OXIDATIVE	SIGNAL	COM. LIBRES
10:00- 10:30		STRESS	TRANSDUCTION	XV Sala A Y XVI Sala B
10:30- 11:00		Sala A	Sala A	CAFÉ
11:00- 11:30	INSCRIPCIONES	CAFÉ	CAFÉ	CONFERENCIA
11:30- 12:00		COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	ICRO
12:00- 12:30		LIBRES	LIBRES	Sala A
12:30- 13:00		III Sala A Y IV Sala B	IX Sala A Y X Sala B	
13:00- 13:30				
13:30- 14:00	ALMUERZO	ALMUERZO	ALMUERZO	
14:00- 14:30				
14:30- 15:00				
15:00- 15:30		COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	
15:30- 16:00	INCORPORACIONES	LIBRES	LIBRES	
16:00- 16:30	Sala A	V Sala A Y VI Sala B	XI Sala A Y XII Sala B	
16:30- 17:00				
17:00- 17:30	CAFÉ	CAFÉ	CAFÉ	
17:30- 18:00	COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	
18:00- 18:30	LIBRES	LIBRES	LIBRES	
18:30- 19:00	I Sala A Y II Sala B	VII Sala A Y VIII Sala B	XIII Sala A Y XIV Sala B	
19:00- 19:30	CONFERENCIA	MEDALLA	PREMIO MEJORES	
19:30- 20:00	PAPMB Sala A	H. NIEMEYER Sala A	TESIS Sala A	
20:00- 20:30				
20:30- 21:00	CENA	CENA	CENA	
21:00- 21:30				
21:30- 22:00	CONFERENCIA	CONFERENCIA	FIESTA	
22:00- 22:30	O. CORI Sala A	L. IZQUIERDO Sala A		

PROGRAMA REUNION ANUAL CONJUNTA SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR Y SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

MARTES 22 DE SEPTIEMBRE

13:00 Almuerzo

15:00 INCORPORACIONES (Sala A)

Presidente: Juan Fernández
Secretario: Luis Burzio

15:00 1. CARACTERIZACION DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE ACROSINA DE CERDO QUE PARTICIPAN EN LA UNION NO-ENZIMATICA A LAS GLICOPROTEINAS DE LA ZONA PELUCIDA HOMOLOGA. **Crosby J.A.**, Carvallo P., Barros C. Laboratorio de Embriología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile e ICBM, Fac. de Medicina, U. de Chile.

15:30 2. LAMININA INDUCE LA DESAGREGACION DE AMILOIDE. **Morgan C.**, Keymer J.E., Garrido J., Inestrosa N.C. Unidad de Neurobiología Molecular, Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

16:00 3. ANOMALIAS EN LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN *c-rel* EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. **Metz C.**, Burgos P., Graumann R., Araya A., Bull P., Massardo L., Jacobelli S., González A. Dpto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. de Medicina y Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

16:30 4. CINETICA DEL COMPLEJO Mn^{3+} -OXALATO EN REACCIONES CATALIZADAS POR LA MANGANESO PEROXIDASA DE *Ceriporiopsis subvermispora*. **Urzúa U.** Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

17:00 Café

17:30 COMUNICACIONES LIBRES I (Sala A)

Presidente: Ariel Orellana
Secretario: Oscar León

17:30 5. LAS CELULAS DE KUPFFER ACTIVADAS PRODUCEN UN MEDIADOR QUIMICO QUE AUMENTA EL METABOLISMO DE ETANOL POR LOS HEPATOCITOS. **Moncada C.**, Israel Y. Centro de Farmacoterapia Génica, Dpto. Química Fisiológica y Toxicológica, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile y Dpt. Anatomy, Pathol. and Cell Biol., Jefferson Med. College, Thomas Jefferson University.

17:45 6. EFECTO DE DROGAS SOBRE EL CONTENIDO DE TIPOLES REDUCIDOS EN DIFERENTES CEPAS DEL *Trypanosoma cruzi*. **Morello A.**, Repetto Y., Téllez R., Gaule C., Maya J.D. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile.

18:00 7. LA PLACA DEL SUELO SECRETA UN COMPUESTO (S) HOMOLOGO A RF-GlyI SECRETADO POR EL ORGANISMO SUBCOMISURAL. **Muñoz R.I.**, Richter H., Yulis R. Instituto de Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile.

18:15 8. ESPECIFICIDAD DE LA REMOCION DE tRNA POR EL DOMINIO RNasa H DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HIV-1. **León O.**, Smith C., Guaitiao J.P., Roth M. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile y Dpt. Biochemistry, UMDNJ/RWJ Medical School, Piscataway, USA.

18:30 9. CARACTERIZACION DEL GEN *mat-r* Y DE LA EDICION DE SUS TRANSCRITOS EN MITOCONDRIAS DE *Solanum tuberosum*. **Mercado A.**, Jordana X. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

18:45 10. ASOCIACION DE LAS PROTEINAS $pp125^{FAK}$, PAXILINA Y ERK2 DURANTE LA ACTIVACION DE CELULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE MOLECULAS DE ADHESION. **Reyes L.I.**, Roseblatt M. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile y Fundación Ciencia para la Vida.

HORA	MARTES 22	MIÉRCOLES 23	JUEVES 24	VIERNES 25
09:00- 09:30		SYMPOSIUM	SYMPOSIUM	
09:30- 10:00		ON OXIDATIVE	SIGNAL	COM. LIBRES
10:00- 10:30		STRESS	TRANSDUCTION	XV Sala A Y XVI Sala B
10:30- 11:00		Sala A	Sala A	CAFÉ
11:00- 11:30	INSCRIPCIONES	CAFÉ	CAFÉ	CONFERENCIA
11:30- 12:00		COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	ICRO
12:00- 12:30		LIBRES	LIBRES	Sala A
12:30- 13:00		III Sala A Y IV Sala B	IX Sala A Y X Sala B	
13:00- 13:30				
13:30- 14:00	ALMUERZO	ALMUERZO	ALMUERZO	
14:00- 14:30				
14:30- 15:00				
15:00- 15:30		COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	
15:30- 16:00	INCORPORACIONES	LIBRES	LIBRES	
16:00- 16:30	Sala A	V Sala A Y VI Sala B	XI Sala A Y XII Sala B	
16:30- 17:00				
17:00- 17:30	CAFÉ	CAFÉ	CAFÉ	
17:30- 18:00	COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	COMUNICACIONES	
18:00- 18:30	LIBRES	LIBRES	LIBRES	
18:30- 19:00	I Sala A Y II Sala B	VII Sala A Y VIII Sala B	XIII Sala A Y XIV Sala B	
19:00- 19:30	CONFERENCIA	MEDALLA	PREMIO MEJORES	
19:30- 20:00	PAPMB Sala A	H. NIEMEYER Sala A	TESIS Sala A	
20:00- 20:30				
20:30- 21:00	CENA	CENA	CENA	
21:00- 21:30				
21:30- 22:00	CONFERENCIA	CONFERENCIA	FIESTA	
22:00- 22:30	O. CORI Sala A	L. IZQUIERDO Sala A		

PROGRAMA REUNION ANUAL CONJUNTA SOCIEDAD DE BIOLOGIA CELULAR Y SOCIEDAD DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

MARTES 22 DE SEPTIEMBRE

13:00 Almuerzo

15:00 INCORPORACIONES (Sala A)

Presidente: Juan Fernández
Secretario: Luis Burzio

15:00 1. CARACTERIZACION DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE ACROSINA DE CERDO QUE PARTICIPAN EN LA UNION NO-ENZIMATICA A LAS GLICOPROTEINAS DE LA ZONA PELUCIDA HOMOLOGA. **Crosby J.A.**, Carvallo P., Barros C. Laboratorio de Embriología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile e ICBM, Fac. de Medicina, U. de Chile.

15:30 2. LAMININA INDUCE LA DESAGREGACION DE AMILOIDE. **Morgan C.**, Keymer J.E., Garrido J., Inestrosa N.C. Unidad de Neurobiología Molecular, Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

16:00 3. ANOMALIAS EN LA EXPRESION DEL PROTO-ONCOGEN *c-rel* EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. **Metz C.**, Burgos P., Graumann R., Araya A., Bull P., Massardo L., Jacobelli S., González A. Dpto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. de Medicina y Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

16:30 4. CINETICA DEL COMPLEJO Mn^{3+} -OXALATO EN REACCIONES CATALIZADAS POR LA MANGANESO PEROXIDASA DE *Ceriporiopsis subvermispora*. **Urzúa U.** Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

17:00 Café

17:30 COMUNICACIONES LIBRES I (Sala A)

Presidente: Ariel Orellana
Secretario: Oscar León

17:30 5. LAS CELULAS DE KUPFFER ACTIVADAS PRODUCEN UN MEDIADOR QUIMICO QUE AUMENTA EL METABOLISMO DE ETANOL POR LOS HEPATOCITOS. **Moncada C.**, Israel Y. Centro de Farmacoterapia Génica, Dpto. Química Fisiológica y Toxicológica, Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile y Dpt. Anatomy, Pathol. and Cell Biol., Jefferson Med. College, Thomas Jefferson University.

17:45 6. EFECTO DE DROGAS SOBRE EL CONTENIDO DE TIOLES REDUCIDOS EN DIFERENTES CEPAS DEL *Trypanosoma cruzi*. **Morello A.**, Repetto Y., Téllez R., Gaule C., Maya J.D. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile.

18:00 7. LA PLACA DEL SUELO SECRETA UN COMPUESTO (S) HOMOLOGO A RF-GlyI SECRETADO POR EL ORGANISMO SUBCOMISURAL. **Muñoz R.I.**, Richter H., Yulis R. Instituto de Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile.

18:15 8. ESPECIFICIDAD DE LA REMOCION DE tRNA POR EL DOMINIO RNasa H DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HIV-1. **León O.**, Smith C., Guaitiao J.P., Roth M. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile y Dpt. Biochemistry, UMDNJ/RWJ Medical School, Piscataway, USA.

18:30 9. CARACTERIZACION DEL GEN *mat-r* Y DE LA EDICION DE SUS TRANSCRITOS EN MITOCONDRIAS DE *Solanum tuberosum*. **Mercado A.**, Jordana X. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

18:45 10. ASOCIACION DE LAS PROTEINAS pp125^{FAK}, PAXILINA Y ERK2 DURANTE LA ACTIVACION DE CELULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE MOLECULAS DE ADHESION. **Reyes L.I.**, Roseblatt M. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile y Fundación Ciencia para la Vida.

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES II (Sala B)**

Presidente: Federico Leighton
Secretario: Juan Pablo Rodríguez

17:30 **11. AUTOANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA UN EPITOPO RIBOSOMAL RECONOCEN UNA PROTEINA QUE RECICLA EN LA SUPERFICIE DE CELULAS N2A. Burgos P.,** Massardo L. Dpto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. de Medicina y Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

17:45 **12. METALOPROTEINASAS (MMPs) EN GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y CON EXOCRINOPATIA AUTOINMUNE Y SU RELACION CON DESTRUCCION ACINAR. Goicovich E.,** Aguilera S., Alliende C., Leyton C., Fernández J., **González M.J.** Programa de Biología Celular y Molecular, ICMB, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

18:00 **13. UNA DIETA RICA EN VEGETALES Y EL CONSUMO DE VINO TINTO ELEVAN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA. Pérez D.D.,** Guasch V., San Martín A., Leighton F. Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Fac. de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

18:15 **14. RECEPTORES DE CITOQUINAS HEMATOPOIETICAS (GM-CSF) EN CELULAS DE LA LINEA GERMINAL MASCULINA. Noli C.,** Zambrano A., Concha I.I. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

18:30 **15. LOS URUSHIOLES, UNA FAMILIA DE SENSIBILIZADORES DE CONTACTO, INHIBEN LA RESPIRACION EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HIGADO DE RATA. De Ioannes A.E.,** Díaz M., Quezada S., Kalergis A., Garbarino J., Koenig C., Ferreira J.F. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile; Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Fac. de Medicina, Universidad de Chile y Dpto. de Química, Universidad Federico Santa María.

18:45 **16. LIGANDO ENDOGENO DE PROTEOGLICANES DE HEPARAN SULFATO (p33/30) ES UN BUEN SUSTRATO DE ADHESION PARA CELULAS MUSCULARES ESQUELETICAS. Henríquez J.P.** Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

19:00 **CONFERENCIA PABMB (Sala A)**

CONTROL DEL "SPLICING" ALTERNATIVO DEL mRNA POR LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL. **Kornblihtt A.** Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Dpto. de Ciencias Biológicas, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

20:00 **Comida**

21:30 **CONFERENCIA Osvaldo Cori M. (Sala A)**

THE BIOSYNTHESIS OF METHIONINE AND ITS REGULATION IN *Escherichia coli*: BIOCHEMICAL, GENETIC AND STRUCTURAL ASPECTS. **Cohen G.** United Expression des Genes Eucaryotes, Institut Pasteur, Paris, France.

MIERCOLES 23 DE SEPTIEMBRE

09:00 SYMPOSIUM ON OXIDATIVE STRESS (Sala A)

Chairman: Federico Leighton

09:00 INTRODUCTORY REMARKS. **Leighton F.** Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos. Dpto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile.

09:05 MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN. **Lin Q.** Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, 320 Yue Yang Road, Shanghai 200031, China.

09:35 MECANISMOS DE ACCION DE ANTIOXIDANTES. **LISSI E.** Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

10:05 OXIDATIVE STRESS AND INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION. **Nakashima I.** Department of Immunology, Nagoya University, School of Medicine, Japan.

10:35 PARTICIPACION DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN LA ACTIVACION DE GENES ASOCIADOS A LA BIOGENESIS MITOCONDRIAL. **Guerrero J.,** Soto U., Miranda S., Foncea R., Leighton F. Lab. de Citología Bioquímica y Lípidos, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

10:55 CLOSING REMARKS

11:00 **Café**

11:30 COMUNICACIONES LIBRES III (Sala A)

Presidente: Nivaldo Inestrosa
Secretario: Rodolfo Amthauer

11:30 17. PROBABLE PARTICIPACION DE LA FIBRA DE REISSNER EN LA DEPURACION DE NEUROPEPTIDOS DESDE EL LCR. **Hein S.,** Caprile T. Instituto de Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile.

11:45 18. PEROXIDASA Y APO A-I INTERACCIONAN POR DISTINTOS MECANISMOS CON LA MEMBRANA DE RIBETE EN CEPILLO DEL INTESTINO DE *C. carpio*. **Villanueva J.,** Amthauer R. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

12:00 19. COMPLEMENTACION DE MOVIMIENTO DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO MUTANTE EN LA PROTEINA DE 30 kDa EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO. **Arce-Johnson P.,** Díaz F., Medina C., Huanca W., Delgado J. Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

12:15 20. TGF- β 1 MODULA LA PRODUCCION DE UROQUINASA A TRAVES DE LA RUTA MAP QUINASA. **Santibañez J.F.,** Quintanilla M., Lab. de Biología Celular e Inmunología INTA, Universidad de Chile e Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, España.

12:30 21. PRESENCIA DEL RECEPTOR DE MANOSA EN CELULAS DE MICROGLIA DE CEREBRO DE RATA. **Marzolo M.P.,** Reyes A., von Bernhardt, Inestrosa N.C. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

12:45 22. EVIDENCIA DE UN TRANSPORTADOR DE FRUCTOSA EN *Deschampsia antarctica* DESV. BAJO CONDICIONES DE ACLIMATACION AL FRIO. **Triviño C.,** Leñam I., Fernández M., Alberdi M. Institutos de Bioquímica y Botánica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

11:30 COMUNICACIONES LIBRES IV (Sala B)

Presidente: Tulio Nuñez
Secretario: Miguel Bronfman

11:30 23. ESTRES OXIDATIVO Y BIOGENESIS MITOCONDRIAL EN CELULAS HeLa CON ELIMINACION SELECTIVA DEL DNA MITOCONDRIAL. **Miranda S.,** Foncea R. Lab. de Citología Bioquímica y Lípidos, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

11:45 24. FIBRAS AMILOIDES INDUCEN LA ACTIVACION DE LA QUINASA cdk-5 EN CELULAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO. **Toro R.,** Alvarez A. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

- 12:00 **25. EVALUACION DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTE E HIPOGLICEMIANTE DE EXTRACTOS FLAVONICOS DE *BAUHINIA CANDICANS* EN RATAS DIABETICAS.** **Tapia G.**, Astuya A., Erazo S., Peña W., González I. Dpto. Química y Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad de Valparaíso y Fac. Ciencias Básicas y Matemáticas, Instituto Química, Universidad Católica de Valparaíso.
- 12:15 **26. EFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE LA OXIDACION DE PROTEINAS (OP) HEPATICAS EN RELACION A LA LIPOPEROXIDACION (LP) EN RATAS.** **Cornejo P.**, Tapia G., Fernández V., Videla L.A. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 12:30 **27. FACTORES QUE MODULAN LA OXIDACION MICROSOMAL Y PEROXISOMAL DE ACIDOS GRASOS EN HIGADO DE RATA.** **Orellana B.M.**, Rodrigo R., Thielemann L., Valdés E., ICBM, Programa de Farmacología, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 12:45 **28. PRODUCCION DEL COMPLEJO XILANOLITICO DE ASPERGILLUS CERVINUS A DISTINTAS TEMPERATURAS.** **Curotto E.**, Aguirre C., Carrasco L. Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso.

13:00 **Almuerzo**

15:00 **COMUNICACIONES LIBRES V (Sala A)**

Presidente: Ilona Concha
Secretario: Enrique Brandan

- 15:00 **29. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESION DE PROTEOGLICANES DE MUSCULO ESQUELETICO EN EL RATON *MDX*.** **Cáceres S.**, Brandan E. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:15 **30. REGULACION DE LA RUTA ENDOCITICA DEL EGF-R EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA N2A.** **Salazar G.** Dpto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:30 **31. AXONES DE RATONES *WLD^S*, QUE NO REGENERAN, LO HACEN CUANDO SE BLOQUEA LA TRANSCRIPCION EN EL CABO DISTAL.** **Benavides E.**, Alvarez J. Fac. de Ciencias Biológicas y Fac. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.
- 15:45 **32. ANALISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA Y DE LA REGION DE UNION A MICROTUBULOS DE LA PROTEINA DMAP-85 DE *D. melanogaster*.** **Cambiazo V.**, Sunkel C., Maccioni R.B. Laboratorio de Biología Celular INTA, Universidad de Chile. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile e Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad de Porto.
- 16:00 **33. DECORINA: PROTEOGLICAN DE MATRIZ EXTRACELULAR, MODULARIA LA DIFERENCIACION DE MUSCULO ESQUELETICO.** **Riquelme C.** Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 16:15 **34. PRESENCIA DEL RNA MENSAJERO Y PEPTIDO b2-MICROGLOBULINA EN ESPERMATOZOIDES Y TESTICULOS DE RATA Y RATON.** **Lisperguer A.**, Brito M., Burzio L.O. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- 16:30 **35. IDENTIFICACION DE UNIONES EN HENDIDURA FUNCIONALES Y CONEXINA 43 EN EL ORGANO SUBCOMISURAL DE BOVINO.** **González C.**, Garcés G., Sáez J.C., Rodríguez E.M. Instituto de Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile y Dpto. de Ciencias Fisiológicas, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

15:00 **COMUNICACIONES LIBRES VI (Sala B)**

Presidente: Rafael Vicuña
Secretaria: Ana Preller

- 15:00 **36. NIVELES DE Na,K-ATPasa Y EFECTO DE LA ACTIVACION DE PROTEINA KINASA C (PKC) EN MUSCULO ESQUELETICO DE RATAS CONTROLES Y UREMICAS: ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y FOSFORILACION.** **Gómez C.**, Michea L., Bofill P., Alvo M. Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 15:15 **37. EL AGENTE ANTIFECUNDANTE GOSSYPOL ES UN INHIBIDOR POTENTE Y ESPECIFICO DE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS.** **Rauch M.C.** Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.
- 15:30 **38. EVENTOS DE FOSFORILACION DE PROTEINAS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL DE GENES MEDIADA POR ACIDO SALICILICO EN TABACO.** **Hidalgo P.**, Garretón V., Berríos C.G., Holuigue L. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

- 15:45 **39. ACTIVACION *IN VIVO* POR GLUCOSA-6-P DE LA GLICOGENO SINTASA DE OOCITOS DE RANA: UN EFECTO ALOSTERICO SOBRE LA FORMA D DE LA ENZIMA.** **Báez M.**, Preller A., Ureta T. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.
- 16:00 **40. EL FLAVONOIDE GENISTEINA ES UN INHIBIDOR NATURAL DEL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS AROMATICOS.** **Reyes A.M.**, Sandoval M., Vera J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile y Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA.
- 16:15 **41. IDENTIFICACION DE AMINOACIDOS QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCION ENTRE LA TIROSIL-tRNA SINTETASA Y EL tRNA^{TYR}.** **Salazar J.**, Zúñiga R., Tapia J., Lefimil C., Orellana O. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 16:30 **42. EXPRESION DE UNA NUEVA SUBUNIDAD (b3) DE LA Na,K-ATPasa Y SU REGULACION POR HORMONAS DE LA CORTEZA ADRENAL.** **Valenzuela V.**, Michea L. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Fac. de Medicina, Universidad de los Andes.

17:00 **Café**

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES VII (Sala A)**

Presidente: Mario Rosemblatt
Secretaria: Gloria León

- 17:30 **43. DIFERENCIAS FUNCIONALES PRESENTAN LAS CELULAS PROGENITORAS MESENQUIMATICAS (MSC) OBTENIDAS DE DADORES NORMALES Y OSTEOPOROTICAS.** **Rodríguez J.P.**, Garat S., Gajardo H., Seitz G., Unidad de Biología Celular y Laboratorio de Densitometría, INTA, Universidad de Chile, Hospital Sótero del Río.
- 17:45 **44. ACTIVIDADES METALOPROTEINASICAS MMP-2 Y MMP-9 EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.** **Valenzuela M.A.**, Cartier L., Collados L., González F., Torres C., Gómez L., Araya F., Concha C., Flores L., Gajardo A., Hidalgo A. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Dpto. de Ciencias Neurológicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 18:00 **45. ROL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR OSEA EN LA INVASION TUMORAL DE ORIGEN MAMARIO.** **Fuentes M.**, Martínez J. Laboratorio de Biología Celular e Inmunología, INTA, Universidad de Chile.
- 18:15 **46. EL DAÑO OXIDATIVO AL DNA, DETECTADO COMO 8-OH-DEOIGUANOSINA, DISMINUYE CON DIETA VEGETARIANA EN HUMANOS.** Espinoza M.A., Carvajal C., **Strobel P.** Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.
- 18:30 **47. CANCER V/S DIFERENCIACION: EXPRESION DE TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS.** **Haeger P.A.**, Droppelmann A. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.
- 18:45 **48. EXPRESION DE CAVEOLINA EN HIGADO: POSIBLE ROL EN LA SECRECION BILIAR DE COLESTEROL.** **Zanlungo S.**, Mendoza H., Amigo L., Loyola C., Arias P., Rigotti A. Dpto. de Gastroenterología, Fac. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES VIII (Sala B)**

Presidente: Javier Puente
Secretaria: Valeska Vollrath

- 17:30 **49. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA INACTIVACION DE p53 EN CANCER DE LA VESICULA BILIAR.** **Moreno M.**, Wistuba I., Gazdar A., Nervi F., Miquel J.F. Dpto. de Gastroenterología y Patología, Fac. de Medicina, P. Universidad Católica de Chile y UT-Southwestern Medical Center, Dallas, USA.
- 17:45 **50. PARTICIPACION DEL COMPLEJO ORGANO SUBCOMISURAL FIBRA DE REISSNER EN LA DEPURACION DE MONOAMINAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO.** **Rodríguez S.**, Navarrete E., Vio K. Instituto de Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile.
- 18:00 **51. CONSTRUCCION DE VECTORES PARA ANULAR EL GEN DE LA AMELOGENINA EN RATON.** **Mendoza C.**, Quevedo L., Soto C., Vásquez O., Yévenes I., Valdivia R., Katoh M. Laboratorio de Biología Molecular, Dpto. de Patología, Fac. de Odontología, Universidad de Chile.
- 18:15 **52. ANALISIS DE POLIMORFISMOS DEL DNA MITOCONDRIAL EN RESTOS ESQUELETARIOS Y UNA POBLACION VIVA DEL NORTE DE CHILE.** **Moraga M.**, Rothhammer F., Carvallo P. Programa de Genética Humana, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.
- 18:30 **53. EXPRESION DEL mRNA DE CITA EN DOS LINEAS CELULARES DEFICIENTES PARA LA INDUCCION DE ANTIGENOS MHC-II.** **Naves R.**, Lennon A.M., Fellous M., Alcaide-Loridan C., Bono M.R., Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Unite d'Immunogénétique Humaine, INSERM U276, Institut Pasteur, Francia y Fundación Ciencia para la Vida.

18:45 **54. EXPRESION DE LOS TRANSCRITOS DE GDNF Y SU RECEPTOR GDNFR_a EN GANGLIOS BASALES DE CEREBRO DE RATA. Escobar-Vera J., Gysling K., Bustos G.** Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Fac. de Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile.

19:00 **PREMIO MEDALLA HERMANN NIEMEYER F. (Sala A)**

20:00 **Comida**

21:30 **CONFERENCIA Luis Izquierdo Fernández (Sala A)**
IMAGING THE MOLECULAR BASIS OF DEVELOPMENT: THE LEGACY OF PROFESSOR LUIS IZQUIERDO. **Schatten G.** Professor of OB/GYN and Cell and Developmental Biology Endowed Chair and Associate Director of Research Center for Women's Health and Senior Scientist, Oregon Regional Primate Research Center, Oregon Health Science University, Oregon, USA.

JUEVES 24 DE SEPTIEMBRE

09:00 SYMPOSIUM SIGNAL TRANSDUCTION (Sala A)

Coordinador: Juan Olate

09:00 CALCIUM IN THE REGULATION OF THE EXPRESSION OF THE PLASMA MEMBRANE CALCIUM PUMP: ISOFORM-SPECIFIC EFFECTS. **Carafoli E.** Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland and Department of Biological Chemistry, University of Padova, Italy.

09:30 THE PIVOTAL ROLE OF PLANT DIVISION KINASES (PKs) IN HORMONAL CONTROL OF CELL CYCLE IN PLANTS. **D. Dudits**, Z. Magyar, T. Meszaros, D. Dedeoglu, G.V. Horvath, M. Bilgin, F. Ayaydin, E. Csordas Toth, I. Kovacs, A. Feher Institute of Plant Biology, BRC, Hungarian Academy of Sciences, POB. 521., H-6701 Szeged, Hungary.

10:00 REGULACION DE LA ADENILIL CICLASA POR LA PROTEINA Gas: UN ANALISIS MOLECULAR. **Olate J.**, Echeverría V., Guzmán L., Hinrichs M.V., Genevière A-M. y Torrejón M. Laboratorio de Genética Molecular, Dpto. de Biología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción y Laboratoire Arago, Observatoire Oceanologique de Banyuls, Banyuls Sur-Mer, France.

10:30 SISTEMA DE TRANSDUCCION DEL IGF-1 EN LA HIPERTROFIA Y APOPTOSIS CARDIACAS. **Lavandero S.**, Sapag-Hagar M., Foncea R., Pérez V., Gálvez A., Ebensperger R., Meléndez J., González-Jara F., Morales M.P. y Díaz-Araya G. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

11:00 **Café**

11:30 COMUNICACIONES LIBRES IX (Sala A)

Presidente: Jorge Martínez
Secretario: Eliseo O. Campos

11:30 **55. MECANISMOS CELULARES DE LA REGULACION DEL TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE HIERRO POR LAS CELULAS DEL EPITELIO INTESTINAL. Núñez M.T., Tapia V.** Dpto. de Biología. Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

11:45 **56. LA FERRITINA CUMPLE UN DOBLE PAPEL EN LA ABSORCION INTESTINAL DE HIERRO. Gárate M.A.** Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

12:00 **57. IDENTIFICACION DE UN NUEVO COMPUESTO SECRETADO POR EL ORGANO SUBCOMISURAL DE BOVINO. Montecinos H.**

12:15 **58. EXPRESION APICAL DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE Y SENSIBLE A CALCIO (Maxi K⁺) EN CELULAS MDCK TRANSFECTADAS. Bravo-Zehnder M., Latorre R., Toro L., González A.** Dpto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. de Medicina, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile; Fac. de Ciencias, Universidad de Chile; Centro de Estudios Científicos de Santiago; Departments of Anesthesiology, Physiology and Molecular and Medical Pharmacology and Brain Research Institute, University of California, USA.

12:30 **59. INTERCONVERSION CORTISOL:CORTISONA EN TEJIDO VASCULAR HUMANO: EFECTO DE CARBENOXOLONA EN LA ACTIVIDAD 11b-HSD Y DEL INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺. Alzamora R., Marusic E.** Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Fac. de Medicina, Universidad de los Andes.

12:45 **60. PARTICIPACION DE *Xslug* EN LA DIFERENCIACION MESODERMICA DE *XENOPUS*. Young R.M., Mayor R.** Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

11:30 COMUNICACIONES LIBRES X (Sala B)

Presidente: Juan Carlos Slebe
Secretaria: Loreto Holuigue

11:30 **61. IDENTIFICACION DE UN GEN DE *Renibacterium salmoninarum* QUE CODIFICA PARA NAD-SINTETASA. Romero A., Concha M.I., Figueroa J., León G.** Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

11:45 **62. INTRODUCCION DE UN RESIDUO TRIPTOFANO EN LA INTERFASE INTERDIMERICA (C1-C4) DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑON DE CERDO. Yañez A., Pinto R., Ludwig H.** Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

12:00 **63. CARACTERIZACION Y EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA MANGANESO PEROXIDASA (MnP) Y LACASA EN *Ceriporiopsis subvermispora*. Lobos S., Corsini G., Karahanian E., Larrondo L., Salas L., Tello M., Vicuña R.** Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile y Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

- 12:15 **64. MUTACION SITIO-ESPECIFICA DE LAS HISTIDINAS CONSERVADAS DE LA CARBOXIQUINASA FOSFOENOL-PIRUVICA DE *A. succiniciproducens*. Jabalquinto A.M., Laivenieks M., Zeikus J.G., Cardemil E. Dpto. de Ciencias Químicas, Universidad de Santiago y Michigan State University.**
- 12:30 **65. CAMBIOS INDUCIDOS POR MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA EN EL MECANISMO CINETICO DE LA INHIBICION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR AMP. Cárcamo J.G., Slebe J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.**
- 12:45 **66. CARACTERIZACION Y ESTRATEGIAS DE CLONAMIENTO DE GENES DE PROTEINAS DE APARATO DE GOLGI DE PLANTAS INVOLUCRADOS EN BIOSINTESIS DE POLISACARIDOS. Yuseff M.I., Norambuena L., Orellana A. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.**

13:00 **Almuerzo**

15:00 **COMUNICACIONES LIBRES XI (Sala A)**

Presidente: Jorge Garrido
Secretario: Roberto Mayor

- 15:00 **67. EXPRESION DE PROTEOGLICANES DURANTE LA FORMACION DE EXTREMIDADES *IN VIVO* E *IN VITRO* Y LA ACTIVACION DEL PROGRAMA MIOGENICO. Olguín H., Larraín J. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.**
- 15:15 **68. CAMBIOS EN EL COMPROMISO MIOGENICO EN RESPUESTA A MODIFICACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE DIFERENCIACION DE MIOBLASTOS C2C12. Osses N., Melo F. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.**
- 15:30 **69. CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LINEAS CELULARES DERIVADAS DE EPITELIO GASTRICO DE RATA. Cabello A., Garrido J. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.**
- 15:45 **70. EL PEPTIDO DERIVADO DEL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP) AUMENTA LOS NIVELES DE RNAm DE ACETILCOLINESTERASA (AChE) EN CELULAS NEURONALES. Luza S. Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.**
- 16:00 **71. REGULACION DE LA CAPTACION Y TRANSPORTE DE COBRE EN CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL. Arredondo M., Uauy R. Laboratorio de Microminerales, INTA, Universidad de Chile.**
- 16:15 **72. EFECTO DE LA EXPOSICION AGUDA O CRONICA A COBRE EN CELULAS HepG2: PARTICIPACION DE METALOTIONEINAS Y GSH EN EL ALMACENAMIENTO DE COBRE. González M., Tapia L. Laboratorio de Biología Molecular, INTA, Universidad de Chile.**
- 16:30 **73. CARACTERIZACION DE UN COMPLEJO REMODELADOR DE CROMATINA (BAF) ESPECIFICO DE CEREBROS DE RATON. Olave I., Crabtree G.R. Howard Hughes Medical Institute, Dept. of Developmental Biology, Stanford University, USA.**

15:00 **COMUNICACIONES LIBRES XII (Sala B)**

Presidente: María Inés Vera
Secretario: Alfonso González

- 15:00 **74. EXPRESION GENICA DEL ARQUEON EXTREMOFILO *Sulfolobus acidocaldarius* ANTE LA CARENCIA DE FOSFORO. Cardona S., Osorio G., Jerez C.A. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias y Programa de Microbiología, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.**
- 15:15 **75. ESTUDIO DE DIVERSIDAD GENETICA EN *Vitis vinifera* L. POR PCR, MEDIANTE EL USO DE SECUENCIAS PARTIDORAS AL AZAR Y MICROSATELITES "ANCHORED-PRIMER". Herrera R., Cares V. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca.**
- 15:30 **76. ANALISIS GENETICO DE VARIEDADES DE DURAZNEROS Y NECTARINES MEDIANTE AFLP. Manubens A., Jadue Y., Messina R., Lladser M., Seelenfreund D., Lobos S. Laboratorio de Biología Molecular, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y Dpto. de Semillas, Servicio Agrícola y Ganadero.**
- 15:45 **77. EXPRESION DE LOS GENES *tfdCDEF-1* DEL CATABOLISMO DE CLOROCATECOLES EN *Ralstonia eutropha*. González B., Guzmán L., Clément P., Varela C. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.**
- 16:00 **78. IDENTIFICACION DE GENES DE *Thiobacillus ferrooxidans* CODIFICANTES PARA PROTEINAS DE MEMBRANA CUYAS EXPRESIONES CAMBIAN CON LA FUENTE ENERGETICA. Guiliani N. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.**
- 16:15 **79. EXPRESION DIFERENCIAL DE β -ACTINA EN EL PEZ *C. carpio* ACLIMATIZADO ESTACIONALMENTE. Sarmiento J., Leal S., Krauskopf M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile y Universidad Nacional Andrés Bello.**

16:30 **80. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL GEN DE snoRNA U3 IMPLICADO EN LA REGULACION ESTACIONAL DE LA EXPRESION NUCLEOLAR DE LA CARPA. Quezada C.,** Muñoz E., Vera M.I. Universidad Austral de Chile y Universidad Nacional Andrés Bello.

17:00 **Café**

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES XIII (Sala A)**

Presidente: Antonio Morello

Secretaria: Pilar Carvallo

17:30 **81. EL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS HEPATITIS B HUMANO (HBsAg) INTERACCIONA CON UNA PROTEINA DEL APARATO DE GOLGI. Mardones G.** Dpto. de Biología Celular y Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

17:45 **82. CELULAS PROGENITORAS MESENQUIMATICAS HUMANAS COMO BLANCO DE TRANSFERENCIA GENICA MEDIADA POR VECTORES ADENOVIRALES. Conget P.,** Minguell J.J. Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

18:00 **83. EXPRESION DE CITOQUINAS Th1 (IFN-g) Y Th2 (IL-4) EN INDIVIDUOS CON FIEBRE REUMATICA. González M.,** Lobos C., Carrión F., Lasagna N., Carmona S., Figueroa F. Laboratorio de Inmunología, Fac. de Medicina, Universidad de los Andes.

18:15 **84. INMUNONEUTRALIZACION DEL COMPLEJO ORGANO SUBCOMISURAL-FIBRA DE REISSNER MEDIANTE LA TRANSFERENCIA MATERNA DE ANTICUERPOS A TRAVES DE LA PLACENTA Y DE LA GLANDULA MAMARIA. Vio K.,** Wagner C., Barría M., Rodríguez S. Instituto Histología y Patología, Fac. de Medicina, Universidad Austral de Chile.

18:30 **85. ESTERES DEL ACIDO GALICO COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL DE CELULAS TUMORALES. Pavani M.,** Cordano G., Guerrero A., Muñoz S., Medina J., Rivera E., Ferreira J. Programa Disciplinario de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Fac. de Medicina y Dpto. de Química Orgánica, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

18:45 **86. CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LA FORMACION DE LOS PROTOESCOLICES DE *Echinococcus granulosus* EN QUISTES FERTILES Y SU UTILIZACION EN EL RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS MARCADORES DE FERTILIDAD. Galindo M.,** Marchant C., Sánchez G., López F., Galanti N. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

17:30 **COMUNICACIONES LIBRES XIV (Sala B)**

Presidente: Jaime Eyzaguirre

Secretaria: María Antonieta Valenzuela

17:30 **87. EFECTO DE LIGANDOS SOBRE LA ESTABILIDAD DEL MONOMERO DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* EN DISTINTOS ESTADOS DE AGREGACION. Cabrera R.,** Guixé V., Rodríguez P.H., Babul J. Dpto. de Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

17:45 **88. ARABINOFURANOSIDASA, UNA ENZIMA DESRAMIFICANTE DEL XILANO. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA DE *Penicillium purpurogenum*. De Ioannes P.,** Peirano A., Steiner J., Eyzaguirre J. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, P. Universidad Católica de Chile y Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

18:00 **89. CRISTALIZACION Y MODELO A BAJA RESOLUCION DE R-FICOERITRINA DE *Gracilaria chilensis*. Martínez J.,** Contreras C., Fontecilla J., Bunster M. LCCP, IBS, Grenoble y Laboratorio de Biofísica Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

18:15 **90. ROLES DE *HIS-141* Y *ASP-128* EN LA ARGINASA DE HIGADO HUMANO: MODIFICACION QUIMICA Y MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA. Salas M.,** López V., Uribe E., Herrera P., Cerpa J., Fuentes M., Olate J., Carvajal N. Dpto. de Biología Molecular, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

18:30 **91. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACETIL XILANO ESTERASA I DE *Penicillium purpurogenum*. Caputo V.,** Peirano A., Eyzaguirre J. Dpto. de Genética Molecular y Microbiología, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

18:45 **92. TRANSFORMACIONES TEMPRANAS DEL GA₁₂ ALDEHIDO EN LA BIOSINTESIS DE ACIDO GIBERELICO EN *Gibberella fujikuroi*. Rojas M.C.,** Urrutia O., Cardona W. Dpto. de Química, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile.

19:00 **PREMIOS FUNDACION CHILENA PARA LA BIOLOGIA CELULAR (Sala A)**

Presentación Mejor Tesis de Pregrado

Presentación Mejor Tesis de Doctorado

20:00 **Comida**

21:30 **Fiesta**

VIERNES 25 DE SEPTIEMBRE

09:30 **COMUNICACIONES LIBRES XV (Sala A)**

Presidente: Jorge Babul
Secretario: Martín Montecino

~~SARMI~~

09:30 **93. CLONAMIENTO Y EXPRESION DE SOMATOLACTINA DE CARPA *Cyprinus carpio*.** **Figueroa J.,** López M. Instituto de Bioquímica, Fac. de Ciencias, Universidad Austral de Chile y Universidad Nacional Andrés Bello.

09:45 **94. IDENTIFICACION INAMBIGUA DELAS HISTONAS DE *Crithidia fasciculata* Y *Leishmania mexicana* POR SECUENCIACION AMINOACIDICA.** **Espinoza I.,** Hellman U. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile y Ludwig Institute for Cancer Research, Sweden.

10:00 **95. REMODELACION NUCLEOSOMAL *IN VITRO* INDUCIDA POR LA UNION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION AML1 A SU SECUENCIA ESPECIFICA EN EL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA.** **Gutiérrez J.,** Sierra J., Puchi M., Imschenetzky M., Montecino M. Dpto. de Biología Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

10:15 **96. CARACTERIZACION Y EXPRESION DE LA SUBUNIDAD b DE PROTEINA QUINASA CK2 EN EL PEZ *C. carpio* DURANTE SU ACLIMATIZACION.** **Kausel G.,** Barrera R., Krauskopf E. Universidad Austral de Chile y Universidad Nacional Andrés Bello.

Gudrum

09:30 **COMUNICACIONES LIBRES XVI (Sala B)**

Presidente: Mónica Imarai
Secretario: Bernardo González

09:30 **97. CROMATINA E HISTONAS EN *Giardia lamblia*.** **Triana O.,** Olea N., Toro G.C. Dpto. de Biología, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia y Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

09:45 **98. IDENTIFICACION INMUNOQUIMICA DE DOS COMPUESTOS SECRETADOS POR LA PARS TUBERALIS. ¿NUEVAS HORMONAS HIPOFISARIAS?** **Rodríguez E.M.,** Guerra M. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile.

10:00 **99. POLILISINA ACTIVA ENTRADA DE Ca^{2+} EN ESPERMATIDAS DE RATA.** **Reyes J.G.,** Cisternas C., Herrera E., Jorquera R., Benos D.J. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso; Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. de Medicina, Universidad de Chile y Dept. Physiology and Biophysics, University of Alabama at Birmingham, USA.

10:15 **100. CARACTERIZACION DE CELULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO HUMANO EN CULTIVO.** **Ossandón P.,** Utreras E., Varela L., Cárdenas H., Imarai C.M. Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Dpto. de Ciencias Biológicas, Fac. de Química y Biología, Universidad de Santiago.

10:30 **Café**

11:00 **CONFERENCIA ICRO (Sala A)**

THE MOLECULAR BASIS OF GENOMIC INESTABILITY IN CELLS WITH ALTERED CELL DIVISION CONTROL. **Buttin G.** Institut Pasteur, Paris, Francia.

11:30 **CONFERENCIA ICRO**

MOLECULAR MECHANISM OF ABC TRANSPORTERS, CAUSING MULTIDRUG RESISTANCE IN TUMOR CELLS. **Sarkadi B.** National Institute of Haematology, Blllo Transfusion and Immunology, Budapest, Hungría.

RESUMENES

CONFERENCIA PABMB

CONTROL DEL "SPLICING" ALTERNATIVO DEL mRNA POR LA MAQUINARIA TRANSCRIPCIONAL. KORNBLIHTT A.R. Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Dpto. de Ciencias Biológicas, Fac. de Ciencias Exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

El gen de la fibronectina (FN) se expresa mediante un complejo proceso de splicing alternativo en 3 regiones de su transcripto primario, dando lugar a 20 polipéptidos. Hasta hace poco se asumía que el splicing dependía exclusivamente de señales presentes en la molécula de RNA. Sin embargo, recientemente mostramos que cambios en la estructura del promotor afectan al splicing alternativo. Se partió de un minigen en el cual la región genómica que contiene al exón ED I (el cual codifica para una repetición de tipo III facultativa de la FN), sus intrones flanqueantes y exones vecinos fue ligada al tercer exón del gen de la globina alfa humana. En construcciones derivadas se reemplazó el promotor de globina alfa por los siguientes promotores: citomegalovirus (CMV), virus de tumor mamario murino (MMTV) y FN humana. Con cada una de estas construcciones se transfectaron células Hep 3B y se cuantificó la proporción relativa de los mensajeros con y sin ED I. Mientras que el splicing del exón ED I es bajo con el promotor de alfa globina, resulta 10 veces más alto con el promotor de CMV. Dado que estos dos promotores determinan distintos puntos de inicio de la transcripción y, por consiguiente, distintas regiones 5' no codificantes de sus transcriptos, resultada importante demostrar que la eventual diferencia en la estructura secundaria de los transcriptos no era la causa de las diferencias observadas en el splicing. Para ello se utilizaron la construcción del promotor de FN (FN wt) y una variante del mismo (FN mut), en el cual los sitios CRE (cyclic AMP response element) y CCAAT fueron mutados disruptivamente. Estas dos construcciones inician en el mismo sitio y dan transcriptos de idéntica secuencia y, por ende, de idéntica estructura secundaria. No obstante, el splicing del exón ED I difiere significativamente entre ambas construcciones. Los sitios CRE y CCAAT interactúan cooperativamente en la transcripción del promotor de FN. En particular, el factor de transcripción ATF-2, que se une al sitio CRE, facilita la unión de los factores CP-1 y NF-1 al sitio CCAAT, interactuando físicamente con los mismos. El control del splicing ejercido por la maquinaria transcripcional no depende de la "fuerza" sino de la calidad del promotor, ya que activaciones del orden de 3 veces del promotor CMV por AMP cíclico, o de 10 veces del promotor MMTV por dexametasona, no alteran el patrón de splicing alternativo característico de cada promotor. La inclusión del exón ED I en el mRNA maduro es estimulada por la unión de proteínas SR (Ser-Arg-rich) a las secuencias exónicas del transcripto llamadas "splicing enhancers". Demostramos que la sobreexpresión de la proteína SR SF2/ASF estimula específicamente el splicing del exón ED I, a través de su unión a la secuencia GAAGAAGAC presente en el mismo. Sorprendentemente, la sensibilidad a SF2/ASF varía con el tipo de promotor que dirige la transcripción del minigen, sugiriendo que la maquinaria transcripcional podría influir en el reclutamiento de SF2/ASF a los complejos multiproteicos que realizan el splicing.

SYMPOSIUM ON OXIDATIVE STRESS

MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN. Qishui Lin, Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, 320 Yue Yang Road, Shanghai 200031, China.

Uncoupling protein (UCP) is a mitochondrial protein embedded in the inner membrane. It was first found in the brown adipose tissue mitochondria and can amount to 10-15% of the total protein in these mitochondria. The UCP behaves as a proton translocator, and the proton translocation activity was inhibited by purine nucleoside di or tri-phosphate. Besides, it also increases the permeability of the inner mitochondrial membrane of a number of anions including Cl⁻. It was thought that the UCP is responsible to the non-shivering heat production. Nucleotide binding of the UCP has been key in the isolation and characterization of this H⁺-transporting protein.

A number of studies has illustrated the physico-chemical properties of UCP. It is a membrane bound protein with 307 amino acids residues. The binding of nucleotide is influenced by the pH of the medium, and the proton translocation activity is enhanced by fatty acids. The kinetics of nucleotide binding showed that there were an initial fast phase and subsequent slow phase. The former represented the loose complex of UCP-nucleotide, and the latter represented the tight complex, i.e. the loose complex rearranges slowly into a tight complex. Consistent with the kinetic studies, FTIR study also showed conformational changes upon the addition of nucleotide to UCP.

During cold adaptation, the UCP content increased obviously. It was showed that noradrenalin can mimic the effect of cold stimulus. After the injection of noradrenalin, both the content of UCP mRNA and UCP increased. However, during the hibernation of Daurian squirrel, the UCP mRNA content was high, but the UCP content did not change much in compare with that of nonhibernating control kept at warm temperature. On the other hand, in the early stage of arousing, the UCP content increased, indicating that there is a translation control for the synthesis of UCP.

Recently UCP 2, UCP 3 and UCP 4 were found by laboratories through the comparison of the data base with UCP sequence. UCP 2 existed in most tissues, UCP 3 existed mostly in skeletal muscle and brown adipose tissue, and UCP 4 existed predominately in neural tissues. Big efforts have been made to express and isolate the UCP 3 protein in order to illustrate the properties of UCP 3 as well as to explore the possibility that UCP 3 is a promising target for anti-obesity drug development aimed at increasing thermogenesis. It was thought that there would be a big market.

MECANISMOS DE ACCION DE ANTIOXIDANTES (Mechanism of action of antioxidants) Lissi E, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

El daño asociado a procesos mediados por radicales libres o especies activas del oxígeno (ROS) dependerá de su concentración estacionaria. Esta puede ser disminuida controlando la velocidad de su formación y/o aumentando la velocidad de sus procesos de remoción. Compuestos que actúan disminuyendo la velocidad de formación de ROS se denominan antioxidantes preventivos (quelantes, glutatión, peroxidasa, catalasa), mientras que los que remueven los radicales se denominan inhibidores o atrapadores de radicales (Vit E, ácido úrico, superóxido dismutasa). En general, aún en estudios "in vitro", no es sencillo decidir si un determinado aditivo que disminuye la velocidad de un proceso oxidativo actúa controlando la iniciación y/o removiendo los radicales primarios o portadores de la cadena de oxidación. En algunos casos, esta información puede ser extraída de la cinética del proceso o de experimentos competitivos empleando un inhibidor de referencia de comportamiento conocido.

Distintos inhibidores pueden actuar sobre distintos ROS, aunque encontrar compuestos no enzimáticos de alta especificidad es difícil. Estos inhibidores son generalmente empleados para determinar la participación de un determinado ROS. Estos experimentos son relativamente sencillos "in vitro" pero mucho más difíciles "in vivo". Para estos fines son más adecuados experimentos de atrapamiento de spin, aunque su cuantificación es difícil.

Existen técnicas relativamente sencillas que permiten evaluar la carga antioxidante total de un determinado extracto, fluido biológico o tejido. Algunas de estas técnicas miden la carga total de antioxidantes, mientras que otras intentan evaluar la capacidad del medio para modular la concentración estacionaria de un dado ROS. Las ventajas y limitaciones de estos procedimientos serán discutidas.

PARTICIPACION DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO EN LA ACTIVACION DE GENES ASOCIADOS A LA BIOGENESIS MITOCONDRIAL. (Reactive oxygen species participate in the activation of genes that are associated with mitochondrial biogenesis). GUERRERO J., Soto U., Miranda S., Foncea R., Leighton F. Lab de Citología Bioquímica y Lípidos, Fac de Ciencias Biológicas, P Universidad Católica de Chile (fleight@genes.bio.puc.cl)

La producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (EROs) se asocia con la función mitocondrial y desempeña un papel importante en numerosas condiciones fisiológicas y patológicas. La biogénesis mitocondrial es el resultado de la expresión coordinada de genes nucleares y mitocondriales. La regulación núcleo-mitocondria involucra dos factores de transcripción codificados por el núcleo: el factor respiratorio nuclear 1 (NRF-1) y el factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA). NRF-1 regula la expresión de mtTFA y de otros genes mitocondriales y mtTFA controla la transcripción del DNA mitocondrial. Sin embargo, no se sabe cuál o cuáles son las señales mitocondriales que permiten la regulación retrógrada mitocondria-núcleo. En este trabajo proponemos que la señalización al núcleo, para la regulación coordinada de la expresión de genes mitocondriales, se realiza o está mediada por EROs. Para evaluar esta hipótesis, se expuso células HeLa a menadiona (100 µM) y se midió la expresión de los genes NRF-1, mtTFA y Cox III (gen de la subunidad III de la citocromo c oxidasa, codificada por el DNA mitocondrial), mediante RT-PCR semicuantitativo. Los resultados mostraron que el aumento de EROs provocó un aumento secuencial en la expresión de NRF-1, mtTFA y Cox III. Estos resultados constituyen la primera evidencia que EROs serían intermedios en la señalización mitocondria-núcleo, responsable de la biogénesis mitocondrial. (Financiamiento: FONDECYT 1960637 y Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas. PUC-PBMEC98)

OXIDATIVE STRESS AND SIGNAL TRANSDUCTION. Izumi Nakashima, Anwaral A. Akhand, Mei-yi Pu, Wei Liu, Jun Du, Masashi Kato, Haruhiko Suzuki, Michinari Hamaguchi and Toshio Miyata. Department of Immunology and Research Institute for Disease Control and Mechanism, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466, Japan; and Institute of Medical Sciences, Tokai University School of Medicine, Isehara 259-11, Japan.

Differentiation (gene activation), proliferation (DNA synthesis) and death (apoptosis) of cells are basically controlled by the signals transduced from cell surface to nucleus following cell-cell interaction. The intracellular signal transduction involves a cascade of reaction (association or dissociation) between two structures, which turns on or off the switch for signal transduction. Association of cell surface receptor with their ligands bearing complementary structures, which mediates cell-cell interaction and receptor crosslinkage, turns on the switch for the first step of signal transduction. The transduced signal frequently induces activation of receptor type or non-receptor type protein tyrosine kinases (PTKs). Phosphorylation of proteins at tyrosine by PTKs may result in their conformational change to be complementary to other structures for association, which turns on or off the switch for further signal transduction. For example, association of phospho-Tyr527 on Src kinase with the Src homology-2 (SH2) sequence on the same or different molecules turns off the switch for the kinase activity. In this case, Tyr527 dephosphorylation by a protein tyrosine phosphatase (PTPase) turns on the switch for kinase activation. The possibly last step of the switch for signal transduction is turned on by association of the transcription factors with specified DNA sequences. Each of these steps of signal transduction is controlled by the genes that decide the conformation of the elements for the molecular switch to be turned on or off. The question is how this genetically regulated signal transduction cascade would be modulated by the environmental oxidative stress to living organisms. Oxidative stress is provided by various agents such as oxygen, reactive oxygen intermediates (ROI), nitrogen oxide (NO), alkylating chemicals, heavy metals, ionizing rays and carbonyl compounds originated from sugars and lipids. Agents for oxidative stress may affect the structure of the elements for the molecular switches to be turned on or off. Increasing evidences suggest that this occurs at different steps of the cascade of signal transduction, and plays crucial roles in physiology and pathology of cells and living organisms. Various environmental agents for oxidative stress may affect cell surface receptors or intracellular PTKs and PTPases, either directly or indirectly through secondarily generating ROI or NO after the receptor activation. Our recent studies have shown that oxidative stress-mediating chemicals such as ROI, NO, heavy metals and carbonyl compounds all induce activation of receptor or non-receptor type PTKs through their chemical modification including protein crosslinkage. Some of the oxidative stress-linked signals generated through chemical modification of the signal transducing elements have been shown to partially replace or modify the genetically controlled signals, ultimately regulating the cellular functions in coordination with the latter signals. We have partially analyzed the cascade of the oxidative stress-mediated signal transduction of inducing cell growth and cell death, which is downstream of PTKs. By analyzing the molecular mechanism of activation of non-receptor tyrosine kinase Src by the oxidative stress-linked signals, we have found that those signals induce conformational change in the Src kinase at least in part due to disulfide bond-mediated molecular aggregation, which turns on the molecular switch for kinase activation bypassing the known genetically controlled switch through interaction between phospho Tyr527 of the Src kinase and the SH2 domain.

SYMPOSIUM SIGNAL TRANSDUCTION

CALCIUM IN THE REGULATION OF THE EXPRESSION OF THE PLASMA MEMBRANE CALCIUM PUMP: ISOFORM-SPECIFIC EFFECTS. CARAFOLI E. Institute of Biochemistry, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland and Department of Biological Chemistry, University of Padova, Italy.

Two of the four basic isoforms of the plasma membrane calcium pump (1,4) are ubiquitously expressed, two (2,3) are essentially brain specific. Isoform 2 has the highest calmodulin affinity. Primary cultures of cerebellar granule cells from newborn rats express large amounts of isoforms 1 and 4, but not of isoforms 2 and 3 at plating time. Incubations of the cells in depolarizing concentrations of KCl, which promote Ca^{2+} influx, promote the expression of isoforms 2 and 3, and of a brain specific spliced variant of isoform 1. The effect becomes evident in about 3 days, reaching a plateau in about 5 days. In contrast, the depolarizing conditions very rapidly (1-2 hours) down-regulate the expression of isoform 4 in a process that is dependent on calcineurin. Incubation of the cells in L-type Ca^{2+} channel blockers abolishes the up- and down-regulation of the pump gene

THE PIVOTAL ROLE OF PLANT DIVISION KINASES (PKs) IN HORMONAL CONTROL OF CELL CYCLE IN PLANTS. D. Dudits, Z. Magyar, T. Meszaros, D. Dedeoglu, G.V. Horvath, M. Bilgin, F. Ayaydin, E. Csordas Toth, I. Kovacs, A. Feher Institute of Plant Biology, BRC, Hungarian Academy of Sciences, POB. 521., H-6701 Szeged, Hungary.

Cell division as a key cellular function in the establishment of plant body is under the complex control of plant growth hormones and regulators. Therefore, we have to postulate molecular mechanisms that link the hormone signal pathways and cell cycle control elements. The recent achievements in identification of a set of cell division genes like plant homologues of cyclin-dependent kinase and cyclin genes provide molecular tools to characterize the hormone responses. In alfalfa, the auxin (2,4-D) treatment rapidly activated the kinase and cyclin genes. The cyclin-dependent kinase complexes showed elevated histone H1 phosphorylation activity in auxin-treated alfalfa cells, while ABA exhibited an inhibitory effect. The S-phase specific histone H4 promoter of wheat responded to hormonal treatment in transgenic maize. The activity of GUS reporter gene reflects the stimulative or inhibitory effects of plant hormones.

REGULACION DE LA ADENILIL CICLASA POR LA PROTEINA G α s: UN ANALISIS MOLECULAR. (Adenylyl cyclase regulation by the G α s protein: A molecular analysis). Olate, J., Echeverría, V., Guzmán, L., Hinrichs, M.V., Genevière, A.-M.* y Torrejón, M. Laboratorio de Genética Molecular, Depto. de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. * Laboratoire Arago, Observatoire Oceanologique de Banyuls, Banyuls Sur-Mer, Francia.

La adenilil ciclasa (AC; EC 4.6.1.1) es una enzima ampliamente distribuida en células eucarióticas y regulada por la proteína G α s. Hasta la fecha se han clonado 10 diferentes AC de mamíferos. Todas las isoformas son reguladas positivamente por la proteína G α s y el diterpeno forskolina, pero difieren en su distribución tisular y regulación por otras moléculas efectoras como Ca^{++} , G $\beta\gamma$ y quinasas. Se ha propuesto una estructura en la membrana plasmática para la AC del tipo NM1C1M2C2, donde los dominios citosólicos C1 y C2 contienen las regiones más conservadas entre las AC y forman el dominio catalítico de la enzima. Recientemente se ha obtenido la estructura tridimensional del complejo G α s-dominio citosólico de la AC, lo que ha permitido entender mejor los mecanismos moleculares de la regulación de la enzima por la proteína G α s. En este contexto nosotros hemos iniciado el estudio de la interacción física de la AC de *Xenopus laevis* con la proteína G α s humana a través de la técnica de doble híbrido. Hemos encontrado interacción entre los dominios citosólicos C1-C2 y C2-C2, entre el dominio C2 y la proteína G α s en su forma activa G α s(QL) y entre la proteína quimérica G α i/G α s(QL) y el dominio C2. No hemos encontrado interacción entre C1-C1, C1-G α s, C1-G α s(QL), C1-G α i, C2-G α s, C2-G α i, G α i/G α s-C1 y G α i/G α s-C2. Nuestros resultados indican claramente que: a) el dominio C2 puede formar homodímeros, como ha sido encontrado en la estructura cristalina de la AC, pero en ausencia de forskolina y b) solamente la forma activa de G α s interacciona con la AC a través de su dominio citosólico C2.

Proyectos FONDECYT 1971115 (JO y MVH) y 2980050 (MT) y Proyecto ECOS C95B01 (JO y AMG).

SISTEMA DE TRANSDUCCION DEL IGF-1 EN LA HIPERTROFIA Y APOPTOSIS CARDIACAS (IGF-1 signalling system in cardiac hypertrophy and apoptosis). LAVANDERO S., Sapag-Hagar M., Fonca R., Pérez V., Gálvez A., Ebensperger R., Meléndez J., González-Jara F., Morales M.P., Díaz-Araya G. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Los estímulos mecánicos supra-fisiológicos conducen, a través de la acción de mensajeros paracrinos-autocrinos, a hipertrofia (HTF) y apoptosis (AP) en los cardiomiocitos. En la HTF aumenta el tamaño celular, síntesis de proteínas y expresión de genes cardíacos, sin cambios en el número de células. En cambio en la AP hay muerte celular programada bioquímica y genéticamente. Hemos estudiado la participación de IGF-1 en estos dos procesos a través de la caracterización del sistema de transducción de su receptor (RIGF-1) en cardiomiocitos de rata. El IGF-1 inhibe la AP y estimula la HTF con aumentos en la síntesis de proteínas y del tamaño celular, sin modificar la síntesis de DNA y expresión transitoria de diversos genes reporteros cardio-específicos.

Estos RIGF-1 de alta afinidad se autofosforilan en tirosina, iniciando la activación temprana de un sistema de transducción de múltiples componentes (IRS-1, PLC- γ 1, PI3-K, PKCs, c-RAF, MEKs, ERKs y rsk). Su estudio nos ha llevado a postular que es la vía ERK-PKC, y no la de la PI3-K, la que participa en la respuesta hipertrofica a IGF-1 en los cardiomiocitos. Estamos evaluando esta hipótesis mediante genes dominantes negativos y secuencias antisentidos para diferenciar las vías de transducción del RIGF-1 en su acción antiapoptótica e hipertrofica.

Proyectos FONDECYT 1980908 y 1950452.

INCORPORACIONES

1

CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE ACROSINA DE CERDO QUE PARTICIPAN EN LA UNIÓN NOENZIMÁTICA A LAS GLICOPROTEÍNAS DE LA ZONA PELUCIDA HOMÓLOGA (Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins). Crosby J.A.^{1,2}, Carvalho P.² & Barros C.¹ Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile; ²ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se postula a acrosina como la molécula responsable de la unión secundaria a la zona pelúcida facilitando el paso del espermatozoide reaccionado a través de la zona. En este trabajo, se expresó *in vitro* distintas proteínas recombinantes de β -acrosina para analizar la capacidad de unión de acrosina a la zona pelúcida y estudiar su efecto en la fecundación *in vitro*. Se determinó en un ensayo de dot blot, que tres de las proteínas recombinantes (normal, mutante Ser/Ala²²² y cadena pesada) tienen la capacidad de unir [¹²⁵I]-ZPGPs. La recombinante Ser/Ala²²² (mutante del sitio catalítico de β -acrosina), no difiere de la recombinante normal en el mecanismo de interacción a ZPGPs, indicando que la unión secundaria a la zona es realizada por un proceso no enzimático. Ensayos de unión a zonas pelúcidas *in toto* indican que la unión es saturable y que es estable hasta por 12 horas. Autoradiografías de esta unión indican que la unión ocurre en todo el grosor de la zona y en forma heterogénea. Los ensayos de competencia *in vitro* de la penetración de la zona pelúcida indican que las recombinantes no interfieren en el número de espermatozoides que se unen a la zona ni en el proceso de inducción de la reacción acrosómica. De nuestros resultados se puede concluir que la unión entre acrosina y la zona pelúcida depende de la estructura secundaria y terciaria de acrosina y no depende del sitio activo de la enzima. Proyecto financiado por FONDECYT 1971234.

3

ANOMALÍAS EN LA EXPRESIÓN DEL PROTO-ONCOGEN *c-rel* EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. (Abnormal expression of *c-rel* proto-oncogene in T lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis). Metz, C., Burgos, P., Graumann, R., Araya, A., Bull, P., Massardo, L., Jacobielli, S. y González, A. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina, y Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

c-Rel es un proto-oncogen que pertenece a la familia de factores de transcripción NF- κ B/Rel, cuyos miembros incluyen a NF- κ B1 o p50, NF- κ B2 o p52, RelA o p65 y RelB. Estos factores son parte del sistema que regula la respuesta inmune. c-Rel, a través de su capacidad transactivadora y su unión a sitios κ B, participa crucialmente en el sistema de control transcripcional de los genes que son inducidos durante la activación de los linfocitos T, incluyendo los de IL-2 y la subunidad α del receptor de IL-2.

Nuestra hipótesis es que los linfocitos T de pacientes con artritis reumatoidea (AR) presentan alteraciones en el sistema de regulación mediado por factores NF- κ B/Rel, como parte de los mecanismos patogénicos de la autoinmunidad. En este trabajo, el análisis del grado de activación del sistema NF- κ B/Rel mediante retardo en geles de extractos nucleares de monocitocitos de pacientes AR con respecto a los controles no demostró diferencias significativas. Sin embargo, utilizando un ensayo de transcripción reversa y PCR competitivo, encontramos niveles elevados de mRNA de *c-rel* en linfocitos T de pacientes con AR, en comparación con controles sanos. In situ blots semicuantitativos indican que esto se traduce en una mayor expresión de la proteína c-Rel. Además, durante la activación de linfocitos T con Concanavalina A observamos mayores niveles de mRNA de *c-rel* en preparaciones de monocitocitos de sangre periférica de pacientes con AR respecto de controles sanos. Estos resultados, en conjunto con otras observaciones similares que hemos realizado en pacientes lupus eritematoso generalizado, sugieren la existencia de una falla en los mecanismos regulatorios de la expresión de *c-rel* en linfocitos autoinmunes.

Financiado por Fondecyt # 1951132 y Fondecyt # 1981026

2

LAMININA INDUCE LA DESAGREGACIÓN DE AMILOIDE. (Laminin induces the disaggregation of amyloid) Morgan, C., Keymer, J.E., Garrido, J. e Inestrosa, N.C. Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica de Chile.

La deposición de amiloide en placas seniles se considera un proceso patológico relevante en la Enfermedad de Alzheimer. Otros autores han postulado teóricamente que este proceso es reversible. Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que la laminina -una glicoproteína extracelular inducida por daño cerebral- inhibe la formación de fibras de amiloide *in vitro*, abriendo la posibilidad de que la laminina pueda también desagregar amiloide pre-formado. Mediante fluorescencia de tioflavina-T y microscopía electrónica de transmisión mostramos que en presencia de laminina 100-200 nM, las fibras de amiloide preparadas a concentraciones de péptido A β (1-40) tan altas como 1 mg/ml, se depolimerizan rápidamente, mientras que a concentraciones de laminina menores o iguales a 50 nM, las fibras permanecen similares a los controles. En base a los datos de fluorescencia de tioflavina-T hemos desarrollado un modelo de autómatas celulares, espacialmente explícito, que simula el patrón espacio-temporal de la desagregación de amiloide, predicho por la hipótesis, y que describe razonablemente el observado por microscopía electrónica a bajo aumento. Este modelo considera que la probabilidad de desagregación de amiloide (en cada punto de una grilla a tiempo t) depende sencillamente de la concentración de laminina accesible al amiloide. Nuestras observaciones respaldan la noción de que la formación de amiloide puede ser enteramente revertida, dependiendo de cambios sutiles en la concentración de ciertas moléculas presentes en su entorno, y son consistentes con el efecto neuroprotector de laminina, reportado por otros autores. En su conjunto, nuestros resultados contribuyen, tanto a lograr una mejor comprensión de la enfermedad de Alzheimer, como a explorar el posible valor terapéutico de laminina -o de fragmentos derivados de ella- para prevenirla o tratarla.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el Proyecto Fondecyt N°2970070 de C.M. y por una Cátedra Presidencial en Ciencias otorgada a N.C.I.

4

CINÉTICA DEL COMPLEJO Mn³⁺-OXALATO EN REACCIONES CATALIZADAS POR LA MANGANESO PEROXIDASA DE *Ceriporiopsis subvermispora*. (Kinetics of Mn³⁺-oxalate in reactions catalyzed by manganese peroxidase of *C. subvermispora*). Urzúa, U. Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: R. Vicuña).

El sistema ligninolítico del basidiomicete *C. subvermispora* está constituido por las enzimas manganoso peroxidasa (MnP) y lacasa. El objetivo central de este trabajo ha sido la identificación del sistema generador del H₂O₂ extracelular requerido por la MnP. Dada la aparente ausencia de actividad de oxidasa extracelular, se encontró que la MnP posee actividad peroxidasa-oxidasa sobre oxalato y glioxilato, metabolitos secretados por el hongo al medio extracelular.

La MnP oxida aeróbicamente ambos compuestos en reacciones dependientes de manganeso, exhibiendo el glioxilato una mayor reactividad. En la reacción con oxalato se descubrió que la MnP puede formar un complejo Mn³⁺-oxalato en ausencia de H₂O₂ agregado externamente. La formación de este complejo muestra un retardo característico que es disminuido por glioxilato y cantidades catalíticas de H₂O₂ y acetato manganíco. Las concentraciones de Mn³⁺, de oxalato, y el pH de la reacción afectan notablemente la cantidad máxima de complejo formado y su posterior velocidad de descomposición. En ausencia de MnP se determinó que la reacción de descomposición muestra un orden de 3/2 en el rango de 30 a 100 μ M Mn³⁺-oxalato con una $k_{cat} = 0.012 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-0.5}$ a pH 4.0. La constante de velocidad aumenta a valores bajos de pH debido al estado de ionización del oxalato, mientras que disminuye a concentraciones de oxalato sobre 1 mM debido a la formación de un complejo trioxalato que posee una mayor estabilidad.

En base a los resultados obtenidos se propone un mecanismo de producción de H₂O₂ extracelular que consiste en la oxidación manganoso dependiente de ácidos orgánicos por la MnP en el medio extracelular. *In vivo*, se dan condiciones óptimas para la formación de un complejo Mn³⁺-oxalato cuya descomposición es el evento central de dicho mecanismo.

Financiado por FONDECYT 1971239 y 2960010. U. Urzúa es alumno del Programa de Doctorado de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, Valdivia.

COMUNICACIONES LIBRES

5

LAS CELULAS DE KUPFFER ACTIVADAS PRODUCEN UN MEDIADOR QUIMICO QUE AUMENTA EL METABOLISMO DE ETANOL POR LOS HEPATOCITOS. Moncada C¹, Israel Y^{1,2}. ¹Centro de Farmacoterapia Génica, Dpto Qca Fcológica y Toxicol, Fac. Cs. Qcas. y Fcas. U. de Chile. ²Dept. Anatomy, Pathol and Cell Biol. Jefferson Med. College, Thomas Jefferson University.

El metabolismo microsomal del etanol (EtOH), ocurre principalmente vía citocromo P450 IIE1 el cual, a diferencia de la reacción con ADH, transfiere un electrón a la vez. Uno de los metabolitos que se forman en este proceso es el radical hidroxietilo (HER). Este radical puede ser atrapado con POBN y cuantificado mediante resonancia paramagnética de electrón (EPR).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de mediadores químicos en las células de Kupffer (CK) activadas que pudiesen aumentar la producción de HER por los hepatocitos cultivados.

Las CK aisladas mediante centrifugación por elutriación, fueron activadas en cultivo con PMA 1×10^{-6} M, EtOH 100mM y ambos. Luego de 24 h, los medios de incubación fueron centrifugados y concentrados. Los sobrenadantes concentrados, se agregaron a hepatocitos en cultivo en presencia de EtOH 50 mM y POBN 20 mM. Se comparó la producción de HER a las 4 y 24 horas mediante EPR, evaluándose las intensidades relativas de las señales obtenidas. También se realizaron incubaciones con ¹³C-EtOH, para verificar la identidad del aducto POBN-HER.

Se observaron aumentos de hasta 11 veces en la metabolización de EtOH vía HER por los hepatocitos incubados con sobrenadantes de Células Kupffer activadas. La identidad del compuesto producido por CK esta siendo investigadas.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1960840 y Cátedra Presidencial en Ciencias (YI).

7

LA PLACA DEL SUELO SECRETA UN COMPUESTO (S) HOMOLOGO A RF-GlyI SECRETADO POR EL ORGANNO SUBCOMISURAL. (The floor plate secretes a compound homologous to RF-GlyI secreted by the subcomissural organ) Muñoz, R.I., Richter, H., Yulis, R. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

La placa del suelo (PS) se extiende a lo largo de la línea media ventral de la médula espinal embrionaria y del tronco cerebral. La región más rostral de la PS, localizada en la región de la flexura pontina, es conocida como órgano flexural (OF). El órgano subcomisural (OSC) que corresponde a la región más caefalica de la placa del techo y el OF, constituyen las primeras estructuras glandulares del sistema nervioso en diferenciarse. Las células de la PS de rata y de bovino inmunoreaccionan con un anticuerpo policlonal (AFRU) dirigido contra las glicoproteínas secretadas por el OSC de bovino adulto. Diversas evidencias indican que este material inmunoreactivo de la PS corresponde a un material secretorio que se libera a la cavidad ventricular y en algunas regiones este también se transporta a lo largo de las prolongaciones basales de las células secretorias de la PS. Evidencias obtenidas mediante: a) *immunoblot* de extractos de OSC y PS de bovino utilizando AFRU; b) análisis de expresión génica por RT-PCR de RNA total de PS de bovino utilizando primarios del gen RF-GlyI, el cual codifica para una glicoproteína de la FR (material secretorio del OSC); c) estudio inmunocitoquímico de la PS utilizando un anticuerpo contra un péptido sintético deducido de la secuencia aminoácidica de RF-GlyI, indican que el OSC y la PS secretarian un compuesto(s) con una alta homología. Estas y otras evidencias sugieren que el compuesto AFRU inmunoreactivo secretado por la PS se libera a la cavidad ventricular y podría corresponder a un morfógeno que actúa a distancia.

Financiado por proyecto FONDECYT 197-0627

6

EFEECTO DE DROGAS SOBRE EL CONTENIDO DE TIOLIOS REDUCIDOS EN DIFERENTES CEPAS DEL *TRYPANOSOMA CRUZI*. (Effect of drugs upon the concentration of reduced thiols in different strains of *Trypanosome cruzi*). Morello A., Repetto Y., Tellez R., Gaule C. y Maya J.D. Programa de Farmacología Molecular y Clínica. Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile. Casilla 70086, Santiago 7 Chile. e.mail: amorello@machi.med.uchile.cl. Las drogas que se han usado para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas son el nifurtimox y el benznidazol. Su mecanismo de acción es a través de la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos. En el *T. cruzi*, los tioles libres como el glutatión (GSH), la glutatiónil-espermidina (GSH-SP) y el tripanotión (T(SH)2), juegan un papel importante en la defensa contra radicales libres en el parásito. El contenido de tioles reducidos en las diferentes formas del parásito fue determinado por derivatización con monobromobimano y posterior separación y cuantificación por HPLC. La concentración de tioles totales en epimastigotes y tripomastigotes del clon Brenner, fueron de 1196,0±73,5 y de 892,9±76,8 nmol/g peso fresco respectivamente y en el clon Dm28c fueron de 612±89,5 y 666,1±24,2 nmol/g peso fresco respectivamente. El tiol más abundante fue el tripanotión (62 a 72%). El nifurtimox (20 µM) y el benznidazol (100 µM) produjeron una disminución de la concentración de tioles libres en más del 80%, siendo el tripanotión el más afectado (>90). Se concluye que la concentración de tioles libres varía de una cepa a otra y de una forma a otra en el *T. cruzi*, siendo el tripanotión, el tiol más abundante y el más afectado por las drogas tripanocidas nifurtimox y benznidazol. Además, la susceptibilidad al nifurtimox y al benznidazol está relacionada con el contenido de tioles libres.

La síntesis del glutatión y por consiguiente del tripanotión es un posible blanco quimioterapéutico en el desarrollo de drogas antichagásicas. Financiado por SIDA-Suecia y Fondecyt 1961095-Chile.

8

ESPECIFICIDAD DE LA REMOCIÓN DE tRNA POR EL DOMINIO RNasa H DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HIV-1.

Leon, O., Smith, C., Guaitiao, J. P. y Roth, M. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile y Dept. Biochemistry, UMDNJ/RWJ Medical School, Piscataway, N.J. USA.

Previamente se ha demostrado que un dominio aislado de RNasa H de HIV-1 reconoce el intermediario viral de transcripción inversa DNA/tRNA^{lys}. Asimismo se determinó que la longitud mínima del RNA en dicho sustrato, reconocida por el dominio de RNasa H, es de 8 nucleótidos.

Con el objeto de determinar las posiciones de los nucleótidos que son importantes en el reconocimiento del sustrato se introdujeron sustituciones que generan cambios en el apareamiento (mismatches) o en las propiedades de algunas bases. Los resultados, que fueron confirmados por sustituciones más específicas y por ensayos con la transcriptasa inversa completa, indican que los determinantes para la remoción del tRNA por el dominio de RNasa H se encuentran en los 6 ribonucleótidos del extremo aceptor del tRNA^{lys}. Dos de estas posiciones corresponden las citosinas 2 y 3 del extremo CCA y son comunes a todos los tRNAs, por lo que la especificidad esta determinada por las posiciones 4 y 6. Esta conclusión se confirmó por la actividad obtenida sobre el sustrato de Moloney Mu MLV conteniendo los nucleótidos de HIV-1 en las posiciones 4 y 6.

Finalmente, en esta presentación se analizarán algunos resultados preliminares de una reacción de entrecruzamiento dependiente de manganeso, en un enfoque destinado a determinar las regiones de RNasa H involucradas en la unión del sustrato. (Financiado por proyectos FONDECYT 1980982, y NIH R01-GM51151-01.)

CARACTERIZACION DEL GEN *mat-r* Y DE LA EDICION DE SUS TRANSCRITOS EN MITOCONDRIAS DE *Solanum tuberosum* (Characterization of *mat-r* gene and RNA editing in *Solanum tuberosum* mitochondria).

Mercado, A. y Jordana, X. Depto. de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Algunos genes mitocondriales de plantas superiores poseen intrones, los que se clasifican como intrones de tipo II. Estos intrones contienen a veces marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para proteínas involucradas en el proceso de "splicing", denominadas maturasas (*mat-r*). Estas presentan además homología con transcriptasas inversas, actividad que estaría involucrada en la movilidad de los intrones. La función de las maturasas ha sido demostrada sólo en base a estudios genéticos en levadura. En mitocondrias de plantas se encuentra un gen *mat-r*, pero no hay pruebas de la expresión y función de la proteína.

En este trabajo hemos aislado y caracterizado el gen *mat-r* de mitocondrias de papa. Se encuentra localizado río abajo del 4º exon (d) del gen que codifica para la subunidad I de la NADH deshidrogenasa (*nad1*), en un intrón discontinuo que es escindido en un evento de splicing en trans. El gen *mat-r* es transcrito, y los transcritos son modificados post-transcripcionalmente por edición. Como en los genes funcionales de mitocondrias, la edición del RNA aumenta la similitud entre la proteína MAT-R de papa y las proteínas homólogas de organismos no vegetales. La edición de *mat-r* está concentrada en los dominios maturasa (X) y transcriptasa inversa (RT). Estos resultados, junto a la integridad y conservación de *mat-r* en diferentes plantas, sugieren que la proteína codificada es funcional en mitocondrias de plantas. Además de participar la maturasa en el "splicing", se ha postulado que la actividad de transcriptasa inversa podría jugar un papel en la transferencia de genes desde el organelo al núcleo, proceso predicho por la teoría endosimbionte del origen de los organelos y que está aún en curso en las plantas. Financiado por Fondecyt 1960252 y 8980005.

11

AUTOANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA UN EPITOPO RIBOSOMAL RECONOCEN UNA PROTEINA QUE RECICLA EN LA SUPERFICIE DE CELULAS N2A. (Autoantibodies against a ribosomal epitope recognize a protein that recycles in the surface of N2A cells). Burgos, P., Massardo, L. Depto. de Inmunología Clínica y Reumatología, Facultad de Medicina, y Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio J. Garrido)

Autoanticuerpos contra proteínas ribosomales se encuentran en 12-16% de los pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) y se han asociado a sus complicaciones neuropsiquiátricas y hepáticas. Las proteínas ribosomales P₀, P₁ y P₂, de tamaños de 38, 19 y 17 kDa, respectivamente, son reconocidas por estos autoanticuerpos a través de un epítipo común de 22 aminoácidos ubicado en la región carboxilo terminal. Se ha detectado la presencia de un epítipo antigénicamente relacionado con las proteínas P-ribosomales en membrana plasmática de células HepG2 y neuroblastoma humanas, y se ha asumido que correspondería a la proteína P ribosomal de 38kDa. La presencia de esta proteína en superficie celular podría gatillar mecanismos patogénicos en respuesta a los autoanticuerpos anti-P. Con el fin de estudiar la biología celular de la supuesta "proteína ribosomal" en membrana plasmática desarrollamos anticuerpos policlonales contra el epítipo de 22 aminoácidos. Este anticuerpo fue capaz de inmunoprecipitar una proteína de superficie celular en células de neuroblastoma N2A y HepG2, de aprox. 45 kDa, claramente distinguible de la proteína ribosomal. Es más, en experimentos de pulso y caza, marcando metabólicamente las células con metionina-³⁵S, encontramos evidencia que su transporte a la superficie celular ocurre a través de la vía exocítica clásica, ya que su llegada es inhibida por BFA. La proteína inmediatamente después de llegar a la superficie celular se endocita y luego recicla a la membrana plasmática, liberándose una parte al medio de cultivo, presumiblemente por un corte proteolítico.

(Financiado por FONDECYT # 1961068).

10

ASOCIACION DE LAS PROTEINAS pp125^{FAK}, PAXILINA Y ERK2 DURANTE LA ACTIVACION DE CELULAS ENDOTELIALES DEPENDIENTE DE MOLECULAS DE ADHESION. (Association between pp125^{FAK}, paxillin and ERK2 during endothelial cell activation through adhesion molecules). REYES L.I., Roseblatt M. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Fundación Ciencia para la Vida.

Tanto proteína quinasa C como tirosinas quinasas han sido involucradas en los procesos de señalización gatillados por la adhesión celular. Estudios recientes indican que la fosforilación de proteínas presentes en adhesiones focales está ligada a otros eventos de señalización intracelular, que incluyen la fosforilación de paxilina, pp59^{lck} y otras.

En nuestro laboratorio hemos estudiado la interacción entre linfocitos y células endoteliales como una manera de entender los procesos de activación linfocitaria. La interacción entre células endoteliales columnares (CEC) y linfocitos está mediada por moléculas de adhesión, desconociéndose si esta interacción gatilla señales intracelulares y otros eventos en las CECs. En estudios previos demostramos que la activación de células endoteliales columnares de amígdala humana (AMG) directamente con células linfoblastoides B o con anticuerpos monoclonales dirigidos a moléculas de adhesión induce cambios tempranos (10 seg.) en la fosforilación de proteínas de 120, 70 y 45 kDa.

En el presente trabajo demostramos por experimentos de inmunoprecipitación que la activación de las células AMG a través de los receptores de adhesión induce cambios en la fosforilación de la quinasa de adhesión focal FAK (120 kDa), paxilina (70 kDa) y de una quinasa activada por mitógeno (MAPK), la quinasa de respuesta extracelular 2 (ERK2) (45 kDa). Además, observamos cambios similares en estas proteínas al activar las células AMG directamente con la línea celular linfoblastoide B RAMOS.

Estos resultados sugieren que la interacción linfocitos-endotelio induce un efecto rápido en las células endoteliales, activando cascadas de señalización intracelular que afectarían al citoesqueleto (paxilina) y la regulación transcripcional (ERK2). Financiado por FONDECYT proyectos 1980208(MR) y 1960876 (MRB).

12

METALOPROTEINASAS (MMPs) EN GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y CON EXOCRINOPATIA AUTOINMUNE Y SU RELACION CON DESTRUCCION ACINAR. (Metalloproteinases in normal and autoimmune exocrinopathy salivary glands and its relation to acinar destruction).

Goicovich, E., Aguilera, S., Alliende, C., Leyton, C., Fernández, J. and González, M.J. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En glándulas salivales afectadas con una exocrinopatía autoinmune [Sjögren(SS)] hemos observado: a) destrucción acinar acompañada de una importante fibrosis, b) pérdida de polaridad de células acinares, c) presencia de manojos de fibras de colágeno estromales entre células acinares, y en directa relación con la membrana plasmática basal, d) pérdida de reactividad de glicoproteínas de láminas basales y otros. Las MMPs degradan componentes de la matriz extracelular (MEC). Con el propósito de comprender los mecanismos involucrados en la desorganización del parénquima glandular nos pareció de interés determinar la capacidad productora de MMPs de glándulas salivales de pacientes con SS y en sujetos controles (SC). Glándulas salivales de labio de SC (n=7) y de SS (n=20) fueron homogeneizadas y sujetas a zimografía, los niveles de actividad enzimática se determinaron por densitometría. Ambos grupos presentaron MMP-2 y MMP-9, y expresan preferentemente la forma latente de estas enzimas. En presencia de APMA se observaron las formas activas. La cuantificación densitométrica de las zimografías mostró un aumento significativo en el grupo SS para la actividad MMP total y para la actividad de MMP-9 (p=0.0003). La razón MMP-9/MMP-2 fue de 2 para SC y de 9 para SS (p=0.0007). Estos resultados constituyen una de las primeras evidencias de la activación de MMPs en esta patología. Ellos podrían explicar en parte la desorganización de la MEC en este tejido y como consecuencia la atrofia acinar y el aumento de la fibrosis.

13

UNA DIETA RICA EN VEGETALES Y EL CONSUMO DE VINO TINTO ELEVAN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA (The antioxidant capacity in plasma increases with a diet rich in vegetables and with red wine consumption) **PÉREZ DD, GUASCH V, SAN MARTÍN A, y LEIGHTON F.** Lab. Citología Bioquímica y Lípidos, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (leighton@genes.bio.puc.cl)

Los niveles de antioxidantes plasmáticos dependen del consumo de frutas y verduras, y de otros alimentos como aceites vegetales y presumiblemente vino. Para evaluar algunos de estos factores, se desarrolló un estudio de intervención en que se midió la capacidad antioxidante en el plasma, luego de una dieta mediterránea (MD) y una dieta norteamericana (NA). Las dietas contenían 25,5 y 41,4 % de la energía (en%) como grasas, y 57,5 y 40,7 en% como carbohidratos, respectivamente. Frutas y verduras fueron incluidas en 5 y 2 porciones diarias en MD y NA, respectivamente. Por 90 días dos grupos de 21 voluntarios, recibieron ininterrumpidamente dieta MD o NA. Entre los días 30 y 60, se agregó isocalóricamente vino tinto, 240 ml/día. Se midió la capacidad antioxidante del plasma utilizando procedimientos basados en la amortiguación de la quimioluminiscencia generada por una fuente de radicales libres (luminol-ABAP). Se determinó TRAP (potencial total de antioxidantes reactivos) y TAR (reactividad de los antioxidantes totales). Al comparar los grupos, luego de 30 días de dieta, se observó un aumento significativo en TRAP (332 vs 299 $\mu\text{M eq Trolox}$, $p = 0,05$) y TAR (317 vs 246 $\mu\text{M eq Trolox}$, $p < 0,001$) para MD versus NA. El agregado de vino a una misma dieta produjo un aumento significativo de TAR en ambos casos (23%, $p < 0,01$, para MD y 15%, $p < 0,05$, para NA). En conclusión, la dieta MD induce un aumento de la capacidad antioxidante del plasma. Sobre este aumento, o sobre los valores más bajos observados con la dieta NA, el vino tinto produce un incremento adicional, estadísticamente significativo, en la capacidad antioxidante del plasma. (Financiamiento: Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, PUC-PBMEC'98)

15

LOS URUSHIOLES, UNA FAMILIA DE SENSIBILIZADORES DE CONTACTO, INHIBEN LA RESPIRACIÓN EN MITOCONDRIAS AISLADAS DEL HIGADO DE RATA (Urushiols, a family of contact sensitizers, inhibit oxidative respiration in mitochondria isolated from rat liver). **De Ioannes A. E.¹, Díaz M.¹, Quezada S.¹, Kalerjis A.¹, Garbarino J.³, Koenig C.² y Ferreira J.F.²**, ¹Departamento de Biol. Celular y Mol. Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D Santiago, Chile. ²Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Departamento de Química, Universidad Federico Santa María.

La exposición de la piel humana a ramas y hojas de árboles de la familia Anacardiaceae, a la cual pertenece el Litre, induce en individuos susceptibles una dermatitis de contacto severa. El análisis de cortes de piel de orejas de ratones expuestas epicutáneamente al Litre, mostró mitocondrias alteradas.

Con el fin de investigar el mecanismo de daño mitocondrial mediado por urushiols, analizamos el efecto de este sensibilizador de contacto sobre mitocondrias aisladas de hígado de rata. Se observó que los urushiols estimulan ligeramente el estado 4 de respiración, pero inhiben fuertemente la respiración estimulada por ADP y por el desacoplante CCCP, sugiriendo que el alérgeno predominantemente inhibe el transporte de electrones mitocondrial. Los experimentos siguientes apuntaron a determinar el sitio de acción del alérgeno, encontrándose que el flujo electrónico a través de la citocromo oxidasa no es alterado. En cambio, la respiración vinculada a sustratos NAD⁺ y FAD y el flujo electrónico vía ubiquinona-citocromo b-citocromo c₁ del complejo III, se inhibieron fuertemente. Estas observaciones sugieren que el transporte de electrones es inhibido por urushiols a nivel de la ubiquinona y citocromo b. Por lo tanto, la síntesis mitocondrial de ATP debería estar afectada. El efecto inhibitorio requiere de la presencia simultánea de la estructura catecólica y de la cadena alifática en la molécula.

Nuestros resultados sugieren que los urushiols, además de su efecto alérgico poderoso contra predadores herbívoros, pueden jugar un papel en prevenir el crecimiento de hongos patógenos y bacterias aeróbicas, como resultado de su potencial actividad microbicida.

Proyectos FONDECYT N° 1-96-510 a ADI y 1-98-066 a JFF

14

RECEPTORES DE CITOQUINAS HEMATOPOIÉTICAS (GM-CSF) EN CELULAS DE LA LINEA GERMINAL MASCULINA. (Hematopoietic cytokine receptors (GM-CSF) on male germinal cells). **Noli, C., Zanbrano, A. y Concha, I.** Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Nuestro grupo ha estudiado el transporte de hexosas y vitamina C al interior del espermatozoide vía los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), y dada la importancia de estos sustratos en la maduración del espermatozoide, nos planteamos la posibilidad de encontrar una vía fisiológica que permita aumentar el transporte de hexosas y vitamina C en estas células. Se ha descrito que algunos factores de crecimiento unidos a sus receptores específicos aumentan la captación de glucosa, entre otras diversas funciones. De éstos, el más estudiado es el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), una citoquina pleiotrópica involucrada en la proliferación, maduración y funcionalidad de las células hematopoiéticas, que gatilla además un aumento de incorporación de glucosa en neutrófilos, a través de los transportadores GLUTs. Los receptores GM-CSF se expresan también en algunas células no hematopoiéticas. El propósito de este trabajo fue indagar si en los espermatozoides y testículo se expresaba el receptor GM-CSF y estudiar el efecto del factor en la captación de glucosa. Por medio de inmunolocalización identificamos en espermatozoides de toro y humanos las subunidades α y β del receptor GM-CSF. Mediante inmunodetección se comprobó la presencia de proteínas en el rango de peso molecular esperado para ambas subunidades. Finalmente se estudió el efecto del GM-CSF en la captación de glucosa en espermatozoides de toro, demostrándose un aumento en la incorporación del azúcar. (PROYECTO FONDECYT 196-0485)

16

LIGANDO ENDÓGENO DE PROTEOGLICANES DE HEPARÁN SULFATO (p33/30) ES UN BUEN SUSTRATO DE ADHESIÓN PARA CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS. (Endogenous ligand for heparan sulfate proteoglycans (p33/30) is a good adhesion substrate for skeletal muscle cells). **Herrnig, J.P.** Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Los proteoglicanos de heparán sulfato (PGHSs) son componentes principales de la matriz extracelular (MEC). Ellos participan en diversas funciones celulares como adhesión, crecimiento y diferenciación a través de su interacción con distintas proteínas y/o factores. En este sentido, la línea de células satélite de músculo esquelético C₂C₁₂ es un excelente modelo para estudiar la función de los PGHSs. En la búsqueda de nuevos ligandos de PGHSs que den cuenta de su función, hemos descrito anteriormente un doblete de 33 y 30 kDa (p33/30) que presenta afinidad por ¹²⁵I-heparina. De manera interesante, el componente de 33 kDa aumenta 6 a 7 veces durante la diferenciación terminal, sugiriendo un rol en este proceso. Por otra parte, ensayos de unión e inmunodetección han permitido sugerir que p33/30 se une a glicopán, un PGHS presente tanto en la membrana plasmática como en la MEC. El objetivo de este trabajo es estudiar la posible función de p33/30. Utilizando columnas de heparina-agarosa hemos obtenido una fracción altamente enriquecida en p33/30, la cual eluye a concentraciones entre 0,55 y 0,75 M NaCl. Ensayos de adhesión de células C₂C₁₂ a placas de cultivo recubiertas con nitrocelulosa y distintas proteínas de MEC demostraron que la fracción enriquecida en p33/30 es capaz de promover fuertemente tanto la adhesión como la proliferación de las células musculares. Por otra parte, experimentos de cuantificación de la adhesión de células C₂C₁₂ premarcadas con ¹²⁵I-metilcolina demostraron que la fracción de p33/30 es un buen sustrato de adhesión, comparable a moléculas de MEC clásicamente descritas. Ensayos de competencia usando heparina permiten sugerir que la participación de p33/30 en la adhesión de células C₂C₁₂ depende de la interacción de este posible ligando con PGHSs presentes en la membrana plasmática.

Financiamiento: FONDECYT 1960634 a Dr. E. Brandan y 2980049 a JPH. EB, Cátedra Presidencial en Ciencias, JPH, becario CONICYT.

PROBABLE PARTICIPACION DE LA FIBRA DE REISSNER EN LA DEPURACION DE NEUROPEPTIDOS DESDE EL LCR. (Probable participation of the Reissner's fiber in the clearance of neuropeptides from the CSF). Hein, S., Caprile, T. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

La mayor parte de las glicoproteínas secretadas por el órgano subcomisural, luego de ser secretadas al líquido cefalorraquídeo (LCR) del III ventrículo cerebral, se agregan para formar la Fibra de Reissner (FR). Esta estructura crece continuamente por adición de nuevas moléculas a su extremo cefálico y progresa a lo largo del canal central de la médula espinal alcanzando la ampolla caudal del filum terminal, en donde estos compuestos se modifican y probablemente se degradan. Considerando: 1) la presencia de gran cantidad de neuropéptidos y neurotransmisores en el LCR, 2) evidencias de unión de neurotransmisores a la FR y 3) la existencia de secuencias repetidas con capacidad de unir proteínas en una de las glicoproteínas de la FR, se ha postulado la hipótesis que la FR une neuropéptidos y los transporta hasta la ampolla caudal, donde accederían a la circulación sistémica. De este modo, la FR participaría en la depuración de neuropéptidos desde el LCR. Con el objeto de investigar esta posibilidad, se inició una serie de experimentos de unión de neuropéptidos a la FR. Fragmentos de FR fresca fueron incubados *in vitro*, durante 24 hrs., con diferentes concentraciones de neuropéptidos; luego, los fragmentos fueron lavados, incubados con glutaraldehído y procesados para tinción inmunohistoquímica para detectar los neuropéptidos con anticuerpos específicos. Los resultados sugieren unión de oxitocina y neurofina a los fragmentos de FR. Experimentos similares de unión a FR, usando neuropéptidos radiactivos, están en marcha.

FONDECYT E.M. Rodríguez 197-0627.

COMPLEMENTACION DE MOVIMIENTO DEL VIRUS MOSAICO DEL TABACO MUTANTE EN LA PROTEINA DE 30 kDa EN PLANTAS TRANSGENICAS DE TABACO. (Spread complementation of tobacco mosaic virus mutant in the 30 kDa protein in transgenic tobacco plants). Arce-Johnson, P., Diaz, F., Medina, C., Huanca, W., y Delgado, J. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Diversos virus codifican para proteínas de movimientos las que les permiten desplazarse de una célula a otra a través de los plasmodesmos. El virus mosaico del tabaco (TMV) codifica para una proteína de 30 kDa que es responsable del movimiento del virus en las plantas que infecta. Nosotros hemos producido plantas transgénicas de tabaco Xanthi nn (sensibles al TMV), y Xanthi NN (resistentes al TMV), con el gen de la PM del TMV-Cg, una cepa de TMV que infecta plantas de crucíferas y también de tabaco. Las plantas transgénicas obtenidas fueron caracterizadas para detectar la presencia del transgén, y estudiar su capacidad de complementar virus mutantes carentes de la PM (TMVΔPM). Encontramos que los tabacos PMCg complementaron al TMVCgΔPM en su movimiento de célula a célula desarrollando lesiones locales. Sin embargo, no conseguimos complementar el movimiento de este virus a larga distancia a través del tejido vascular. Al evaluar en las plantas de tabaco PMCg la cepa común del TMV en su versión mutada para la PM (TMVU1ΔPM), obtuvimos similares resultados. Cuando utilizamos plantas transgénicas de tabaco para la PMU1, conseguimos complementación local y sistémica con diferente eficiencia, en ambos virus mutantes para la PM.

Financiamiento: FONDECYT 1971228 y FONDECYT 8980005

PEROXIDASA Y APO A-I INTERACCIONAN POR DISTINTOS MECANISMOS CON LA MEMBRANA DE RIBETE EN CEPILLO DEL INTESTINO DE *C. carpio*.

(Peroxidase and apo A-I interact by different mechanism with *C. carpio* intestinal brush border membrane). Villanueva, J. y Amthauer, R. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

En peces, la internalización de proteínas intactas a través del epitelio intestinal es un proceso especialmente activo. Se ha demostrado que una gran variedad de proteínas logra atravesar en forma intacta el epitelio intestinal, por una ruta transcelular, postulándose que existirían sitios de unión en la membrana de ribete en cepillo (BBM), que mediarían dicho proceso. En concordancia con esta hipótesis, nuestro grupo ha demostrado que peroxidasa (HRP) e IgG, se unen específicamente y en forma saturable a preparaciones de BBM aisladas del intestino de carpa. Otra proteína trazadora de internalización que nos ha interesado estudiar por su especial relevancia fisiológica, lo constituye la apolipoproteína A-I (apo A-I) de carpa. Trabajos anteriores demuestran que esta proteína no es sintetizada en el intestino de la carpa, pero por inmunohistoquímica se detecta en forma abundante en la membrana apical de los enterocitos. Por otra parte, apo A-I o HDL administrada oralmente es internalizada y aparece intacta en HDL circulante. Recientemente hemos demostrado que la unión de apo A-I a BBM no es saturable ni específica. Por "Western blot" se demostró, que la fracción de BBM contiene apo A-I. De ésta proteína, sólo el 50 %, es solubilizada por lavado de las BBM con tampón carbonato pH 11. El mismo resultado se obtuvo con la fracción de ¹²⁵I-apo A-I unida a BBM en un ensayo *in vitro*. Estos resultados en conjunto con el carácter anfipático de apo A-I sugieren que ésta podría interactuar con la bicapa lipídica. De esta forma apo A-I presentaría un mecanismo de internalización distinto al descrito para peroxidasa y otras proteínas.

Financiado por Fondecyt 1980993, DID-UACH S-95-23

TGF-β1 MODULA LA PRODUCCION DE UROQUINASA A TRAVES DE LA RUTA MAP KINASA. (TGF-β1 modulates urokinase production through MAP kinase pathway).

Santibañez J.F., Quintanilla M. Laboratorio de Biología Celular e Inmunología INTA, Universidad de Chile e Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, España.

En estudios anteriores hemos demostrado que TGF-β1 provoca un aumento de la malignidad en la línea celular PDV representante de un estadio temprano en la progresión tumoral de la carcinogénesis de piel de ratón. Este efecto se manifiesta en el aumento de la capacidad invasiva de estas células y en un estímulo sobre la producción del Activador del Plasminógeno similar a uroquinasa (u-PA).

En el presente trabajo hemos estudiado la ruta de transducción de señales involucrada en este efecto estimulador sobre la producción de u-PA. Para ello utilizamos tres aproximaciones experimentales que incluyeron el uso de:

- Un dominante negativo de H-Ras
- Un inhibidor específico de MFK 1.2 (PD 098059)
- Un oligonucleótido antisentido para ERK 1.2

Nuestros resultados permiten sugerir que los agentes utilizados inhiben tanto el efecto de TGF-β1 sobre la producción de u-PA como también sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células. Estos hallazgos nos permiten ratificar el papel de TGF-β1 en la expresión del fenotipo maligno. Además sugerimos, que esta función estimuladora se ejerce a través de la ruta de señalización propia de Ras.

Financiamiento: Fondecyt 8970028 y Proyecto de Cooperación Conicyt-CSIC.

21

PRESENCIA DEL RECEPTOR DE MANOSA EN CELULAS DE MICROGLIA DE CEREBRO DE RATA (Presence of the Mannose Receptor in Microglia of Rat Brain). **Marzolo, MP**, Reyes, A., von Bernhardt, R. e Inestrosa N.C. Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El receptor de manosa (ManR) es una glicoproteína de membrana de 165 kDa, marcador de diferenciación celular de la línea monocítica, que incluye a macrófagos y células dendríticas. El ManR endocita y fagocita ligandos manosilados y fucosilados, como los presentes en una variedad de patógenos. El ManR se ha relacionado con el proceso de presentación de antígenos y por lo tanto con el sistema inmune. La microglia constituye aproximadamente el 20 % de la glia total del cerebro, siendo los otros tipos celulares, astrocitos y oligodendrocitos. La microglia equivale a los macrófagos del resto del organismo con los que comparte muchos aspectos funcionales como la capacidad fagocítica y la secreción de citoquinas. Puesto que la microglia en su estado activado o reactivo, expresa moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, cuya función es la de presentar antígenos que entran a la célula por la ruta endocítica, quisimos evaluar si estas células expresan al ManR, clave en los procesos de endocitosis y fagocitosis de la función macrofágica. Se aisló glia de cerebro de rata de 2 días y se cultivó por dos semanas. Las células gliales confluentes se separaron mecánicamente, obteniéndose cultivos primarios de microglia (reconocida por la lectina B4 (*Griffonia simplicifolia*) y de astrocitos (positivos para la proteína glial ácida). El ManR se detectó en microglia y no en astrocitos, por técnicas de western blot, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación. El ManR de microglia es funcional en la endocitosis del ligando peroxidasa de rábano, en un proceso inhibible por manano, ligando reconocido únicamente por este receptor. La expresión de ManR fue incrementada por dexametasona, tal como ocurre en macrófagos. Por técnicas histoquímicas también se encontró al ManR en cerebro de rata adulta, al inducir su expresión por la infusión intracerebral de dexametasona. Esta es la primera descripción del ManR en cerebro de mamíferos y abre un nuevo campo de estudio relacionado con el papel que esta proteína podría tener en diversas funciones que desempeña la microglia, principalmente en estados patológicos del sistema nervioso. Financiado por Fondecyt 1971240 (NI), 2970074 (AR) y Cátedra Presidencial (NI).

22

ESTRÉS OXIDATIVO Y BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN CÉLULAS HeLa CON ELIMINACIÓN SELECTIVA DEL DNA MITOCONDRIAL (Oxidative stress and mitochondrial biogenesis in mtDNA depleted HeLa cells) **MIRANDA, S** y FONCEA R. Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (leighton@genes.bio.puc.cl).

El tratamiento de líneas celulares con bromuro de etidio (BrEt) elimina el DNA mitocondrial (mtDNA) sin afectar el DNA nuclear. Los complejos de la cadena de transporte electrónico que contienen subunidades codificadas por mtDNA dejan de funcionar, sin embargo el complejo II de la cadena, codificado íntegramente por el DNA nuclear, permanece activo, entregando sus electrones a la ubiquinona, también presente en la mitocondria. Nuestra hipótesis de trabajo postula que bajo estas condiciones la célula debe estar sometida a un mayor estrés oxidativo, ya que es a nivel de la ubiquinona que se produce la pérdida de electrones responsable de gran parte de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROS).

Al tratar células HeLa con 5-10 ng/ml de BrEt por más de 70 generaciones, encontramos una eliminación parcial del mtDNA, determinado por Southern Blot. Bajo estas condiciones, se encontró una clara activación del factor de transcripción NFκB determinado por inmunocitoquímica. La activación de NFκB es inhibida al tratar las células con el antioxidante BHT (25 μM), mostrando que en nuestro sistema NFκB se activa en respuesta a EROS. También se encontró, en forma preliminar, determinada por RT-PCR semi-cuantitativo, una disminución de los transcritos para los factores de transcripción que regulan la biogénesis mitocondrial: mtTFA y NRF-1.

En conjunto los resultados muestran, en forma concordante con nuestra hipótesis, que la pérdida de mtDNA produce un aumento de EROS y sugieren que bajo estas condiciones el núcleo regula la biogénesis mitocondrial en forma negativa.

(Financiamiento: Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, PUC-PBMEC'98)

22

EVIDENCIA DE UN TRANSPORTADOR DE FRUCTOSA EN *Deschampsia antarctica* DESV. BAJO CONDICIONES DE ACLIMATACION AL FRIO. (Evidence of a fructose transporters in *Deschampsia antarctica* Desv. under cold acclimation conditions). **Triviño C**, **Leñam I**, **Fernández M**, **Alberdi M**. Institutos de Bioquímica y Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. (Patrocinio: Dr. R. Amthauer).

En *Deschampsia antarctica*, única planta vascular que ha colonizado la Antártida, se postula que debería poseer mecanismos (fisiológicos, bioquímicos y/o moleculares) que le permitan sobrevivir en este ambiente tan inhóspito. Se estudia la capacidad de aclimatación (aumento de resistencia=TL₅₀, temperatura letal a un 50% de daño tisular) y su asociación con aminoácidos, proteínas totales y RNA. Debido a que esta especie sintetiza cantidades muy altas de fructanos y sacarosa se estudia la posible participación del transportador facilitativo de fructosa GLUT5, homólogo a los encontrados en mamíferos.

D. antarctica presentó capacidad de aclimatación, descendiendo su TL₅₀ semana desde -11 a -21°C a la 3ª semana. Simultáneamente ascendieron los niveles de prolina, fructanos, RNA y algunas proteínas con carácter crioprotector. Además, se inmunodetectó y localizó, utilizando un anticuerpo antipeptido dirigido contra la región carboxilo terminal de la proteína transportadora de fructosa en humanos (GLUT5), dos bandas de masa molecular aproximada de 57 y 52 kDa, localizadas en la membrana plasmática, envoltura cloroplástica y tonoplasto de protoplastos (células aisladas, sin pared) y a nivel del sistema membranoso, en cortes transversales de hojas. Se detectó el mRNA de esta proteína, mediante "Northern-blot", evidenciando una señal autorradiográfica alrededor de los 2,5 kb, y mediante RT-PCR, dos productos de amplificación, uno de 468 pb y el otro de 200 pb, siendo el primero igual al detectado en humanos. De esta forma se evidencia la presencia de la proteína transportadora de fructosa GLUT5 en *D. antarctica*, siendo la primera evidencia en hojas. Los resultados se complementan con la identificación de este gen.

(PROYECTOS FONDECYT 1960485 y 1970637).

24

FIBRAS AMILOIDES INDUCEN LA ACTIVACION DE LA QUINASA cdk-5 EN CELULAS DE HIPOCAMPO EN CULTIVO (Amyloid fibrils induce cdk-5 Kinase activation in hippocampal cell culture). **Toro, R**, **Alvarez, A**. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Patrocinio Dr. Maccioni, R.B.

Los ovillos neurofibrilares (ONF) son un signo neuropatológico determinante en la enfermedad de Alzheimer (EA). Sin embargo, se desconocen los eventos moleculares que llevan a la modificación de la proteína tau y a la generación de PHFs en esta enfermedad. Se sabe que la formación de los depósitos de amiloide es el proceso que inicia y promueve la neurodegeneración. En este contexto es de gran interés analizar la conexión entre la formación de depósitos amiloides extracelulares del péptido β-amiloide y la hiperfosforilación de la proteína tau intracelular, intentando identificar la quinasa responsable del cambio en el estado de fosforilación de tau. Hemos tratado cultivos primarios de células de hipocampo de embriones de ratas de 18 días con fibras de amiloide (5 a 20 μM), observándose muerte neuronal al cabo de 3 a 4 días de incubación. La proteína tau presente en las células tratadas con las fibras amiloides presenta alteraciones en su movilidad electroforética, probablemente debido a hiperfosforilación de ésta. Además, hemos observado mediante inmunoprecipitación y ensayos de fosforilación de tau de cerebro de bovino con [³²P-ATP], que la actividad quinasa de cdk-5 se encuentra aumentada en las células hipocámpales tratadas con fibras de amiloide. Este resultado sugiere la participación de la proteína quinasa cdk-5 en fenómenos de fosforilación asociados a patologías como la enfermedad de Alzheimer (Financiado por Cátedra Presidencial en Ciencia y Fondecyt 3980039).

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES ANTIOXIDANTE E HIPOGLICEMIANTE DE EXTRACTOS FLAVÓNICOS DE *BAUHINIA CANDICANS* EN RATAS DIABÉTICAS. (Antioxidant and Hypoglycemic properties of *Bauhinia candicans* flavonic extract on diabetic rats). G. Tapia*, A. Astuya*, S. Eraso*, W. Peña*, I. Gonzalez*. Fac. de Cs. Depto. Química y Bioquímica Universidad Valparaíso y *Fac. de Cs. Básicas y Mat. Instituto Químico. U. Católica de Valparaíso (Patrocinio: G. Gonzalez).

Se ha descrito que los radicales libres, también, estarían implicados en la diabetes mellitus. En algunos países como Chile, la medicina popular utiliza la especie *Bauhinia candicans* (Pata de vaca) por sus propiedades antidiabéticas. En trabajos preliminares se ha informado la presencia en los extractos flavónicos de esta especie de: quercetina-3-ramnósido, camferol-3-ramnoglucosido y camferol-3-ramno-galactósido, los que podrían presentar acción antioxidante y posiblemente hipoglicemiantes.

En el presente trabajo se emplearon ratas macho *Sprague Dowley* normales y diabéticas inducidas con estreptozotocina, vía oral. Se cuantificó glucosa en plasma y actividades catalasa y superóxido dismutasa en plasma e hígado tanto de ratas normales como diabéticas tratadas con glibenclamida y extractos flavónicos, ambos administrados vía oral y evaluados Tiempo 0, 1, 2 y 3 hrs. (N=6). Se observó en las ratas normales y diabéticas sometidas a los extractos flavónicos, una leve disminución en glicemia con respecto a las actividades enzimáticas se observa tanto en ratas normales como diabéticas una disminución en catalasa y superóxido dismutasa en presencia de flavonoides, en cambio la glibenclamida produce un incremento en estas enzimas. Estos resultados preliminares ponen en evidencia que mientras la glibenclamida favorecen el estrés oxidativo (reflejado por un aumento de las actividades enzimáticas estudiadas), los flavonoides estarían reduciéndolo. Debido a los resultados con glibenclamida no fueron los esperados no es posible aún concluir respecto a las propiedades hipoglicemiantes de esta mezcla de flavonoides.

(Proyecto DIUV 29/96-98)

FACTORES QUE MODULAN LA OXIDACIÓN MICROSOMAL Y PEROXISOMAL DE ÁCIDOS GRASOS EN HIGADO DE RATA. (Factors that modulate the microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in rat liver). Orellana, B.M., Rodrigo, R., Thielemann, L. y Valdés, E., ICBM, Programa de Farmacología, Fac. de Medicina, U. de Chile.

El citocromo P-450 microsomal participa en la oxidación de ácidos grasos. En el ayuno y el tratamiento con etanol se induce el citocromo P450 2E1, el que junto con isoenzimas P450 de la familia 4A, participa en la hidroxilación de ácidos grasos. En el ayuno se produce un aumento de la gluconeogénesis y del catabolismo de lípidos con el consecuente aumento de la formación de cuerpos cetónicos. En este trabajo se estudió el efecto del ayuno, tratamiento con etanol y acetona sobre la oxidación microsomal y peroxisomal de ácidos grasos. Se estudió el efecto de estos factores sobre el contenido de citocromo P-450, el metabolismo microsomal de ácido láurico, conjuntamente con la β -oxidación peroxisomal de Palmitoil CoA y la actividad catalasa. Los tres factores estudiados, el ayuno, tratamiento con etanol y con acetona, aumentan la oxidación microsomal y peroxisomal de ácidos grasos. Además se encontró una alta correlación entre ambos procesos.

Se concluye que el aumento de cuerpos cetónicos, factor común producido en el ayuno y cuando los niveles de etanol plasmáticos son altos, sería el causante del incremento de la oxidación microsomal y peroxisomal de ácidos grasos. Además la alta correlación entre la oxidación microsomal y peroxisomal, apoyaría la hipótesis de que ambos procesos estarían interrelacionados entre sí.

Financiado por Fondecyt 1950699

EFFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE LA OXIDACION DE PROTEINAS (OP) HEPATICAS EN RELACION A LA LIPOPEROXIDACION (LP) EN RATAS (Effect of hyperthyroidism on the oxidation of hepatic proteins, in relation to lipid peroxidation in the rat). Cornejo, P., Tapia, G., Fernández, V. y Videla, L.A. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: L.A. Videla).

La calorificación tiroidea (CT) en ratas, inducida por la administración de 3,3', 5 triiodotironina (T_3) produce un aumento en el consumo basal de O_2 (QO_2) e induce un estado de estrés oxidativo hepático. Este efecto prooxidativo podría conducir a daño oxidativo tanto a proteínas como a lípidos de membranas.

En este trabajo se evalúa el efecto de dosis diarias (1 a 3 días) i.p. de T_3 (0,1 mg/kg de peso) en relación con la OP, la LP y a la CT en hígado de ratas. 24 horas después de la última inyección los niveles séricos de T_3 (RIA), el QO_2 hepático y la temperatura rectal aumentaron significativamente, en paralelo con un incremento en la OP (producción de grupos carbonilos) y en la LP (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS).

Los efectos sobre la LP y la OP hepáticas, presentan un máximo al segundo y tercer día de tratamiento, respectivamente. Se concluye que la administración de T_3 aumenta tanto la OP como la LP hepáticas, ambos condicionados por el estrés oxidativo hepático inducido por la CT.

FONDECYT 1970300.

PRODUCCION DEL COMPLEJO XILANOLITICO DE ASPERGILLUS CERVINUS A DISTINTAS TEMPERATURAS (Production of Xylanolytic Complex from *A. cervinus* at different temperatures). Curotto, E., Aguirre, C. y Carrasco, I. Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso (Patrocinio: Cecilia Rojas G.).

La utilización de enzimas xilanolíticas en el proceso de preblanqueamiento de pulpas de celulosa, facilita la extracción de lignina, rebaja el uso de compuesto de cloro, mejora las propiedades físicas de la pulpa y disminuye los halógenos orgánicos adsorbibles liberados en los efluentes. Como los procesos de preblanqueamiento se realizan a temperaturas de 50-55°C, la estabilidad de la enzima β -xilanasas es importante. La cepa *A. cervinus* produce el complejo xilanolítico y ha sido utilizado con éxito en el preblanqueamiento de pulpa de celulosa Kraft de *Pinus Radiata*. El objetivo de este trabajo es producir el complejo xilanolítico (β -xilanasas, β -xilosidasas, β -glucosidasas, β -mannanasas, α -L-arabinofuranosidasas, feruloilsterasas) de *A. cervinus*, a diferentes temperaturas evaluando su actividad y estabilidad en función del tiempo de algunas de las enzimas producidas.

La cepa *A. cervinus* fue cultivada en medio sólido a diferentes temperaturas (28-45°C), con xilano de avena como fuente de carbono, en un medio Vogel modificado. Las actividades enzimáticas fueron evaluadas específicamente para cada enzima del complejo. Los resultados indican que a 30°C, no hay diferencias significativas con los controles realizados a 28°C. La producción a 35°C, muestra actividad β -xilanasas, β -xilosidasas y β -glucosidasas. Las otras enzimas no fueron detectadas. La producción a 40°C sólo detectó actividad β -xilanasas. Según estos resultados se evaluaron las constantes de inestabilidad, a diferentes temperaturas, encontrándose que la constante de inestabilidad a 40°C es de $1.45 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$, con una vida media de $480 \pm 22 \text{ min}$ (cultivo a 28°C). Las constantes de inestabilidad determinadas 50°C de los cultivos realizados 28, 30 y 35°C, muestran que a mayor temperatura de producción la constante de inestabilidad disminuye entre valores 0.183-0.025 min^{-1} y aumentando la vida media desde 3.8-28 min. Estos son resultados promisorios si se aplican estos sistemas en el preblanqueamiento de pulpas de celulosa.

29

CAMBIOS EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEOGLICANES DE MUSCULO ESQUELETICO EN EL RATON MDX. (Changes in expression levels of proteoglycans in mdx mouse skeletal muscle).

Cáceres, S. y Brandan, E.

Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Distrofina es una proteína citoplásmica presente en el tejido muscular, que participa en el anclaje de las fibras musculares a la matriz extracelular. Su ausencia determina en humanos una distrofia muscular severa (Distrofia Muscular de Duchenne), en que las fibras musculares carentes de soporte funcional degeneran progresiva e irreversiblemente. Mutaciones análogas en ratón generan un fenotipo distrofo: el ratón *mdx* muestra una exótica regeneración del tejido muscular, que compensa el defecto primario y le permite desarrollarse normalmente. Se desconoce la naturaleza del mecanismo compensatorio, así como los factores que lo modulan.

Basados en evidencia de nuestro laboratorio que sugiere la participación de proteoglicanos (PGs) en fenómenos de crecimiento y diferenciación muscular, decidimos estudiar su expresión en el ratón *mdx*. Nuestra hipótesis es que cambios en sus niveles de expresión estarían asociados con el mecanismo compensatorio y/o con el proceso regenerativo.

Para evaluar cambios a nivel de mRNA utilizamos RT-PCR semicuantitativo. Determinamos el número de ciclos de amplificación en que el proceso se mantiene lineal analizando la cinética de cada reacción particular con precursores radiactivos. Establecimos el mRNA de tubulina como estándar interno para normalizar los datos, luego de demostrar que sus niveles permanecen constantes en la diferenciación muscular. Así, determinamos que el mRNA del PG glicán está significativamente disminuido en el ratón *mdx*. Esta disminución es temprana, incluso anterior a las manifestaciones histológicas de regeneración.

Concluimos que la regeneración en *mdx* es acompañada por cambios a nivel de mRNA de PGs, lo que sugiere la regulación transcripcional de la expresión de estas moléculas. Actualmente estamos estudiando la correlación funcional de las diferencias observadas. La gran ventaja de la técnica implementada es su mayor sensibilidad respecto a técnicas clásicas de detección de mRNA; ello nos hace plantear como proyectarse su aplicación, con fines diagnósticos o predictivos en la patología muscular.

Financiado por FONDECYT 1960834, EB, Cátedra Presidencial en Ciencias.

31

AXONES DE RATONES WLD^S, QUE NO REGENERAN, LO HACEN CUANDO SE BLOQUEA LA TRANSCRIPCIÓN EN EL CABO DISTAL. (Axons of *Wld^S* mice, which do not regenerate, do so when transcription is inhibited in the distal stump).
E. Benavides y J. Alvarez. Facultad de Ciencias Biológicas y Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

Hemos propuesto que la célula de Schwann diferenciada reprime el crecimiento axonal. Los ratones *Wld^S* tienen una mutación que determina que las fibras nerviosas seccionadas no degeneren ni regeneren por varias semanas. Hemos usado esta cepa para probar nuestra hipótesis, asumiendo que el axón de esta cepa puede crecer pero que la célula de Schwann del cabo distal lo impide por seguir diferenciada. El diseño experimental consiste en destruir selectivamente las células residentes del cabo distal mediante actinomicina D (ActD), un inhibidor de transcripción, inyectada localmente dos días antes de la atrición del nervio. La regeneración se evaluó con el 'pinch test', microscopia electrónica y el colorante Dil.

Los nervios normales inyectados con vehículo o con ActD y atricionados crecieron 5mm en tres días, valor comparable al que siguió a una lesión simple. Los axones *Wld^S* crecieron 0.3 mm, lo que confirma que no crecen espontáneamente, pero cuando fueron tratados con ActD crecieron 3.0. Como control, la lesión se hizo distal al segmento tratado con ActD, para que el extremo del axon *Wld^S* quedara en tejido no tratado; esto abolió el efecto de la ActD. La microscopia electrónica mostró brotes sólo en el nervio *Wld^S* tratado con ActD, y el colorante Dil tiñó los axones regenerados. Nuestros resultados son consistentes con la existencia en los axones de un programa para brotar que está reprimido por células residentes, probablemente la célula de Schwann.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 1980973.

30

REGULACION DE LA RUTA ENDOCITICA DEL EGF-R EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA N2A. (Regulation of the EGF-R endocytic route in N2A cells).
SALAZAR, G. Dpto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: M.P. Marzolo).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) es regulado en la superficie celular a través de mecanismos que involucran la endocitosis inducida por ligando y la activación de su dominio tirosina quinasa. En la mayoría de los sistemas celulares el receptor endocitado es destinado al compartimento lisosomal donde se degrada rápidamente. Esta degradación es importante como mecanismo de atenuación de la señal del EGF. No se sabe si esta ruta pudiera ser regulada, al menos en algunos tipos celulares. Debido a que hemos detectado reciclaje, en vez de degradación, del R-EGF en sinaptosomas, nos pareció interesante indagar en posibles sistemas de regulación en células neuronales. En este trabajo observamos evidencias de una regulación a este nivel que involucra al sistema AMPc y la proteína quinasa A. Como modelo utilizamos células N2A transfectadas con el cDNA del EGF-R humano, logrando que expresen sitios de alta y baja afinidad para el EGF, tal como hemos descrito en sinaptosomas. Observamos que el H89, un inhibidor de la PKA, provocó desaparición de los sitios de alta afinidad con disminución del 50% en el número de sitios de baja afinidad, acompañándose de una disminución en la masa de receptores en la superficie celular, determinada por ensayos de biotilación. Esto indica que el H89 afectó la internalización basal, independiente de EGF, de los R-EGF. Además, el H89 indujo acumulación intracelular de los receptores endocitados luego de incubación con EGF, e inhibición de su degradación en lisosomas. Estos resultados sugieren que alguna proteína sustrato de la PKA podría estar involucrada en la regulación del tráfico intracelular del R-EGF. Este tipo de regulación no ha sido descrita en ningún sistema celular hasta el momento. (Financiado por los proyectos Fondecyt 2970069 y 1980974).

32

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA Y DE LA REGIÓN DE UNIÓN A MICROTUBULOS DE LA PROTEÍNA DMAP-85 DE *D. melanogaster*. (Analysis of the primary sequence and microtubule-binding site of DMAP-85 from *D. melanogaster*).
Cambazo, V.¹, Sunkel C.² y Maccioni, R.B.³. ¹Lab. Biol. Cel. INTA, Univ. Chile; ²Lab. Biol. Cel. y Mol. Fac. Cs. Univ. Chile; ³Inst. de Biol. Mol. y Cel. Univ. Porto.

Todas las células de los eucariotes poseen un citoesqueleto microtubular que participa en una amplia variedad de funciones celulares. Los cambios de organización intracelular de los microtúbulos (MTs), y su dinámica están regulados por un conjunto de señales moleculares, entre las cuales se destacan las interacciones proteína-proteína entre la tubulina y las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Hemos aislado una nueva MAP de *D. melanogaster*, a la cual denominamos DMAP-85. Esta proteína tiene la capacidad de modular el proceso de ensamblaje de MTs, a través de su interacción con dominios discretos del extremo C-terminal de la tubulina. Con el propósito de caracterizar dominios estructurales y funcionales de DMAP-85, se aislaron y secuenciaron clones de cDNA que codifican para esta proteína. Los resultados indican que la secuencia aminoácida inferida para DMAP-85, corresponde a un polipéptido de 740 aminoácidos, con un peso molecular de 83.4 kDa. DMAP-85 es una proteína hidrofílica con un pI estimado de 10,1 y sobre la base de su distribución de cargas puede ser dividida en: un dominio N-terminal ácido y un dominio C-terminal básico. Utilizando proteínas recombinantes truncadas fue posible definir una región de carácter básico de 272 residuos, la cual es necesaria para la interacción de DMAP-85 con MTs. La secuencia aminoácida de este dominio no comparte similitud con otras regiones de unión a MTs, previamente descritas. La identificación de numerosos sitios de fosforilación en el dominio de unión a MTs y la observación de que DMAP-85 es fosforilada *in vitro*, sugieren un posible mecanismo de regulación de su interacción con el sistema tubulina/MTs. (Financiado por: Beca Fundación Andes, PG-013 y Fondecyt 1980262 a V.C. y Cátedra Presidencial en Ciencias a R.B.M.).

Decorina : Proteoglicán de Matriz Extracelular, Modularia la Diferenciación de Músculo Esquelético (Decorin: Extracellular Matrix Proteoglycan that Modulates Skeletal Muscle Differentiation) **C. Riquelme**

Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D. Santiago.

El proceso de diferenciación de músculo esquelético está controlado por mecanismos represivos ejercidos por factores de crecimiento tales como bFGF, IGF- β y HGF/SF. La depleción de estos factores desde el cultivo de mioblastos, induce la expresión de miogenina, un gen maestro que controla la expresión de genes músculo específicos. Los mecanismos moleculares que controlan el proceso de diferenciación, se desconocen.

En nuestro laboratorio hemos observado que en cultivo de mioblastos se requiere la presencia de proteoglicanos para un proceso de diferenciación normal, y su expresión es regulada durante él. Decorina es uno de los principales proteoglicanos de matriz extracelular de naturaleza condroitin/dermatán sulfato y su expresión es regulada positivamente durante la diferenciación. Se ha demostrado que decorina es un proteoglicán capaz de interactuar con moléculas solubles e insolubles de matriz como TGF β , fibronectina y colágeno. Para evaluar el papel de decorina en la diferenciación de músculo esquelético, hemos transfectado en forma estable mioblastos con el ADNc sin sentido para decorina.

Mioblastos que no expresan decorina, proliferan en suero fetal bovino a una velocidad menor que los mioblastos control. Sorprendentemente, en estas condiciones los clones transfectantes muestran una expresión constitutiva de miogenina, pero no hay una expresión de marcadores tardíos, específicos de músculo esquelético como creatina quinasa. Estos clones transfectantes responden a TGF- β , al igual que las células control, mostrando una inhibición de la diferenciación evaluada por la ausencia de miogenina y un aumento de la proliferación en medio con bajo porcentaje de suero. Otra característica de los clones que no expresan decorina, es que producen una matriz extracelular desorganizada, lo que se evaluó por la ausencia de perlecan.

Estos resultados nos sugieren que decorina podría estar modulando la diferenciación de células de músculo esquelético. Financiamiento: Fondecyt 2980053, 1960634 y Cátedra Presidencial en Ciencias a E. Brandán. CR, es becario CONICYT.

IDENTIFICACIÓN DE UNIONES EN HENDIDURA FUNCIONALES Y CONEXINA 43 EN EL ÓRGANO SUBCOMISURAL DE BOVINO (Identification of gap junctional communication and connexin-43 in bovine subcommissural organ). **González C.¹, Garcés G.², Sáez J.C.², Rodríguez E.M.¹** Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile (1), Departamento de Cs Fisiológicas, Facultad de Cs. Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago (2).

El órgano subcomisural (OSC) es una glándula cerebral altamente especializada en la secreción de glicoproteínas. Es una estructura muy conservada filogenéticamente y de función aún desconocida. Aunque cada célula del OSC recibe una inervación serotoninérgica inhibitoria, la inervación GABAérgica y peptidérgica (oxitocina, vasopresina, somatoestatina) no es uno es a uno. Sin embargo, es posible que los estímulos mediados por GABA y péptidos sean detectados por las células que se encuentran distantes de los terminales nerviosos, mediante señales intracelulares que se propagan a través de uniones en hendidura (UH), especializaciones de la membrana plasmática constituidas por canales intercelulares que permiten que las células unidas sincronicen sus respuestas metabólicas y/o eléctricas. Utilizamos OSC recién aislado de bovino y de explantes de OSC mantenidos en cultivo. La comunicación intercelular mediada por UH se determinó mediante la técnica de acoplamiento a colorantes (amarillo de Lucifer). Además se determinó la presencia de conexina 43 (Cx-43), subunidad proteica de algunas UH, tanto por análisis de western blot como por inmunocitoquímica. El acoplamiento a amarillo de Lucifer detectado en explantes fue limitado a 2 ó 3 células vecinas, pero el OSC recién aislado, el colorante frecuentemente difundió a más de 5 células. La Cx-43 en contactos de células secretoras y los niveles detectados en OSC recién aislado fueron más elevados que los detectados en los explantes. Estos resultados sugieren que el cultivo carece de estímulos que inducen la expresión de UH y que en el OSC la comunicación intercelular, mediada por UH, podría participar coordinando respuestas celulares inducidas por actividades neuronales (GABAérgicas y/o peptidérgicas). (FONDECYT 197-0627, EMR y FONDECYT 196-00559, JCS).

PRESENCIA DEL RNA MENSAJERO Y PÉPTIDO β_2 -MICROGLOBULINA EN ESPERMATOZOIDES Y TESTÍCULOS DE RATA Y RATÓN. (Presence of β_2 -m mRNA and peptide in mouse and rat sperm and testis). **Lisperguer, A., Brito, M., Burzio, L. O.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

β_2 -microglobulina (β_2 -m) es un polipéptido que se encuentra en la superficie de la mayoría de las células de mamíferos. Se ha informado de la presencia de la variante paterna de esta molécula en embriones en estadios tan tempranos del desarrollo, como al estado de dos células, lo que fue atribuido a genoma embrionario activado. Sin embargo, si se toma en cuenta el hallazgo de una gran variedad de RNAs en el núcleo de espermatozoides, cuya función o funciones no han sido determinadas, se puede pretender alternativamente, que se trata, en realidad, de la expresión del mRNA paterno aportado por el espermatozoide al embrión. Por ello, se estudió la presencia del RNA mensajero de β_2 -m en espermatozoides y en testículos de rata de diferentes edades, mediante la técnica de RT-PCR, además de su localización por hibridación *in situ*, por otro lado, se determinó si el péptido era expresado en espermatozoides y en testículo.

La reacción de RT-PCR con RNAs totales tanto de espermatozoides, como de testículos de rata de 5, 10, 15, 20 días y maduros dió productos de amplificación de 240 pb, lo que corresponde a lo esperado. Los mRNAs fueron localizados mediante hibridación *in situ* en núcleos de espermatozoides, y en testículos de rata y ratón de 10 y 25 días a lo largo de toda la línea germinal. Asimismo, se localizó β_2 -m por inmunocitoquímica, utilizando el anticuerpo antipéptido humano, en las membranas citoplasmáticas y citoplasma de las células espermatozooides en testículo de rata y ratón de 10 y 25 días de edad.

El hallazgo del mRNA de β_2 -m en espermatozoides apoya la hipótesis de que existiría aporte extragenómico del gameto masculino al embrión; mientras que la presencia del péptido podría jugar algún papel en el proceso de fecundación.

(PROYECTOS FONDECYT 1960492 y 1960485).

NIVELES DE Na,K-ATPasa Y EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNA KINASA C (PKC) EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS CONTROLES Y UREMICAS ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y FOSFORILACIÓN (Na,K-ATPase levels and PKC activation affects in skeletal muscles of control and uremic rat. Activity and phosphorylation studies). **Gómez, C., Michea, L., Boffi, P. y Alvo, M.** Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Durante la insuficiencia renal crónica se observan efectos tejidos diferenciales sobre la actividad de la bomba de sodio que podrían involucrar la participación de mecanismos de segundos mensajeros. El objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el rol de la PKC en la regulación de la actividad de la Na,K-ATPasa muscular. La actividad de la bomba se encontró deprimida en el músculo urémico ($p < 0.05$), el PDHu activador específico de PKC, inhibió la captación, tanto en músculos controles como urémicos, sin diferencia significativa entre ellos (48: 5% y 45: 8%) con un efecto dirigido hacia la isoforma $\alpha 2$ en ambos casos. La fosforilación de proteínas fue evaluada incubando músculos solos con P^{32} . La autoradiografía reveló múltiples bandas entre 20 y 120 Kda y un mayor grado de fosforilación basal en músculo control que en urémico. El PDHu incrementó significativamente la fosforilación solo en el músculo urémico (40: 12.2%). Al inmunoprecipitar la isoforma $\alpha 2$ se observó un aumento de 6 veces en el grado de fosforilación para el caso del músculo urémico contra 3 veces en los controles. Por otro lado experimentos de western blot no demostraron diferencias significativas de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ entre las preparaciones controles y urémicas.

Los resultados muestran que la menor actividad de la Na,K-ATPasa encontrada en músculos urémicos no se debe a una menor cantidad de la bomba en las membranas, que la activación de PKC disminuye la actividad de la isoforma $\alpha 2$ en similar extensión, tanto en músculo control como urémico pese a los niveles menores de fosforilación basal encontrados en los músculos urémicos, esto sugiere mecanismos adicionales involucrados en la condición de la bomba en la uremia.

37

EL AGENTE ANTIFECUNDANTE GOSSYPOL ES UN INHIBIDOR POTENTE Y ESPECÍFICO DE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LOS TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS (The antifertility agent gossypol is a potent and specific inhibitor of the functional activity of mammalian glucose transporters) Rauch, M.C. Instituto de Bioquímica Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. (Patrocinio D. A.M. Reyes.)

Nuestro grupo ha estudiado la expresión de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs) en testículo y espermatozoides de mamíferos. Determinamos su funcionalidad, al estudiar la incorporación de dos hexosas (glucosa y fructosa) que son capaces de suplir la alta demanda energética de estas células. Similantemente, estudiamos el transporte de la forma oxidada de vitamina C, que es incorporada por medio de los GLUTs. Vitamina C (antioxidante hidrosoluble más importante del organismo) tiene un efecto protector de la integridad de sistema reproductor masculino y es importante en la mantención de la calidad espermática.

Por otro lado, el agente antifecundante Gossypol afecta profundamente el desarrollo del epitelio germinal masculino, pero su mecanismo es escasamente conocido. En este trabajo se estudió el efecto de gossypol sobre la actividad de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs). En eritrocitos humanos y en células HL-60, gossypol inhibió el transporte de 2-desoxiglucosa (2-DOG), metilglucosa y ácido desihidroascórbico (DHA) y no afectó la capacidad de leucina, lo que indicó que su efecto inhibitorio fue específico para los transportadores GLUTs. Citocalasina B se une al transportador GLUT1, inhibiendo el transporte. Esta unión puede ser desplazada por glucosa. Gossypol también inhibió en forma competitiva, la unión de Citocalasina B a GLUT1 en fragmentos de eritrocitos. En células de ovario de hamster chino (CHO), sobreesprimiendo GLUT1, y en espermatozoides de toro, gossypol inhibió en forma dosis-dependiente, el transporte de 2-DOG y DHA, ambos sustratos específicos de los GLUTs.

Todos nuestros datos indican que gossypol inhibe el transporte de DHA y hexosas por interacción directa con el transportador de hexosas (GLUT) y que interfiere con su actividad de transporte. Estas observaciones indican que algunos de los muchos efectos de gossypol en la fisiología celular, podrían estar relacionados con su capacidad para interrumpir un flujo normal de sustratos a través de los transportadores GLUTs, los cuales están expresados universalmente y son responsables de la captación basal de glucosa y DHA.

(PROYECTO FONDECYT 1060485, 1981018 y DID-UACH S-97-04.)

39

ACTIVACIÓN *IN VIVO* POR GLUCOSA-6-P DE LA GLICÓGENO SINTASA DE OOCITOS DE RANA: UN EFECTO ALOSTÉRICO SOBRE LA FORMA D DE LA ENZIMA. (*In vivo* activation of frog oocyte glycogen synthase by glucose-6-P: allosteric effect on the D form of the enzyme) Baez, M., Preller, A., Ureta, T. Departamento de Biología Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La glicógeno sintasa, enzima clave de la síntesis de glicógeno, es regulada por fosforilación/desfosforilación. La enzima fosforilada, D o dependiente, es inactiva en ausencia de glc-6-P. La forma desfosforilada, I o independiente, es activa en ausencia de glc-6-P. En extractos crudos de oocitos, la enzima se encuentra preferentemente (>80%) en la forma D. La K_m de esta enzima para el sustrato UDPG es 6,3 mM y en presencia de glc-6-P 0,8 mM. La K_a para glc-6-P es 40 μ M y no es afectada significativamente por la concentración de sustrato. La incubación a 30°C de preparaciones semipurificadas transforma la enzima de D a I. Esta transformación no ocurre en presencia de NaF (un inhibidor general de fosfatasa) ni a 4°C, lo que sugiere un proceso enzimático de desfosforilación. La transformación resultó en una disminución a la mitad de la K_a para glc-6-P. La actividad de la enzima *in vivo*, medida por microinyección de UDPG radiactivo saturante, aumenta 3 veces en presencia de glc-6-P. Esta activación no se debe a aumento de la forma I de la enzima, puesto que glc-6-P inyectada no produce un aumento de la actividad I durante el tiempo de ensayo. Los resultados indican que la activación de la glicógeno sintasa *in vivo* por glc-6-P, se debe a un efecto alostérico sobre la forma D y no a un efecto de glc-6-P sobre la desfosforilación de la enzima.

Financiado por Proyecto Fondecyt 1970216

38

EVENTOS DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES MEDIADA POR ÁCIDO SALICÍLICO EN TABACO. (Protein phosphorylation events involved in the transcriptional activation of genes mediated by salicylic acid in tobacco). Hidalgo, P., Garretón, V., Berrios, C.G., y Holuigue, L. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El ácido salicílico (SA) es una de las señales endógenas que median la activación transcripcional de genes de defensa a patógenos en plantas. El mecanismo molecular por el cual el SA produce esta activación aún no está claro. En nuestro laboratorio estamos interesados en identificar componentes nucleares de la vía de transducción de señales del SA en células de tabaco. Para esto hemos utilizado secuencias promotoras identificadas como elementos de respuesta a SA (SARE). En este trabajo se muestran evidencias de la participación de una actividad proteína quinasa nuclear (del tipo caseína quinasa 2, CK2), tanto en la unión de factores nucleares a las secuencias SARE, como en la activación transcripcional de genes mediada por SA. Estas evidencias han sido obtenidas de estudios *in vitro* de unión DNA-proteína y de estudios *in vivo* de actividad transcripcional en plantas y líneas celulares transgénicas. Consistente con estas evidencias, hemos determinado que el tratamiento de plántulas de tabaco con SA provoca un aumento de la actividad CK2 nuclear. La correlación de la actividad de unión a factores nucleares y de la actividad transcripcional, nos ha permitido además estudiar cuales son los requerimientos estructurales de las secuencias SARE. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis que el SA induciría la fosforilación de proteínas nucleares por una actividad CK2. Esta fosforilación provocaría un aumento de la actividad de unión de factores de transcripción a secuencias SARE, induciendo así eventos tempranos de activación transcripcional de genes controlados por estas secuencias.

Financiado por Proyecto Fondecyt 8980005.

40

EL FLAVONOIDE GENISTEÍNA ES UN INHIBIDOR NATURAL DEL TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (The flavonoid genistein is a natural inhibitor of the transport of aromatic aminoacids). Reyes, A.M., Sandoval, M. y Vera, J.C. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile y ²Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA.

El transporte de aminoácidos aromáticos a través de las membranas plasmáticas en mamíferos es facilitado por dos sistemas de transporte, los sistemas L y T. El sustrato preferido del sistema L es leucina y sus propiedades se han estudiado en detalle; no ocurre lo mismo con el sistema T, el cual es específico sólo para los aminoácidos aromáticos. Una de las limitaciones para caracterizar el sistema T ha sido que no se conocen inhibidores específicos para este transportador. Al analizar las características del transporte de aminoácidos aromáticos en eritrocitos humanos y células leucémicas humanas HL-60, hemos encontrado que genisteína, un compuesto natural conocido por su capacidad de inhibir proteína tirosina quinasa, es un eficiente inhibidor del sistema T. Estas células toman L-tirosina y L-triptófano en una forma saturable y dependiente de la concentración, a través de un transportador que exhibe alta afinidad por ambos sustratos ($K_m = 29 \mu$ M y 3 mM, respectivamente) y en forma independiente de la presencia de leucina. Genisteína (y otros flavonoides) inhibe completamente este transporte ($K_i = 10 \mu$ M), pero no afecta el transporte de leucina, lo cual indica que la inhibición es propia del sistema T. Asimismo, el sistema T no es sensible a otros compuestos, como citocalasina B y floretina, a concentraciones que normalmente inhiben la entrada de azúcares a través del transportador de hexosas GLUT1 en eritrocitos humanos y células HL-60. En conclusión, hemos obtenido datos que indican que ciertos flavonoides son inhibidores potentes y específicos del sistema T de transporte de aminoácidos aromáticos. Estos compuestos serán de gran utilidad para realizar un análisis detallado de las características funcionales de este transportador. (Financiado por proyectos FONDECYT 1981018, DID-UACH S-97-04, MSKCC Inst. Funds).

IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCIÓN ENTRE LA TIROSIL-TRNA SINTETASA Y EL tRNA^{tyr}. (Interactions between tyrosyl tRNA synthetase and tRNA). Salazar, J., Zúñiga, R., Tapia, J., Lefimil, C. y Orellana, O. Programa de Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile

En bacterias existen dos genes (*tyrS*, *tyrZ*) que codifican para dos tirosil tRNA sintetasas (TyrRS, TyrRZ). Estas enzimas presentan un máximo de 25% de identidad a nivel de aminoácidos. La TyrRZ de *T. ferrooxidans* usa el tRNA^{tyr} de *E. coli* como sustrato tanto *in vivo* como *in vitro* (J. Bacteriol. 1994 176:4409). Suponemos que los aminoácidos hidrofílicos conservados entre las TyrRS y TyrRZ, presentes en el extremo carboxilo terminal (domino de unión al tRNA en la TyrRS) participan en la interacción con el tRNA^{tyr}. Para probar esta hipótesis se reemplazó estos residuos, mediante mutagénesis sitio dirigida, en la TyrRZ de *T. ferrooxidans*. El efecto de las mutaciones se ensayó por complementación de una mutante termosensible en el gen *tyrS* de *E. coli* HB2109 y por análisis cinético de las enzimas mutantes y silvestre, sobreexpresadas en *E. coli* a partir de plásmidos recombinantes que contiene el gen *tyrZ* mutado o silvestre.

Los resultados indican que los aminoácidos hidrofílicos conservados entre las dos familias de enzimas, presentes en el extremo carboxilo terminal de la TyrRZ, cumplen un papel en la interacción con el tRNA^{tyr}. Se discutirán las posibles implicancias estructurales y evolutivas de la divergencia en la estructura primaria de las tirosil tRNA sintetasas bacterianas. Financiado por Fondecyt (1981083)

DIFERENCIAS FUNCIONALES PRESENTAN LAS CELULAS PROGENITORAS MESENEQUIMATICAS (MSC) OBTENIDAS DE DADORES NORMALES Y OSTEOPOROTICAS. (Functional differences of Mesenchymal Stem Cells (MSC) derived from normal and osteoporotic donors). Rodríguez, J.P.¹, Garat, S.¹, Gajardo, H.², Seitz, G.³ Unidad de Biología Celular¹ y Laboratorio de Densitometría², INTA, U. De Chile. Hospital Sótero del Río³

A pesar de las múltiples investigaciones realizadas, aún no se conoce con exactitud los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la génesis de la osteoporosis. La mayor parte de estos estudios han sido realizados principalmente en células óseas maduras: osteoblastos u osteoclastos. Hasta ahora, existen muy pocos estudios en que se analice el rol que tienen los precursores de estas células en la génesis de la osteoporosis. La MSC es una célula pluripotente presente en la médula ósea (MO), que da origen a diferentes tipos celulares, entre ellos a los osteoblastos. Recientemente, ha sido posible aislar y expandir en cultivo MSC obtenidas de MO humana.

El objetivo de este trabajo es estudiar las características funcionales de las MSC obtenidas de dadores normales (MSCn) y osteoporóticas (MSCo). Para esto, MSC obtenidas de mujeres post menopausicas normales y osteoporóticas, se aíslan mediante una gradiente de Percoll, se cultivan y expanden en DMEM-10% de suero fetal, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Todos los ensayos fueron realizados luego del cuarto subcultivo.

Los resultados indican que: 1) La velocidad de proliferación de MSCn es mayor que MSCo, 2) El efecto estimulador de IGF-1 sobre la proliferación celular se manifiesta exclusivamente en MSCn, 3) MSCn tienen una mayor actividad de fosfatasa alcalina que MSCo, y 4) MSCn tienen una mayor capacidad osteogénica *in vitro* que MSCo.

Los resultados indican que MSCn se comportan de manera diferente que MSCo. Esto sugieren que en la osteoporosis no solo existe un aumento en la actividad osteoclastica, sino también que los precursores de osteoblastos, MSC, presentan alteraciones en algunas de sus características funcionales. Se discute la importancia que hallazgos de este tipo pueden tener en la investigación sobre la génesis de esta enfermedad, así como en nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad, teniendo como blanco a la célula progenitora más que a la célula madura.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 8970028

EXPRESION DE UNA NUEVA SUBUNIDAD (β3) DE LA Na,K-ATPasa Y SU REGULACIÓN POR HORMONAS DE LA CORTEZA ADRENAL. (Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase β3 subunit: regulatory role of adrenal cortex hormones) Valenzuela, V. y Michea, L. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. (Patrocinio: A. Morello).

La Na,K-ATPasa pertenece a una familia de ATPasas tipo P, que transloca iones y esta compuesta de una subunidad catalítica (α) que contiene los sitios de unión para ATP y cationes. Existe además una segunda subunidad, denominada β, que es una glicoproteína indispensable para el efecto catalítico de la enzima. Recientemente se ha descrito una nueva isoforma de ésta, denominada β3. En el presente trabajo se estudió la presencia de esta isoforma en tejido vascular y renal y su regulación por hormonas de la corteza adrenal. Con este objeto se utilizaron 4 grupos de ratas: controles, adrenalectomizadas (ADX), ADX + Dexametasona (DEXA) y ADX + DOCA. Análisis de RT-PCR demostraron una mínima presencia en animales controles y ADX-DEXA y abundante mRNA para β3 en ADX y ADX-DOCA en los tres tejidos estudiados: aorta, corazón y riñón. Estudios de Northern blot demostraron que la subunidad β3 codifica 2 transcritos que son expresados en aorta, corazón y riñón y que son cuantificables solo en las ratas ADX y ADX-DOCA. La cuantificación se realizó en relación al mRNA de GADPH y/o en relación al 18S RNA.

Estos resultados indican que mRNA de β3 está presente en aorta, corazón y riñón y que su expresión estaría fuertemente inhibida por los glucocorticoides.

Proyecto Fondecyt 197-0696.

ACTIVIDADES METALOPROTEINASICAS MMP-2 Y MMP-9 EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO. (Metalloproteinase activities MMP-2 and MMP-9 in cerebro spinal fluid) Valenzuela, MA.⁽¹⁾, Cartier, I.⁽²⁾, Collados, L.⁽¹⁾, González, E.⁽¹⁾, Torres, C.⁽¹⁾, Gómez, L.⁽¹⁾, Araya, F.⁽²⁾, Concha, C.⁽²⁾, Flores, L.⁽²⁾, Gajardo, A.⁽¹⁾, Hidalgo, A.⁽¹⁾ (1) Depto Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas. (2) Depto Ciencias Neurológicas, Facultad Medicina, Universidad de Chile.

Las metaloproteinasas de 74 y 92 kDa (MMP-2 y MMP-9), conocidas como gelatinas A y B, son secretadas al medio extracelular donde cumplen una función importante en el modelamiento de la matriz extracelular. En este trabajo se ha efectuado una caracterización bioquímica de estas actividades hidrolíticas presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR), comparándose además la presencia de MMP-2 y 9 en controles sanos con pacientes que presentaban diversas patologías inflamatorias y accidentes vasculares.

La presencia de las MMPs se demostró mediante zimografía en SDS/PAGE con 1% de gelatina y para la actividad colagenásica total se utilizó azocoll, cuantificando espectrofotométricamente los péptidos solubles liberados. La alteración de la barrera hematoencefálica por desregulación de las MMPs se siguió midiendo por electroforesis capilar la presencia de proteínas plasmáticas (albúmina y globulinas).

Las MMP-2 y 9 hidrolizaron, en presencia de Ca²⁺, gelatina, pero no otras proteínas como caseína y BSA. Estas actividades proteolíticas no fueron inhibidas por PMSF ni DUNB, pero sí por EDTA, ditiotretiol y tetraciclina. En los LCRs de controles sanos se visualizó en forma importante la actividad MMP-2, en cambio en la patologías de paraparesia espástica tropical ligada al virus HTLV-1 y en otras patologías inflamatorias se encontró además una gran actividad gelatinásica correspondiente a la MMP-9.

Financiado con fondos de Fac. Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

45

ROL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR OSEA EN LA INVASION TUMORAL DE ORIGEN MAMARIO. (Role of the bone extracellular matrix on breast tumoral invasion). M. Fuentes y J. Martínez Laboratorio de Biología Celular e Inmunología, INTA, Universidad de Chile

El esqueleto es un tejido frecuentemente invadido por células tumorales. En los estadios tardíos de la progresión metastásica, tumores como el de mama o próstata invaden el hueso causando una reacción osteoblástica (en el caso del tumor de próstata) u osteolítica en el caso del tumor mamario.

En trabajos previos hemos comunicado que la matriz extracelular (MEC) generada por una línea celular de origen óseo (SaOS-2) era capaz de inducir un aumento en la capacidad invasiva de células mamarias dependientes de estrógeno (MCF-7) que se expresaba en un estímulo sobre la capacidad migratoria, invasiva y secretoria de enzimas proteolíticas como uroquinasa (u-PA) y metaloproteinasas (MMPs).

En el presente estudio mostramos que una proporción importante de la actividad u-PA secretada por las células tumorales de mama se deposita en la MEC ósea en una especie de tamaño molecular mayor. En este complejo probablemente participa una especie soluble del receptor de u-PA (u-PAR) que se une a la MEC ósea. Esta sugerencia resulta del hecho que el nivel de expresión del receptor de u-PAR en dos líneas celulares de mama de diferente potencial invasivo se correlaciona con la capacidad de unión de u-PA en matrices "mixtas" (compuestas por MEC ósea y la generada por la célula de mama) y con la conocida capacidad de la célula invasiva (MDA-231) de producir u-PAR soluble. Se discuten estos resultados de cara al rol de u-PAR en la adhesión celular.

Se presenta además estudios que muestran que la producción de MMPs por parte del sistema mixto corre por cuenta de la célula mesenquimal y se le atribuye a la célula mamaria un rol en la activación de estas enzimas.

Financiamiento: Fondecyt 8970028.

47

CANCER VS DIFERENCIACION. EXPRESION DE TRANSPORTADORES FACILITATIVOS DE HEXOSAS (Cancer vs differentiation: expression of facilitative hexose transporters) Hogger, E.A. y Droppelmann, A. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. (Patrocinio: L. Concha)

Este estudio relaciona el cambio que sufre una célula al pasar, por un lado, a estado tumoral (indiferenciado) o, por otro, a estado diferenciado, procesos que estarían íntimamente ligados a un aumento de expresión de los transportadores facilitativos de hexosas o GLUTs, (familia de siete isoformas y consideradas multifuncionales). Los estudios de diferenciación hacia promonocito, se realizaron adicionando 10 nM de vitamina D₃ por 72 horas, al cultivo de la línea celular HL-60, el cual fue comprobado, a través de cambios morfológicos, detección de apoptosis y detección de antígenos de membrana como GM-CSFR y CD^{11b}. El cambio celular inverso (indiferenciación) se estudió en cortes de seminomas obtenidos de pacientes con tumores de diferentes grados de agresividad.

La expresión de los GLUTs se vio aumentada en el cambio celular hacia ambos estados, donde, en la célula HL-60 diferenciada a promonocito, se encontró un aumento de la expresión de la proteína y mRNA de GLUT3 y la sobreexpresión de la proteína y mRNA de GLUT1. Además los ensayos funcionales, usando un análogo de glucosa no metabolizable (DOG), revelaron un transporte de alta afinidad en el promonocito. Estos datos junto a los de expresión, sugieren que las proteínas involucradas en el transporte de DOG en el promonocito son GLUT1 y GLUT3. Por su parte, en el cambio celular inverso, se comprobó que a medida que aumenta la agresividad del seminoma, se expresa tanto la proteína como el mRNA de las isoformas GLUT2, GLUT3, GLUT4 y GLUT5 y se sobreexpresa GLUT1.

Este estudio revela que para el proceso de cambio celular es importante la expresión de transportadores facilitativos de hexosas, ya que éstos, participan en la captación eficiente de sustratos energéticos, y también de otros metabolitos, tales como vitamina C, nicotinamida y algunos aminoácidos.

(Proyecto FONDECYT 196-0485)

46

EL DANO OXIDATIVO AL DNA, DETECTADO COMO 8-OH-DEOXIGUANOSINA, DISMINUYE CON DIETA VEGETARIANA EN HUMANOS. (Oxidative damage to DNA detected as 8-OH-deoxyguanosine, diminishes with vegetarians diet: humans) ESPINOZA, M.A., CARVAJAL, C. y STROBEL, P. Laboratorio de Citología Bioquímica y Lípidos, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile (e-mail: leight@genes.bio.puc.cl) (Patrocinado por: S. MIRANDA)

Los principales antioxidantes exógenos a la célula son nutrientes naturales cuya fuente principal son las frutas y verduras. El equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo al que está expuesto el organismo. La continua producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), en organismos aeróbicos es responsable de daño oxidativo directo en estructuras biológicas, tales como DNA. En este trabajo se evalúa el nivel de antioxidantes en plasma y el daño oxidativo en DNA de leucocitos. Un grupo de 27 vegetarianos fueron pareados por edad, sexo, IMC (índice de masa corporal) y nivel socioeconómico con 27 sujetos omnívoros. Las mediciones de niveles plasmáticos de antioxidantes se realizaron por HPLC con detección electroquímica y para 8-OH-deoxiguanosina por HPLC con detección electroquímica y arreglo de díodos. Los resultados mostraron que los vegetarianos tienen niveles significativamente más elevados de β-caroteno $1,15 \pm 0,63$ vs. $0,55 \pm 0,31$ ($p < 0,0001$), licopeno $0,71 \pm 0,55$ vs. $0,43 \pm 0,20$ ($p < 0,018$) y glutatión en glóbulos rojos 304 ± 90 vs. 223 ± 53 ($p < 0,0002$). Los niveles de 8-OH deoxiguanosina para los sujetos vegetarianos correspondieron a $6,02 \pm 0,87$ vs. $14,28 \pm 1,83$ 8-OH-dG/10⁵dG ($p < 0,01$). Estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis que los altos niveles de antioxidantes en la dieta vegetariana son capaces de proteger del daño oxidativo al DNA.

Financiamiento: Programa Bases Moleculares de las Enfermedades Crónicas, PUC-PBMEC98)

48

EXPRESIÓN DE CAVEOLINA EN HÍGADO: POSIBLE ROL EN LA SECRECIÓN BILIAR DE COLESTEROL (Caveolin is expressed in the liver: role in cholesterol biliary secretion). Zanlungo, S., Mendoza, H., Amigo, L., Lovola, C., Arias, P., Rigotti, A. Depto. de Gastroenterología, Facultad de Medicina y Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

El hígado juega un rol clave en la regulación de la homeostasis del colesterol corporal controlando diferentes vías metabólicas, incluyendo la secreción biliar de colesterol. Se desconocen aún los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el proceso de destinación del colesterol intrahepático hacia el polo canalicular para su secreción biliar. Las caveolinas (Cav) son proteínas integrales de membrana que se expresan en distintos tejidos en microdominios resistentes a detergente (DIGs) y caveólas. Se ha propuesto que las Cav cumplen un rol importante en el transporte intracelular, el flujo y el flujo de colesterol en células no hepáticas, sin embargo se desconoce la existencia de Cav y caveólas en el hígado. Nuestro objetivo es estudiar la presencia de Cav y DIGs en tejido hepático y correlacionar su expresión con cambios en el transporte de colesterol intrahepático hacia la bilis. A partir de hígado de ratas se aisló membrana canalicular total, la que se usó para preparar DIGs. Los DIGs aislados contienen alrededor del 2% del colesterol canalicular y la mayor parte de la fosfatasa alcalina (proteína anclada a GPI). El análisis de expresión de Cav-1 y -2 utilizando anticuerpos monoclonales demostró la existencia de ambas Cav en los dominios DIGs. En ratas tratadas con diosgenina, la cual induce una hipersecreción selectiva de colesterol biliar, se detectó un incremento de 100% en el contenido de colesterol y de 300-400% en la expresión de Cav-2 (pero no Cav-1) en DIGs de membrana canalicular. El análisis inmunohistoquímico hepático demostró la presencia de Cav-2 tanto a nivel sinusoidal como canalicular, con un incremento significativo en la expresión canalicular en condiciones de hipersecreción de colesterol biliar. Estos resultados demuestran a) la existencia de dominios DIGs y de Cav en el hígado y b) la regulación coordinada de los niveles de colesterol y de Cav-2 en DIGs de la membrana canalicular con respecto a la secreción de colesterol biliar. Esto sugiere que en el polo apical del hepatocito la Cav-2, y presumiblemente las caveólas, podrían participar en el proceso de flujo de colesterol desde el hígado a la bilis.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA INACTIVACIÓN DE p53 EN CÁNCER DE LA VESÍCULA BILIAR (Molecular characterization of p53 inactivation in gallbladder carcinoma). **Morero, M., Wistuba, J., Gazdar, A., Nervi, E., Miquel, J.E.** Depto. de Gastroenterología y Patología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile y UT-Southwestern Medical Center, Dallas, USA.

El cáncer de la vesícula biliar es una de las neoplasias más frecuentes en Chile, siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y la quinta en hombres. Se desconocen los mecanismos patogénicos de la enfermedad, sin embargo el principal factor de riesgo es la presencia de colestiasis. Se ha postulado que la secuencia histológica involucrada en su desarrollo es: inflamación crónica → displasia → carcinoma *in situ* → cáncer invasor. Esto sería consecuencia de alteraciones genéticas acumulativas, similar a lo descrito para otros adenocarcinomas. Aunque se desconocen las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo del cáncer de la vesícula biliar, estudios previos de inmunohistoquímica y pérdida de heterocigocidad (LOH) en distintos locus del genoma, han sugerido que la inactivación de p53 sería un evento crítico para el desarrollo de esta neoplasia. En este trabajo se propone caracterizar las alteraciones moleculares de p53 tanto en tumores invasores como en lesiones premalignas de la vesícula biliar. Se aisló DNA a partir de muestras microdisecadas de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (30 tumores invasores y 13 displasias). Para evaluar la existencia de LOH se utilizó la técnica de PCR con primarios que flanquean una zona polimorfa en el locus 17p13.1. La existencia de mutaciones puntuales para los exones 5 al 8 de p53 (codon 126-306) se estudió mediante la técnica NIKCA (Non Isotopic RNase Cleavage Assay; Ambion Inc.) utilizando primarios específicos para cada uno de los exones. La existencia de mutaciones fue confirmada por secuenciación directa. Se observó LOH en 17p13.1 en el 66,7% de tumores invasores y en el 75% de las displasias. El estudio NIKCA sugirió la existencia de mutaciones en los exones 5 a 8 en el 63% (19/30) de los tumores invasores. El análisis de secuenciación confirmó la existencia de mutaciones en el 90% de las muestras NIKCA (+) (17/19). En sólo una muestra la mutación fue silenciosa y las restantes mostraron cambio aminoacídico (*missense*, n:14), mutación sin sentido (n:1) y delección (n:1). Estas mutaciones fueron detectadas preferentemente en los exones 5 y 7. Se detectó la existencia de mutación y LOH en 10 tumores y mutación homocigota sin LOH en 3. Se observó LOH en ausencia de mutación detectable en 7 tumores. En conclusión, este trabajo confirma que las alteraciones moleculares que confieren inactivación a p53 son muy frecuentes en el cáncer de la vesícula biliar. Los resultados sugieren que esta inactivación ocurre generalmente por delección de un alelo (LOH) y mutación del alelo restante, sin embargo en algunos tumores puede existir inactivación de p53 por mutación homocigota. (Financiado por Fondecyt 1971100).

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA ANULAR EL GEN DE LA AMELOGENINA EN RATÓN (Gene targeting of the mouse amelogenin gene)

Mendoza, C., Quevedo, L., Soto, C., Vásquez, O., Yévenes, I., Valdivia, R. y Katoh, M. Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago, Chile. (Patrocinio: J. Puente).

El uso de la técnica de mutación dirigida para anular la acción de un gen en forma específica, permite generar individuos con el genotipo modificado, y así, estudiar la función de genes durante, por ejemplo, el desarrollo embrionario. Se ha postulado que el producto del gen de la amelogenina juega un rol crucial en la formación y mineralización del esmalte dental. Sin embargo, no se conoce el mecanismo que regula la diferenciación de los ameloblastos secretores de amelogenina o la biomineralización del esmalte. Para comprender la función de la amelogenina *in vivo*, nuestro laboratorio ha comenzado la producción de un ratón con el gen anulado, mediante el uso de vectores diseñados para recombinar y mutar el locus *Amel X*. En este estudio, se presenta el diseño y construcción de dos vectores. La secuencia del gen *Amel X* se obtuvo de la secuencia publicada e incorporando secuencias recientemente obtenidas (no publicadas). El gen clonado de 14 Kb, tiene 7 exones con el codón de inicio de la traducción en el exón 2. Para interrumpir el gen se eligió el método de selección positiva/negativa. Para ello, se amplificó por PCR un segmento de aproximadamente 3Kb río arriba del exón 2, y otro de 4Kb río abajo de él que contiene los exones 3, 4, 5 y parte del 6, incorporando sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' de estos fragmentos. Se ligaron estos fragmentos con el gen de resistencia a la neomicina del plasmidio pKJ2, reemplazando este gen *neo^r* al exón 2. En un extremo del vector se ligó el gen de la timidina quinasa (*tk*) proporcionado por pMC1-HSVtk, o el gen de la subunidad α de la toxina diftérica (DT-A) de pMCDT-A. El vector con *tk* se está clonando en un fago λ DASH II y el vector con DT-A en *E. coli*. Del diseño y construcción de este tipo de vectores depende la obtención de animales "knock-out". Proyecto FONDECYT 1970219.

PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO ORGANO SUBCOMISURAL FIBRA DE REISSNER EN LA DEPURACIÓN DE MONOAMINAS DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO (Participation of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex in the clearance of monoamines from the CSF). **Rodríguez S., Navarrete E., Vio K** Instituto Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile Valdivia.

La función del complejo OSC-FR aún sigue siendo una incógnita. Una hipótesis de trabajo plantea la posibilidad que las glicoproteínas constitutivas de la fibra de Reissner (FR) unan monoaminas y las transporten fuera del SNC. Esta hipótesis fue puesta a prueba utilizando dos modelos experimentales desarrollados en nuestro laboratorio. Estos modelos permiten bloquear inmunológicamente la formación de la FR en forma permanente (transferencia materna de anticuerpos anti-FR) o transitoria (una única inyección de anticuerpos en el LCR). Se obtuvieron muestras de LCR de la cisterna magna de 1) ratas controles de 6 y 11 semanas de edad, 2) ratas deprimidas de FR por transferencia materna de anticuerpos de 6 y 11 semanas de edad, 3) ratas controles de 3 meses de edad, 4) ratas de 3 meses que recibieron una única inyección de anticuerpos contra la FR. En éstas el LCR se obtuvo a los 5 días (ausencia de FR) y 10 días (FR parcialmente reconstituida) después de la inyección. Mediante HPLC se determinó la concentración de las monoaminas y sus metabolitos en todas las muestras de LCR. Los animales sin FR presentaron un aumento notable de L-DOPA y un aumento significativo de DOPAC y Adrenalina. Además, la Serotonina y Noradrenalina, que no se encontraron en LCR de las ratas controles, sí se detectaron en LCR de ratas sin FR. Los resultados apoyan sustancialmente la validez de la hipótesis.

FONDECYT E.M. Rodríguez 197-0627

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DEL DNA MITOCONDRIAL EN RESTOS ESQUELETARIOS Y UNA POBLACIÓN VIVA DEL NORTE DE CHILE (Mitochondrial DNA polymorphisms analysis on ancient skeletal remains and an alive population from the North of Chile). **Moraga, M., Rothhammer, F., Carvallo, P.** Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Los polimorfismos de DNA mitocondrial (mtDNA) han sido ampliamente utilizados tanto en el análisis de evolución de poblaciones, como en el estudio de sus patrones migratorios. Así, en América, se han realizado diversos estudios en el mtDNA de poblaciones aborígenes contemporáneas, que han revelado una información importante acerca de su poblamiento. Aunque la información obtenida de poblaciones actuales es relevante, el estudio en restos esqueléticos entregan antecedentes importantes acerca de poblaciones que existieron en el pasado y que hoy están desaparecidas. Nuestro objetivo principal es el de analizar los polimorfismos de mtDNA en restos esqueléticos del periodo formativo de entre 2000 y 3000 años AP, y compararlos con poblaciones actuales del Norte de Chile, algunas de las cuales están incluidas en este proyecto. Para ello se extrajo DNA de muestras de hueso de siete momias diferentes, según una modificación del protocolo de Hoss y Pääbo (1993). El DNA de muestras contemporáneas fue extraído por un procedimiento estándar. En las muestras antiguas se determinó el haplotipo amerindio, A, B, C o D, por análisis de Amp-RFLP, determinándose la ausencia de individuos del haplotipo B. El análisis de la secuencia de la región hipervariable I, sugiere que al menos cuatro de ellas corresponden al haplotipo C. Se estudió además una muestra de 24 individuos de la región de Atacama, Chile. Esta población muestra los cuatro haplotipos, siendo B el más frecuente, con un 62,5 %, similar a la ya descrita para Aymaras. Estos hallazgos preliminares nos sugieren que la composición de las poblaciones que vivieron hace 2000 a 3000 años en el Norte de Chile es diferente a la actual. Esperamos entonces que este estudio sea un aporte relevante al conocimiento del poblamiento de América. (FONDECYT 297-0028 Y 198-1111)

53

EXPRESION DEL mRNA DE CIITA EN DOS LINEAS CELULARES DEFICIENTES PARA LA INDUCCION DE ANTIGENOS MHC-II. (CIITA mRNA expression in two cell lines defective for the MHC-II antigens induction). Naves R.¹, Lennon A.M.², Fellous M.², Alcaide-Loridan C.², Bono M.R.¹. ¹Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, ²Unité d'immunogénétique Humaine, INSERM U276, Institut Pasteur, Francia y ³Fundación Ciencia para la Vida.

El factor transcripcional CIITA (Class II Transactivator) ha sido señalado como clave en la regulación de la inducción de los antígenos de Clase II por IFN- γ . Tanto la especificidad tisular como la expresión constitutiva e inducible por IFN- γ del gen para CIITA es regulada a través de la activación diferencial de cuatro diferentes promotores. L(tk-) y RAG, dos líneas celulares murinas que expresan varios de los genes regulados por IFN- γ , son incapaces de expresar antígenos de Clase II desconociéndose su defecto molecular. Nuestros resultados previos con híbridos somáticos entre L(tk-) y células B humanas y de RAG con células BLS (Síndrome de Linfocitos Bare) indican que CIITA podría ser el factor defectuoso en las células L(tk-) pero no en RAG. Con el fin de confirmar estos resultados estudiamos la expresión del mRNA de CIITA en ambos tipos celulares. Estudios de RT-PCR, usando partidores que cubren toda la secuencia del mRNA de CIITA murino silvestre, muestran que las células RAG expresan un mRNA normal de CIITA inducible por IFN- γ , mientras que L(tk-) expresa una forma más corta de este mRNA pero también inducible. Los cDNA obtenidos por RT-PCR fueron secuenciados confirmando que corresponden a CIITA y que no presentan mutaciones. Estudios de RACE-PCR muestran que el inicio de la transcripción de CIITA en células RAG corresponde al sitio normal. Análisis de la secuencia del promotor inducible de CIITA muestra que éste no presenta mutaciones en RAG pero que las células L(tk-) son heterocigotas con respecto a una base nucleotídica en el sitio de unión al factor transcripcional IRF1/2. En conclusión, nuestros resultados muestran que el defecto de las células RAG no corresponde a CIITA. En cambio, las células L(tk-) expresan una forma más corta de este mRNA que explicaría la ausencia de expresión de antígenos MHC-II. Este diferente mRNA de CIITA se debería a una deficiencia en el promotor inducible de CIITA y a la activación de un nuevo promotor intragénico inducible por IFN- γ . FONDECYT 4980004 (RN), 1980208 (*MR) y 1960876 (MRB).

55

MECANISMOS CELULARES DE LA REGULACION DEL TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE HIERRO POR LAS CELULAS DEL EPITELIO INTESTINAL. (Cellular mechanisms in the regulation of transepithelial iron transport by intestinal epithelia cells) Núñez M.T., Tapia V. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las células del epitelio intestinal tienen una doble misión: deben regular sus niveles de hierro y a la vez regular el paso transepitelial de éste según las necesidades corporales. Ambos mecanismos están íntimamente ligados. La actividad de transporte apical-célula presentó una relación inversa con los niveles celulares de Fe. Esta misma relación se mantuvo con los niveles celulares del receptor de transferrina (RTf) y con la actividad del sistema IRE/IRP, responsable de la regulación traduccional de proteínas involucradas en la homeostasis celular Fe. Al parecer, el sistema IRE/IRP regula la expresión de DMT1, el transportador apical de Fe²⁺. La salida de Fe desde la célula al medio basolateral también es regulada. Encontramos que la endocitosis basolateral de Tf incorpora Fe desde el plasma sanguíneo; esta incorporación es parte del sistema sensor de los niveles de Fe corporal. También encontramos que la endocitosis de Tf induce la salida, hacia el lado basolateral, de Fe que recién entró desde el medio apical. Estudio de las rutas intracelulares de ferroTf y apoTf indican un compartimento del citoplasma periférico donde ferroTf podría perder su Fe, y un compartimento perinuclear en donde Tf podría adquirir Fe de novo. Este juego de entrega y saque de Fe mediado por Tf definen un mecanismo celular en el que el flujo neto de entrada o salida de Fe de la célula intestinal al medio basolateral depende del grado de saturación con Fe de la Tf endocitada. Financiado por proyecto FONDECYT 1970568 y por una Cátedra Presidencial en Ciencia.

54

EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS DE GDNF Y SU RECEPTOR GDNFR α EN GANGLIOS BASALES DE CEREBRO DE RATA. (mRNA expression of GDNF and GDNFR α receptor in rat basal ganglia). Escobar-Vera, J., Gysling, K y Bustos, G Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La capacidad adaptativa de las neuronas dopaminérgicas depende de la disponibilidad de factores neurotróficos los cuales son esenciales en el desarrollo y protección del sistema nervioso. El factor neurotrófico derivado de glia (GDNF) es un potente factor trófico que aumenta la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas en cultivo por interacción con un complejo receptor formado por la proteína proto-oncogénica C-RET y GDNFR α . El GDNF es un potencial agente terapéutico para trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson. En el presente trabajo se estudió por Northern blot e hibridación *in situ* la expresión de los transcritos de GDNF y GDNFR α en el SNC. Para ello el cDNA de ambos genes fue clonado y secuenciado de manera de generar una sonda de RNA antisentido para los análisis de expresión de los genes en estudio. Los primeros ensayos de hibridación *in situ* en cortes de cerebro de rata (estriado, hipocampo, corteza, sustancia nigra) mostraron una intensa y resolutive señal de hibridación en las regiones esperadas de cada corte. El análisis por Northern blot mostró la presencia de los transcritos *gdnf* y *gdnfr α* en las diferentes estructuras cerebrales estudiadas y además se identificaron en cuerpo estriado dos isoformas de mRNA de GDNF. Los resultados muestran que cada ribosonda antisentido reconoce su mRNA endógeno en poblaciones neuronales específicas sugiriendo que el abordaje presentado es una alternativa adecuada para el estudio de los cambios adaptativos moleculares en cerebro de rata lesionada.

Financiado por proyecto FONDECYT 8970010.

56

LA FERRITINA CUMPLE UN DOBLE PAPEL EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO. (Ferritin plays a double role in intestinal iron absorption). Gárate M.A. Depto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Un modelo reciente de absorción intestinal de hierro (Fe), sugiere que después de la captación desde el lumen intestinal, el Fe es incorporado en un pool de Fe lábil (labile iron pool, LIP). Desde este pool el Fe puede ser almacenado o transportado al plasma sanguíneo. En este estudio investigamos si ferritina (la principal proteína almacenadora de Fe), es capaz de influir, por unión del ión, en el destino del tránsito intracelular del Fe. Para esto, cultivamos en insertos bicamerales, células Caco-2 equilibradas con concentraciones variables de ⁵⁵Fe, y las utilizamos en estudios de flujo, en los cuales dichas células fueron incubadas con ⁵⁵Fe-NTA, adicionado al medio apical. Con este protocolo distinguimos Fe de almacenaje (radioactividad de ⁵⁵Fe) y Fe de tránsito (radioactividad de ⁵⁹Fe) e investigamos como estos tipos de Fe interactúan con ferritina. Los resultados indican que la ferritina aumenta en una relación no lineal a la concentración intracelular de Fe, este aumento es más notable en una fracción de ferritina de alta densidad, la cual se encuentra en un compartimento vesicular. Esta ferritina de alta densidad presenta alto contenido de Fe de almacenaje, no incorpora Fe de flujo y presenta una vida media corta (7 h aproximadamente). Otro pool de ferritina, fracciona a baja densidad, presenta una vida media más larga (27 h aproximadamente), escaso contenido de Fe de almacenaje y se encuentra involucrada en el manejo de Fe de flujo, disminuyendo su transporte al medio basolateral. Estos resultados permiten postular un modelo más complejo, con al menos 2 pools de ferritina que cumplen diferentes papeles en el manejo del Fe intracelular.

Financiado por proyectos FONDECYT 1970568, 2970003 y por una Cátedra Presidencial en Ciencia.

IDENTIFICACION DE UN NUEVO COMPUESTO SECRETADO POR EL ORGANÓ SUBCOMISURAL DE BOVINO (Identification of a novel compound secreted by the bovine SCO) Montecinos, H (Patrocinio S Hein)

El órgano subcomisural (OSC), es una glándula cerebral presente en todos los vertebrados, siendo las glicoproteínas constitutivas de la fibra de Reissner (FR) el único producto secretorio conocido. Existen evidencias que el OSC secretaría compuestos que permanecen solubles en el LCR y que serían distintos a las proteínas de la FR. El objetivo del presente trabajo fue identificar el/los compuesto(s) LCR-solubles, distintos a la FR, secretados por el OSC de bovino. Para ello se produjo un anticuerpo contra un extracto de células secretorias tratadas con 0.5% de paraformaldehído. Este anticuerpo (ASOp) que en inmunocitoquímica muestra una alta especificidad por el OSC, se utilizó para realizar *immunoblot* de LCR bovino fetal. Se detectaron varias bandas inmunoreactivas. Se realizó *PAGE-SIS* preparativa, y las bandas inmunoreactivas con ASOp fueron separadas del gel y utilizadas para inducir anticuerpos en ratas. Uno de estos anticuerpos, inducido contra una proteína de 14 kDa (Ab-14) inmunoreacciona con granulos secretorios en las células del OSC de bovino tanto adulto como fetal y en células de cultivo organotípico de OSC. El Ab-14 no reacciona con la fibra de Reissner. En *immunoblot* de extractos de OSC frescos y OSC cultivados y de medios condicionados, el Ab-14 reconoció dos bandas de 14 y 40 kDa. Este antisuero inmunoreacciona además con los plexos coroideos e hígado. Estas y otras evidencias sugieren que el compuesto de 14 kDa secretado por el OSC al LCR (y al medio de cultivo) es idéntico o altamente homólogo a transtiretina (TTR), un compuesto de 14 kDa secretado por el hígado y los plexos coroideos que transporta T4. El hecho que el OSC secreta un compuesto soluble al LCR (el cual puede alcanzar cualquier sitio del SNC) pone a la investigación del OSC en una nueva perspectiva.

FONDECYT 197-0627

INTERCONVERSIÓN CORTISOL:CORTISONA EN TEJIDO VASCULAR HUMANO: EFECTO DE CARBENOXOLONA EN LA ACTIVIDAD 11 β -HSD Y DEL INTERCAMBIADOR Na⁺/H⁺. (Cortisol:cortisone interconversion by human vascular tissue: effect of carbenoxolone on 11 β -HSD activity and on the Na⁺/H⁺ antiporter.) Alzamora, R y Marusic, E. Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. (Patrocinio: M^a A. Valenzuela).

La 11 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (11 β -HSD) catalisa la conversión reversible de cortisol a cortisona inactiva, regulando con ello el acceso de glucocorticoides a receptores de mineralocorticoides. Existen al menos 2 isoformas de 11 β -HSD una que se encuentra predominantemente en tejidos ricos en receptores para glucocorticoides y otra restringida a tejidos que son blanco selectivo de mineralocorticoides.

En el presente trabajo se estudió la actividad de las isoformas 1 y 2 de 11 β -HSD en arteria uterina y decidual, utilizando 1,2,6,7-[³H]cortisol y cromatografía de capa fina. Los resultados indican la presencia de ambas isoformas. En tejido adulto es mayor la actividad de la isoforma 1 (27,7 \pm 1,9 fmol/min/mg vs 11,2 \pm 1,9 de la isoforma 2). En tanto que en tejido fetal, que presenta mayor actividad enzimática, predomina la isoforma 2 (83,6 \pm 13,9 fmol/min/mg vs 49,8 \pm 17,2 de la isoforma 1). Carbenoxolona fue un potente inhibidor de ambas isoformas.

La posibilidad de un efecto de cortisol:cortisona en la membrana plasmática se analizó midiendo la actividad de intercambiador Na⁺/H⁺. Para este estudio se utilizó un microscopio de epifluorescencia acoplado a un sistema de análisis de imagen. Los resultados obtenidos indican que cortisol o carbenoxolona *per se*, no modifican la actividad del intercambiador, sin embargo la adición conjunta de ambos (cortisol+carbenoxolona) produjo un notorio efecto de activación del intercambiador Na⁺/H⁺.

Estos resultados plantean la posibilidad de efectos no genómicos del cortisol sobre el intercambiador Na⁺/H⁺.

Proyecto Fondecyt 197-0696

EXPRESIÓN APICAL DEL CANAL DE POTASIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE Y SENSIBLE A CALCIO (Maxi K⁺) EN CÉLULAS MDCK TRANSFECTADAS. (Apical expression of the Maxi K⁺ channel in transfected MDCK cells) BRAVO-ZEHNDER, M., LATORRE, R., TORO, L. Y GONZALEZ, A. Depto. Inmunología Clínica y Reumatología, Fac. Medicina, Depto. Biología Celular y Molecular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile, Centro de Estudios Científicos de Santiago, Departments of Anesthesiology, Physiology and Molecular and Medical Pharmacology and Brain Research Institute, University of California, Los Angeles, CA. USA.

Los canales de potasio activados por calcio y voltaje (Maxi K⁺) se encuentran en diversos tejidos, con excepción del corazón. Su activación produce hiperpolarización de la membrana, regulando así procesos tales como el tono muscular, la secreción y la reabsorción de fluidos. La liberación de neurotransmisores en la terminal sináptica, y presumiblemente la secreción transepitelial de potasio en epitelios transportadores. Se desconocen los mecanismos de destino del Maxi K⁺ a la membrana plasmática de células con fenotipo polarizado, tales como las células de epitelios transportadores y las neuronas. Estas células regionalizan las funciones de su superficie celular segregando distintos conjuntos de proteínas a dominios específicos de la membrana plasmática; dominios apical o basolateral en células epiteliales y axonal o dendrítico en neuronas. Se ha descrito el Maxi K⁺ en el polo apical de algunas células epiteliales, utilizando métodos electrofisiológicos, y en la región axonal de neuronas, mediante inmunohistoquímica. Sin embargo, estos estudios no permiten precisar su grado de regionalización. En el presente trabajo hemos logrado expresar el cDNA de un Maxi K⁺, clonado de miometrio humano (hslowpoke), en células MDCK transfectadas. Observamos, mediante marcación metabólica seguida de biotinylation dominio-específica e inmunoprecipitación, que su destino es claramente apical (93% apical vs 7% basolateral). La inmunofluorescencia también concuerda con una distribución apical. Este modelo experimental permite indagar en el mecanismo molecular responsable de regionalización del MaxiK en dominios específicos de la membrana plasmática en células polarizadas.

(Financiado en por FONDECYT # 1980974 y Cátedra Presidencial en Ciencia (AG) y (RL)).

PARTICIPACION DE *Xslug* EN LA DIFERENCIACION MESODERMICA DE *XENOPUS*. (ROL OF *Xslug* IN *XENOPUS* MESODERMAL DIFFERENTIATION)

Young, R.M. y Mayor, R.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

El desarrollo embrionario esta controlado por la acción concertada de factores de transcripción que se expresan en tiempos y lugares específicos del embrión. Uno de estos factores es *Xslug*, el cual codifica para un factor tipo Zinc finger, y que originalmente fue descrito como un gen específico de crestas neurales. Análisis posteriores mostraron una expresión temprana en el mesodermo dorsal. La formación del mesodermo es imprescindible para la gastrulación normal del embrión. En este trabajo se pretende analizar cuál es la función de *Xslug* en la diferenciación del mesodermo dorsal. Uno de los genes mas importantes en la diferenciación mesodérmica es el factor de transcripción *Xbra*. Tanto un aumento como una disminución de su expresión conduce a anomalías en la gastrulación, por lo que se ha planteado que los mecanismos que regulan su expresión serían vitales para el desarrollo del mesodermo y para una normal gastrulación. Nosotros hemos demostrado que la expresión de *Xbra* estaría controlada por *Xslug*. La sobreexpresión de este último en el mesodermo conduce a una completa inhibición de *Xbra* y a una inhibición en la gastrulación. Experimentos de cultivos de mesodermo in vitro muestran que la falla en la gastrulación se debe a una alteración en los movimientos celulares normales. Se conoce que *Xbra* es regulado positivamente por FGF. Nosotros hemos demostrado que es posible rescatar la inhibición de la gastrulación con FGF. En conclusión nuestros resultados sugieren que *Xslug* juega un importante papel en la diferenciación mesodérmica a través de la regulación de *Xbra* por un mecanismo dependiente de FGF. (Fondecyt 1960910 y 7960009)

61

IDENTIFICACION DE UN GEN DE *Renibacterium salmoninarum* QUE CODIFICA PARA NAD-SINTETASA. (Identification of a *Renibacterium salmoninarum* gene that encodes for NAD-synthetase). Romero, A., Concha, M.L., Figueroa, J. y León, G. Instituto de Bioquímica, Facultad Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Renibacterium salmoninarum es el agente etiológico de la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), patología crónica que afecta a los miembros de la familia salmonídea.

Desde una genoteca de *R. salmoninarum*, se aisló un clon (pUC80), cuyo inserto de 2,8 kb muestra un marco de lectura abierto que codificaría para una proteína de 273 residuos aminoácidos (29,8 kDa). Además de la conservación en el tamaño, la secuencia aminoácida deducida presentó un alto porcentaje de identidad de residuos con la enzima NAD sintetasa de *Bacillus subtilis* (61,8 %) y con la de *Escherichia coli* (51,3%). Esta enzima cataliza la última reacción en la vía de biosíntesis del NAD⁺, el cual juega un papel central en el metabolismo celular como cofactor en reacciones de óxido-reducción. La enzima ha sido reconocida como miembro de la familia de las ATP pirofosfatasa, enzimas que poseen un motivo conservado característico (Ser-Gly-Gly-X-Asp-Ser-Thr) en el sitio de unión de P_i, el cual también está presente en la NAD sintetasa de *R. salmoninarum*.

Para estudiar la proteína de *R. salmoninarum*, ésta se expresó como una proteína de fusión, desde el promotor inducible lacZ del vector pBSKII+, en la cual se reemplazaron los 20 residuos aminoácidos del extremo amino terminal de la NAD sintetasa, por 25 residuos de la β-galactosidasa codificada en el vector. La proteína de fusión, se detectó posteriormente por Western blot empleando un antisuero anti-NAD sintetasa de *B. subtilis*. Bajo las diferentes condiciones de inducción utilizadas, se observó que la mayor parte de la proteína de fusión no se recuperaba en forma soluble. Se midió la actividad enzimática de la proteína de fusión presente en la fracción soluble, mediante un ensayo acoplado con alcohol deshidrogenasa, pero no se logró detectar un incremento por sobre el nivel basal presente en *E. coli*. Sin embargo, el análisis de esta secuencia y los resultados de Western blot del ORF en estudio, son indicativos que éste correspondería al gen que codifica para NAD sintetasa de *R. salmoninarum*. Mediante experimentos que se encuentran en progreso, se espera confirmar inequívocamente la identidad de esta proteína. Financiado por Proyecto Fondecyt 1951195.

63

Caracterización y expresión de los genes que codifican para manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora*. (Characterization and expression of genes coding for manganese peroxidase and laccase in *Ceriporiopsis subvermispora*). ¹Lobos, S., ¹Corsini, G., ¹Karahanian, E., ¹Larrondo, L., ¹Salas, L., ²Tello, M., y ¹Vicuña, R. ¹Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Nuestros laboratorios se han dedicado al estudio genético molecular del sistema ligninolítico del hongo basidiomicete *C. subvermispora*, ya que ésta constituye una adecuada estrategia para verificar si existe una familia multigénica que codifica para las isoenzimas de MnP y lacasa. A la vez, nos interesa determinar las condiciones que controlan la expresión selectiva de las isoenzimas. Con este propósito hemos construido genotecas cDNA y genómicas del hongo. Ya se han obtenido las secuencias completas del cDNA MnP-1 y de su correspondiente gen *Cs-mnp1* que codifica para una isoenzima de MnP. El cDNA MnP-2, correspondiente a una segunda MnP y su respectiva variante alélica (*Cs-mnp2*) también han sido completamente caracterizados. Por RT-PCR hemos determinado que la transcripción de este gen es inducida por manganeso. Un tercer gen que codifica para MnP (*Cs-mnp3*) fue recientemente aislado y muestra alta homología con *Cs-mnp1*. Las regiones promotoras de estos genes presentan interesantes señales de regulación de la transcripción, tales como elementos de respuesta a metales (MRE) y a estrés térmico, entre otros.

Un gen que codifica para lacasa fue aislado de un banco de DNA genómico del hongo. Este gen *Cs-lcs1* presentó una alta homología con genes de lacasa de otros basidiomicetes. En la región promotora de este gen, se encontraron 5 posibles elementos MRE y un posible sitio de unión del factor de transcripción ACE1, el que se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* como un activador de la expresión génica en respuesta a cobre. En concordancia a esto último, se encontró que la expresión del gen *Cs-lcs1* es fuertemente inducida si se agrega cobre o plata al medio de cultivo. Por otro lado, en ausencia de cobre o en presencia de zinc este gen no es inducido. Estos resultados sugieren que la expresión de la lacasa en *C. subvermispora* está regulada por un factor del tipo ACE1.

Financiado por Proyecto Fondecyt 1971239.

62

INTRODUCCIÓN DE UN RESIDUO TRIPTOFANO EN LA INTERFASE INTERDIMÉRICA (C1-C4) DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA DE RIÑÓN DE CERDO. (Introduction of a tryptophan residue in the interdimer interface of pig kidney fructose-1,6-bisphosphatase). Yañez, A., Pinto, R., & Ludwig, H. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (Patrocinio: J.C. Slebe)

Fructosa-1,6-bisfosfatasa es un homotetramero cuya actividad es inhibida alostéricamente por AMP. En la enzima nativa cada subunidad contacta a las vecinas a través de diferentes interfases: una de éstas (C1-C2) es adyacente al sitio activo y la otra (C1-C4) se ubica cerca del sitio de unión del inhibidor AMP. Dado que esta enzima no posee residuos triptófano y por tanto su fluorescencia intrínseca es baja, decidimos preparar una enzima mutante con un triptófano en la interfase C1-C4. Esta mutante nos permite obtener información acerca de la interacción dímero-dímero, empleando estudios de fluorescencia. Usando mutagénesis sitio-dirigida preparamos la enzima mutante Phe6Trp. La proteína fue expresada en *E. coli*, usando el vector de expresión *pET 15-h* y purificada a homogeneidad. En comparación con la proteína nativa, la mutante Phe6Trp no muestra diferencias significativas en los valores de K_m , K_{cat} , K_M e I_{50} para AMP, pero muestra una disminución en la estabilidad térmica y una pérdida de la cooperatividad para la inhibición por AMP ($n_H=1,0$). Además, al ser excitada a 396 nm exhibe un máximo emisión de fluorescencia a 343 nm atribuible al triptófano parcialmente expuesto al solvente. Esta fluorescencia es perturbada por la adición del sustrato, de AMP y también por la desnaturalización de la enzima con cloruro de guanidina. Estos resultados indican que la estructura general de la enzima se mantiene y que la interfase C1-C4 participa en la transmisión de la señal cooperativa entre los sitios de unión de AMP y muestran la utilidad de esta mutante para sensar cambios conformacionales que afectan a esta interfase. (FONDECYT 1981001; DID-UACH S-97-02)

64

MUTACION SITIO-ESPECIFICA DE LAS HISTIDINAS CONSERVADAS DE LA CARBOXIQUNASA FOSFOENOLPIRUVICA DE *A. succiniciproducens*.

(Mutational analysis of conserved histidine residues of *A. succiniciproducens* phosphoenolpyruvate carboxykinase). ¹JABALQUINTO, A.M., ²LAIVENIEKS, M., ²ZEKUS, J.G. y ¹CARDEML, E. ¹Dpto Ciencias Químicas, Universidad de Santiago de Chile y ²Michigan State University.

La carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de *A. succiniciproducens* es una enzima clave en el metabolismo de los hidratos de carbono, que cataliza la siguiente reacción en presencia de Mn²⁺:



Estudios de diferentes autores han indicado que un metal de transición, Mn²⁺, se une directamente a la enzima activándola. En tanto que otro cation, Mn²⁺ o Mg²⁺, se une al nucleótido para formar el complejo metal-nucleótido. En este trabajo, se presenta la preparación y caracterización cinética de las siguientes enzimas mutantes: His265Gln, His225Gln, His225Glu e His225Lis.

Todas las proteínas mutantes fueron purificadas a homogeneidad y sus espectros de dicroísmo circular fueron prácticamente idénticos al de la enzima nativa. La enzima mutante His225Lis no presentó actividad. Se determinaron las K_M para Mn²⁺ encontrándose que esta aumentó 17 veces para la enzima His225Glu y 132 veces para la enzima His225Gln. Mientras que la enzima His265Gln presentó una K_M para Mn²⁺ igual a la de la enzima nativa. Por otra parte, los valores de las K_M para ADP de las enzimas mutantes no mostraron diferencias significativas con los de la enzima nativa. Estos resultados sugieren que la His225 sería uno de los ligandos de Mn²⁺ en el sitio del metal libre.

Financiado por DICYT-USACH 029441JL y FONDECYT 1970670.

CAMBIOS INDUCIDOS POR MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA EN EL MECANISMO CINÉTICO DE LA INHIBICIÓN DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA POR AMP. (Changes in the kinetic mechanism of AMP inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase induced by site-directed mutagenesis.) Cárcamo, J.G., & Slebe, J.C. Instituto de Biotecnología, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa es una enzima tetramérica cuya actividad es inhibida en forma cooperativa por la unión alostérica de AMP. Esta inhibición exhibe un mecanismo competitivo con respecto al cofactor magnesio y no-competitivo con respecto al sustrato fructosa-1,6-bisfosfato. La unión del nucleótido a la enzima induce cambios estructurales drásticos en ésta; el dímero superior rota 17 Å con respecto al inferior, provocando grandes rearrreglos en las interacciones que estabilizan las distintas interfases de la enzima. En general se ha sugerido que la comunicación cooperativa entre los sitios de unión de AMP ocurre a través de la interfase interdimérica (C1-C4). Para dilucidar el papel de la interfase intradimérica (C1-C2) en la transmisión de la señal cooperativa entre las subunidades y también en el mecanismo alostérico de inhibición, se mutó separadamente dos residuos ubicados en esta interfase: Arg49 y Lys50. Las mutantes obtenidas presentan las mismas propiedades cinéticas que la enzima silvestre, salvo la inhibición por AMP. En las enzimas K50A y K50Q la curva de inhibición para AMP es bifásica y no cooperativa. El mecanismo de inhibición con respecto al cofactor cambió de competitivo a no-competitivo y con respecto al sustrato de no-competitivo a incompetitivo. Las mutantes R49A y R49Q presentan además de la pérdida de cooperatividad para esta inhibición, un aumento de ~1.500 veces en el valor de I_{50} para AMP. El mecanismo de inhibición con respecto al cofactor también cambió de competitivo a no-competitivo. Por lo tanto, se postula que las interacciones de los residuos Arg49 y Lys50 son esenciales para la propagación de la señal cooperativa entre las subunidades C1 y C2, y además, están involucrados de alguna manera en el mecanismo alostérico para esta inhibición. (FONDECYT 1981001 y 2960060; DID-UACH).

EXPRESIÓN DE PROTEOGLICANES DURANTE LA FORMACIÓN DE EXTREMIDADES *IN VIVO* E *IN VITRO* Y LA ACTIVACIÓN DEL PROGRAMA MIOGÉNICO. (Expression of proteoglycans during limb formation *in vivo* and *in vitro* and activation of myogenic program) Ojguín, H. y Larrain, J. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Durante la miogénesis embrional, un grupo de células troncales pluripotenciales se vuelven mioblastos determinados, salen del ciclo proliferativo, se fusionan y diferencian en fibras musculares multinucleadas. Aunque los factores regulatorios de la miogénesis (FRMs) pueden estimular la diferenciación, no es claro cómo su expresión y actividad son reguladas. En este sentido, las células precursoras miogénicas que migran desde el dermomiótomo para alcanzar los primordios de las extremidades, en -9.5 dpc, no expresan ninguno de los FRMs sino hasta -10.5 dpc, sugiriendo que no son activados durante la migración ni en las primeras 24 hrs, después de su llegada al primordio. Dado que los proteoglicanos (PGs) son moléculas importantes en la regulación de la diferenciación muscular, como organizadores de la matriz extracelular (MEC) o como moduladores de la actividad de factores de crecimiento, su participación en la formación de la musculatura de las extremidades, durante el desarrollo, permanece como una pregunta no resuelta.

Para evaluar la expresión de PGs específicos durante la formación de las extremidades delanteras, se aisló ARN total desde extremidades de ratón desde 10.5 a 14.5 dpc. Mediante RT-PCR, se determinaron los niveles de expresión de miogenina un FRM; de síndecán-1 y perlecan, dos PGs de heparán sulfato (PGHSs) y del receptor de FGF (FGFR-1). Como era esperado, se observó un incremento en los niveles de miogenina en 11.5 dpc. Síndecán y perlecan muestran una caída transitoria (~40%) en 11.5 dpc, mientras que los niveles del ARNm de FGFR-1 permanecen sin cambios.

Una aproximación similar fue seguida, usando un sistema *in vitro* en el que explantes de primordios delanteros (10.5 dpc) y traseros (11.5 dpc), fueron mantenidos en cultivo por 48 hrs. Bajo estas condiciones, se evaluaron, también, la expresión y síntesis de PGs mediante RT-PCR e incorporación de ^{35}S , respectivamente. Se realizaron análisis posteriores mediante digestión con GAGs-lasias y cromatografías de filtración en gel.

Estos resultados nos proveen de una herramienta poderosa para el estudio de los efectos regulatorios de la MEC en la activación del programa miogénico durante la formación de las extremidades.

Financiado por FONDECYT 1960634 y Cátedra Presidencial en Ciencias a E. Brandan. HO es becario CONICYT.

CARACTERIZACIÓN Y ESTRATEGIAS DE CLONAMIENTO DE GENES DE PROTEINAS DE APARATO DE GOLGI DE PLANTAS INVOLUCRADOS EN BIOSÍNTESIS DE POLISACARIDOS. (Characterization and Cloning Strategies of Genes Encoding for Plant Golgi Proteins Involved in Polysaccharide Biosynthesis) Yuseff, M. I., Norambuena, L. y Orellana, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La síntesis de hemicelulosas y pectinas de la pared celular primaria ocurre en el aparato de Golgi de la célula vegetal. Los sustratos utilizados son nucleótidos azúcares que son transportados al lumen del Golgi donde el azúcar es transferido por glicosiltransferasas. Después de la transferencia, los productos que se observan son Nucleósido Monofosfato y Fosforo Inorgánico, indicando que una actividad Nucleósido Difosfatasa esta asociada a la glicosiltransferasa. Hemos caracterizado una Nucleósido Difosfatasa de Golgi de células vegetales encontrando que es una proteína de membrana con el sitio activo orientado hacia el lumen. Con el fin de evaluar *in vivo*, a través de la obtención de plantas transgénicas, la participación de transportadores de nucleótidos azúcar y la enzima NDPasa, intentamos clonar estos genes usando una estrategia basada en la complementación funcional de genes homólogos de levaduras mutantes. Disponemos de mutantes de levadura con defectos de glicosilación: *gda-1* que tiene mutado el gen de GDPasa, y la mutante *vrp-4* que tiene mutado el gen para un transportador de GDP-manosa. Levaduras mutantes de glicosilación son sensibles a Higromicina B. Encontramos que las mutantes *gda-1* y *vrp-4* no crecieron en presencia de 30 µg/ml de este antibiótico. Esta sensibilidad se revirtió cuando se expresaron los genes normales en estas mutantes. Hemos analizado 8000 clones transformados con una genoteca de expresión de *Arabidopsis thaliana* aislando 4 clones que complementan *gda-1* y 9 clones que complementan *vrp-4*. La caracterización de estos cDNAs nos permitirá confirmar que se trata de genes que codifican para transportadores de nucleótidos azúcares o nucleósido difosfatasa de plantas. Financiado por Fondecyt 1970494

CAMBIOS EN EL COMPROMISO MIOGÉNICO EN RESPUESTA A MODIFICACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DURANTE DIFERENCIACION DE MIOBLASTOS C2C12 (Changes in myogenic commitment in response to extracellular matrix modification during C2C12 myoblasts differentiation). Osses, N. y Melo, E. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La diferenciación de mioblastos mononucleados a miotubos multinucleados es el evento final del compromiso de células de linaje miogénico. La ausencia de una matriz extracelular (MEC) organizada afecta negativamente la diferenciación muscular (Melo y cols., *J Cell Biochem*, 62:227-239, 1996). Sin embargo, no se sabe si la MEC modifica el compromiso miogénico. Con el fin de estudiar este efecto, indujimos diferenciación de mioblastos (C2C12) en cultivo en presencia de clorato, un inhibidor específico de la sulfatación de proteoglicanos que afecta la deposición y ensamble de componentes de MEC, y en presencia o ausencia de una MEC exógena (Matrigel). El cambio de linaje miogénico a osteoblástico se evaluó midiendo la actividad enzimática de marcadores de músculo y hueso, Creatina Quinasa (CK) y Fosfatasa Alcalina (FA) respectivamente. Mioblastos inducidos a diferenciarse por 8 días en presencia de clorato 30 mM presentaron una inhibición de un 56 % en la actividad de CK y un aumento de un 58 % en la actividad de FA. Este efecto se observó a partir del día 4 de diferenciación y fue dependiente de la concentración de clorato en el medio. La presencia de Matrigel 30 µl/cm² sobre los mioblastos en cultivo no modificó la actividad de CK observada en ausencia o presencia de clorato. Por el contrario, la actividad de FA durante la diferenciación fue siempre menor en presencia de Matrigel e independiente de la adición de clorato 30 mM. Además, el aumento de la actividad de FA inducido por el tratamiento con clorato es revertido por la adición de Matrigel al día 4 de diferenciación. Estos resultados indican que la ausencia de una MEC organizada cambia el compromiso miogénico de mioblastos C2C12 a un fenotipo osteoblástico.

Financiado por FONDECYT 1960634 y Cátedra Presidencial en Ciencias a Dr. E. Brandan. N.O. es becario CONICYT.

69

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE EPITELIO GÁSTRICO DE RATA. (Phenotypical characterization of rat gastric epithelial cell lines). CABELLO A., y GARRIDO J. Depto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El epitelio de revestimiento gástrico en la rata presenta una gran capacidad reconstitutiva como respuesta ante noxas que lesionan la continuidad epitelial. En este proceso es clave la capacidad migratoria de las células epiteliales que, en plazos muy breves, se desplazan para reparar el daño. Con el propósito de disponer de modelos *in vitro* en los cuales estudiar los mecanismos involucrados en esta migración y en su regulación, hemos aislado y cultivado células epiteliales de la mucosa pilórica de la rata. Hemos logrado mediante clonamientos sucesivos obtener poblaciones celulares fenotípicamente homogéneas, de las cuales han derivado dos líneas celulares de características estables, que por haber sido mantenidas en cultivo continuo por más de 50 pasajes consideramos espontáneamente inmortalizadas. Ambas líneas, denominadas ERG-1 y ERG-2, presentan cariotipo normal y morfología epitelial polarizada, pero carecen de especializaciones citoplásmicas de tipo secretorio. El análisis de las curvas de crecimiento de estas células revela tiempos de doblaje semejantes a los de líneas celulares epiteliales bien conocidas. Las células gástricas, sin embargo, difieren de líneas como MDCK en la permeabilidad a iones de las monocapas que constituyen. Pese a que no existen estudios morfológicos detallados de la renovación de las células en las unidades foveola/glándula de la región pilórica de la mucosa de la rata, pensamos que, tanto por su crecimiento rápido como por su indiferenciación morfológica, estas líneas celulares pueden haber derivado, por selección, de la población de células troncales encargadas de esa renovación. (Financiado por FONDECYT N°s 1951000 y 1980961)

71

REGULACION DE LA CAPTACION Y TRANSPORTE DE COBRE EN CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL. (Intake and outake regulation of copper in intestinal epithelial cells) Arredondo, M. Uauy R. Lab. de Microminerales, INTA, Universidad de Chile.

Las células manejan tanto el déficit como el exceso de metales a través de mecanismos que regulan la entrada, almacenamiento y salida de ellos. En este trabajo se evaluó cual o cuales de estos eventos están involucrados en la adaptación a concentraciones sub- y supra-fisiológicas de cobre en una línea celular de epitelio intestinal. Células Caco-2 fueron crecidas en sistemas bicamerales y expuestas a diferentes concentraciones de Cu-histidina (Cu-His) para cuantificar el contenido intracelular de Cu. Estudiamos la captación desde el lado apical y su transporte al medio basolateral utilizando ^{64}Cu -His. Los resultados mostraron que la captación de ^{64}Cu es saturable, con un componente lineal hasta una concentración de 1,5 μM y un máximo a 4,0 μM de Cu-His extracelular. Cuando las células fueron tratadas por tiempos mayores (2 semanas) en las diferentes concentraciones de Cu-His, la captación y el transporte fueron lineales. La captación apical de ^{64}Cu ocurrió frente a una exposición de 0,2 μM y aumentó junto con el aumento de cobre extracelular hasta una exposición máxima de 20,2 μM (2,5 y 21,0 pmoles ^{64}Cu /inserto/hr respectivamente). El transporte de ^{64}Cu desde el lado apical al basolateral mostró una respuesta inversa al de captación, siendo mayor a exposiciones de 0,2 μM (1,9 pmoles Cu/inserto/hr) que a 20,2 μM (0,5 pmoles Cu/inserto/hr). Por otra parte, cuando las células Caco-2 son preincubadas con Cu-His (0,2 μM) y son tratadas a 1 μM de ^{64}Cu -His, transfieren casi todo el ^{64}Cu al compartimiento basolateral, mientras que las células preincubadas con Cu-His (20 μM), lo retienen. Los resultados indican que los flujos del metal desde el lado apical al basolateral son afectados por la pre-exposición a Cu. Estos resultados sugieren que cuando las células son expuestas a concentraciones supra-fisiológicas de Cu disminuye su transporte, aumentando así su almacenamiento en el epitelio. Financiado por Fondecyt 3970009 y CIMM-Cobre-Salud-1997.

70

El péptido derivado del gen de la calcitonina (CGRP) aumenta los niveles de RNAm de acetilcolinesterasa (AChE) en células neuronales. Luza S.* Dpto. Biología Celular y Molecular. P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Dr. Nibaldo Inestrosa)

CGRP es un neuropéptido de diversas acciones fisiológicas que permiten clasificarlo como un agente trófico, neuromodulador y neurotransmisor. Dentro de estos efectos se sabe que el CGRP regula los receptores de acetilcolina, participa en la regulación trófica de la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en la unión neuromuscular y participaría en la regulación del crecimiento y maduración del sistema nervioso central (SNC). Las células de neuroblastoma de ratón Neuro-2 a, sintetizan AChE, la que puede permanecer asociada a la célula (formas G_1 y G_4) o ser secretada al medio (G_1). Estudios reportados anteriormente por nuestro laboratorio indicaban que la incubación de células Neuro-2 a diferenciadas con dibutilil AMPc en presencia de CGRP, aumentaba la actividad de AChE. Informamos ahora que a través de ensayos de Northern blot utilizando como sonda la subunidad catalítica de la AChE, se ha encontrado que CGRP aumenta los niveles intracelulares del RNAm de la enzima en Neuro-2 a diferenciadas. Los resultados de los posibles mecanismos de transducción por los cuales el péptido ejercería su efecto, indican que CGRP aumenta los niveles intracelulares de AMPc. Actualmente estudiamos mediante ensayos de unión y Northern blot la presencia del receptor de CGRP en estas células.

Financiado por proyecto FONDECYT 2960048 (S.L.) y por Catedra Presidencial en Ciencias (N. Inestrosa)

* Candidata a Dr en Bioquímica de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

72

EFFECTO DE LA EXPOSICION AGUDA O CRONICA A COBRE EN CELULAS HepG2: PARTICIPACION DE METALOTIONEINAS Y GSH EN EL ALMACENAMIENTO DE COBRE. (Effect of acute and chronic copper exposure in HepG2 cells: role of metallothionein and GSH in the cellular copper storage) González, M. y Tapia, L. Lab. Biol. Molecular, INTA, Univ. de Chile.

El estudio del metabolismo celular de cobre requiere evaluar cómo las variaciones en la concentración externa del metal afectan su tasa de transporte y su almacenamiento intracelular. Nuestro objetivo fue caracterizar el proceso de adaptación celular a Cu con el propósito de distinguir respuestas celulares tempranas y tardías frente a un aumento en la concentración extracelular de cobre. Para ello, células HepG2 fueron expuestas en forma aguda (minutos-horas) y crónica (días-semanas) a concentraciones variables de Cu-His en el medio de cultivo. En ambas condiciones se midieron: 1) La viabilidad celular mediante azul tripan y ensayos de reducción de MTT; 2) el contenido intracelular de cobre, hierro y zinc mediante espectrometría AAS o TXRF; 3) el contenido intracelular de GSH utilizando GSH reductasa; 4) la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} con el quelante de Cu, batocupreina; y 5) el uptake de Cu^{++} midiendo la incorporación de ^{64}Cu . Nuestros resultados indican que la viabilidad aumenta en aquellas células que son expuestas en forma crónica a este metal y que esto se acompaña de un notable aumento en el contenido intracelular de Cu. No se observaron diferencias significativas en los otros parámetros medidos. Estos resultados indican que el proceso de almacenamiento de Cu es fundamental en la adaptación celular frente a cambios, agudos o crónicos, en la concentración extracelular de este metal. La disminución en el contenido de GSH via BSO no interfiere en el aumento en el contenido intracelular de Cu, sin embargo se observó un cambio en el contenido y la distribución subcelular de metalotioneinas sugiriendop fuertemente la participación de ésta en el mecanismo de almacenamiento celular de Cu, durante el proceso de adaptación. Financiado por: Fondecyt 3970009, Fundación Andes-Programa C-13222/3.

Caracterización de un complejo remodelador de cromatina (BAF) específico de cerebros de ratón. (Characterization of a chromatin remodelling complex (BAF) specific of rat brain). Ivan Olave y Gerald R. Crabtree. Howard Hughes Medical Institute, Department of Developmental Biology, Stanford University, Stanford, California 94305, USA.

En la célula eucariote, uno de los efectos que tiene la compactación del ADN en nucleosomas, es la represión general del proceso de transcripción génica. Sin embargo, durante el desarrollo, diferenciación celular y en respuesta a ciertos estímulos extracelulares, la remodelación de cromatina precede o ocurre paralelamente con la inducción de la transcripción de distintos genes. Recientemente, distintos complejos de proteínas implicados en este proceso han sido aislados en *Saccharomyces cerevisiae* (SWI/SNF y RSC), *Drosophila* (CHRAC, NURF y ACF) y humanos (BAFs). En presencia de ATP, estos complejos no sólo tienen la capacidad de alterar el espaciado regular de nucleosomas reconstituidos *in vitro*, sino que también aumentan la afinidad de unión de factores específicos de transcripción por sus sitios presentes en el ADN en nucleosomas.

La homología entre cinco subunidades presentes en los complejos SWI/SNF de *S. cerevisiae* y BAF en humanos indican la importancia de este último en dicho proceso. Sin embargo, el complejo BAF es también altamente heterogéneo. Sus subunidades varían entre 9 a 12 dependiendo del tipo de célula del cual es aislado. Una de estas subunidades, llamada BAF53, fue analizada en este trabajo. Se han aislado dos cDNAs que codifican para dos proteínas BAF53 (BAF53a y BAF53b) altamente homólogas (84% idénticas). Mientras BAF53a es expresada y forma parte de complejos BAFs aislados desde extractos nucleares de diferentes tejidos de ratón; BAF53b es encontrada exclusivamente en extractos nucleares de cerebro, y forma parte de un complejo BAF presente específicamente en este tejido. Las características de este complejo específico serán discutidas.

75

ESTUDIO DE DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Vitis vinifera* L. POR PCR, MEDIANTE EL USO DE SECUENCIAS PARTIDORAS AL AZAR Y MICROSATELITES "ANCHORED-PRIMER" Herrera, R., Cares, V. Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca. (Patrocinio: E. Hubert).

La técnica de PCR ha facilitado el estudio de diversidad genética de las especies o individuos dentro de una población. Esta técnica permite dependiendo del partidor utilizado la amplificación selectiva de fragmentos de DNA, generando así patrones moleculares sobre los cuales se determina el grado de relación o divergencia entre los individuos. Además, PCR permite la identificación clonal (tipificación), y de *loci* cuantificables, permitiéndose en base a ellos la selección asistida por marcadores.

Para estudiar las diferencias genéticas de *Vitis vinifera* L., se generaron los patrones moleculares por PCR de los cultivares de *Vitis vinifera* L. más usados en la zona central de Chile.

Se logró una buena calidad del DNA cromosomal luego de modificar el método tradicional de extracción. Dos partidores con secuencias al azar generaron el patrón genético propio de cada cultivar en estudio: Cabernet sauvignon, Merlot, Carménère, Cabernet franc en vinos tintos y Sauvignon blanc, Chardonnay y Sauvignonasse en vinos blancos.

Se encontraron las diferencias genéticas en clones del cultivar Merlot, al utilizar secuencias microsateles "anchored-primer" como partidores. Dichos partidores correspondieron a secuencias de unidades dinucleotídicas repetidas de 20 mer de largo en promedio. La separación de los fragmentos en geles de poliacrilamida, se realizó luego de 35 ciclos de: 94°C (1 min), 55°C (2 min) y 72°C (1:30 min). Se usó tinción de plata para visualizar los fragmentos amplificados. Los clones estudiados presentaron bandas de DNA diferentes, sugiriendo que no corresponden entre sí, a individuos de propagación asexual.

Financiado por: DIUT 454/IPS/UNESCO

ROL DE LA MATRIZ EXTRACELULAR OSEA EN LA INVASION TUMORAL DE ORIGEN MAMARIO. (Role of the bone extracellular matrix on breast tumoral invasion). M. Fuentes y J. Martínez. Laboratorio de Biología Celular e Inmunología, INTA, Universidad de Chile.

El esqueleto es un tejido frecuentemente invadido por células tumorales. En los estadios tardíos de la progresión metastásica, tumores como el de mama o próstata invaden el hueso causando una reacción osteoblástica (en el caso del tumor de próstata) u osteolítica en el caso del tumor mamario.

En trabajos previos hemos comunicado que la matriz extracelular (MEC) generada por una línea celular de origen óseo (SaOS-2) era capaz de inducir un aumento en la capacidad invasiva de células mamarias dependientes de estrógeno (MCF-7) que se expresaba en un estímulo sobre la capacidad migratoria, invasiva y secretoria de enzimas proteolíticas como uroquinasa (u-PA) y metaloproteinasas (MMPs).

En el presente estudio mostramos que una proporción importante de la actividad u-PA secretada por las células tumorales de mama se deposita en la MEC ósea en una especie de tamaño molecular mayor. En este complejo probablemente participa una especie soluble del receptor de u-PA (u-PAR) que se une a la MEC ósea. Esta sugerencia resulta del hecho que el nivel de expresión del receptor de u-PAR en dos líneas celulares de mama de diferente potencial invasivo se correlaciona con la capacidad de unión de u-PA en matrices "mixtas" (compuestas por MEC ósea y la generada por la célula de mama) y con la conocida capacidad de la célula invasiva (MDA-231) de producir u-PAR soluble. Se discuten estos resultados de cara al rol de u-PAR en la adhesión celular.

Se presenta además estudios que muestran que la producción de MMPs por parte del sistema mixto corre por cuenta de la célula mesenquimal y se le atribuye a la célula mamaria un rol en la activación de estas enzimas.

Financiamiento: Fondecyt 8970028.

76

Análisis genético de variedades de durazneros y nectarines mediante AFLP. *Genetic analysis of peach and nectarin varieties using AFLP.* Augusto Manubens¹, Yael Jadue², Rosa Messina², Manuel Ullaser¹, Daniela Seelensfreund¹ y Sergio Lobos¹. ¹Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Departamento de Semillas, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

En los últimos años se han desarrollado diversos métodos de análisis genético tales como RFLP, RAPD, SSCP, microsatélite/PCR, entre otros. Un nuevo método denominado AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción, combinando la selectividad de los RFLP y la potencia de la técnica de PCR. El AFLP permite un análisis rápido y reproducible de polimorfismos genéticos independiente del tipo de tejido y etapa de su desarrollo, diferenciando variedades de plantas de una misma especie y no requiriendo de conocimiento previo de las secuencias a analizar. Nosotros hemos aplicado esta técnica con 14 variedades de durazneros y nectarines. El DNA extraído a partir de hojas de las distintas variedades fue digerido con las enzimas EcoRI y MseI y luego los fragmentos fueron amplificados mediante PCR, usando 64 combinaciones de parejas de partidores. Once parejas de partidores fueron capaces de diferenciar todas las variedades de frutales en base a sus polimorfismos genéticos. Debido a la complejidad que presenta el análisis de los patrones de AFLP obtenidos, se diseñó una metodología de representación gráfica, calculando sus tamaños relativos mediante marcadores de tamaño de DNA. Los gráficos de monomorfismos mostraron patrones similares para las diferentes variedades de una misma especie. En cambio, la representación de los polimorfismos de AFLP permite apreciar diferencias claras entre variedades de una misma especie.

La técnica AFLP tiene también importantes proyecciones como una herramienta de análisis de la estructura genómica de alta resolución, que permite identificar marcadores moleculares de interés. Esta información se visualiza como un importante suplemento a la descripción morfológica corrientemente usada para la descripción de variedades de plantas.

Este proyecto fue financiado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y la Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas, U. de Chile. (Proyecto de Investigación FAC-SAG/SEM-001/97).

77

EXPRESIÓN DE LOS GENES *tfdCDEF-1* DEL CATABOLISMO DE CLOROCATECOLES EN *Ralstonia eutropha* (Expression of *tfdCDEF-1* genes for chlorocatechol catabolism in *Ralstonia eutropha*). González, B., Guzmán, L., Clément, P., & Varela, C. Depto. Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

En bacterias que degradan contaminantes cloroaromáticos, como *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), la degradación completa de 3-clorobenzoato (3-CB) requiere la transformación de clorocatecoles a β -cetoadipato. Hasta hace poco se creía que el catabolismo de clorocatecol en dicha bacteria estaba codificado en el mensaje policistrónico de los genes *tfdCDEF-1* presentes en el plasmidio pJP4, y cuya expresión estaría regulada por el gen *tfdR*. Sin embargo, la secuenciación reciente de una región catabólica de pJP4, ha revelado la existencia de los genes *tfdDCEF-2*, de secuencia similar a *tfdCDEF-1*, pero de bioquímica desconocida. Por ello en este trabajo se determinó si la expresión del módulo *tfdCDEF-1* es, en sí, suficiente para permitir la degradación de clorocatecoles y el crecimiento en 3-CB. Para ello se compararon los niveles de deoloración (suma de las actividades de las cuatro enzimas del módulo) y la actividad específica de la primera enzima (*TfdC*), en una inserción cromosomal del operón *tfdR-P_{tfdR}-tfdCDEF-1*, con respecto a la cepa silvestre o a mutantes que tienen pJP4 integrado en el cromosoma, o que han experimentado una delección/duplicación de los genes *tfd*. Los resultados indican i) que los niveles de expresión del módulo-1 son 2 a 5 veces menores que los de la cepa silvestre, o la que contiene la delección/duplicación; y ii) que una copia del módulo-1 o la integración del pJP4 en el cromosoma hace que la expresión de los genes *tfd* sea insuficiente para permitir el crecimiento en 3-CB. Estos resultados sugieren que la capacidad para crecer en 3-CB requiere de la participación de los genes del módulo-2, de más de una copia del módulo -1 y/o de una modificación de los genes regulatorios.

Financiado por los proyectos FONDECYT 1960262, 3970030 y 2980046. P. Clément es becaria de Doctorado CONICYT.

79

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE β -ACTINA EN EL PEZ *C. carpio* ACLIMATIZADO ESTACIONALMENTE. (Differential β -actin expression in the fish *Cyprinus carpio* under seasonal acclimatization). Sarmiento, J., Leal, S., and Krauskopf, M. Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile, Valdivia y Universidad Nacional Andrés Bello, Santiago, Chile.

Los ectotermos euritermales están sometidos a cambios cíclicos del medio ambiente, en particular de temperatura y fotoperíodo, situación que demanda estrategias adaptativas entre las cuales se encuentra una reprogramación fisiológica estacional que compromete respuestas moleculares complejas, siendo la más destacada, una modulación articulada de la transcripción. En nuestro laboratorio se ha demostrado que el control estacional ciclo reversible implica, en la carpa, a genes como el de los rRNA (Vera *et al.*, *Comp. Biochem Physiol. Biochem. & Mol.* 118 B, 777-781, 1997). Recientemente, Tiku *et al.*, (*Science* 271: 815-833, 1996), determinaron, por análisis de *Northern*, que la transcripción de una desaturasa estaba elevada en carpas aclimatadas a frío. Aunque el resultado explica adecuadamente los cambios que acontecen en la fluidez de la membrana que ocurre en frío, la diferencia observada entre ambos estados adaptativos se sustenta en patrones considerados constitutivos como la expresión de rRNA y de β -actina.

Para evaluar si β -actina, al igual que los rRNA se expresa diferencialmente en carpas sometidas a aclimatización, situación que obligaría a reexaminar los resultados que se han reportado sobre transcripción en peces cuando se usan patrones supuestamente constitutivos con el fin de cuantificar diferencias, hemos construido un sistema de RT-PCR-MIMICS que permite la cuantificación de la expresión de un gen recurriendo a DNA competidores conocidos. En conocimiento de la estructura primaria del mRNA de β -actina, construimos un DNA competidor no homólogo que comparte en sus extremos la secuencia de los partidores que amplifican específicamente un fragmento del cDNA de β -actina. Con la implementación de este sistema hemos cuantificado la transcripción de β -actina en 4 órganos del pez *Cyprinus carpio* aclimatizado a verano e invierno para determinar si se comporta constitutivamente frente a los cambios estacionales del hábitat del pez. Nuestros resultados demuestran que la transcripción de β -actina en cerebro de carpa supera, en el pez aclimatizado a verano, 4,6 veces la expresión que éste alcanza durante la estación fría.

Financiado por FONDECYT 1970651

78

IDENTIFICACION DE GENES DE *Thiobacillus ferrooxidans* CODIFICANTES PARA PROTEINAS DE MEMBRANA CUYAS EXPRESIONES CAMBIAN CON LA FUENTE ENERGETICA. N. Guiliani (Socio patrocinante: C. A. Jerez) Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

nguiliani@cancla.med.uchile.cl - cjerez@machi.med.uchile.cl

El primer paso de la biooxidación del hierro contenido en minerales por *Thiobacillus ferrooxidans*, requiere de un contacto entre la bacteria y el mineral. La adhesión de *T. ferrooxidans* sobre el mineral resulta de interacciones hidrofóbicas en las cuales pueden estar involucrados lipopolisacáridos y/o proteínas de membrana externa. En la cadena respiratoria de *T. ferrooxidans* que va desde el ion ferroso hacia el oxígeno, los transportadores de electrones identificados han sido localizados en el periplasma o en la membrana interna. Algunos de los primeros aceptores de electrones podrían estar localizados en la membrana externa y, además, participar en la adhesión. Para intentar su aislamiento, hemos comparado la expresión de proteínas de la membrana externa de *T. ferrooxidans* cultivado en hierro o en azufre.

Desarrollamos un protocolo de separación de tres fracciones proteicas: proteínas solubles, proteínas de membrana interna y proteínas de membrana externa. La comparación del patrón proteico de estas diferentes fracciones obtenidas de *T. ferrooxidans* cultivados en hierro o azufre ha permitido asociar la expresión de algunas proteínas a la fuente energética usada. Mediante electroforesis bidimensional, hemos aislado y purificado varios polipéptidos. Para identificar los genes codificantes respectivos, hemos determinado la secuencia NH₂-terminal de cada uno de ellos y la secuencia NH₂-terminal de varios péptidos internos. Con estos resultados hemos aislado y secuenciado dos genes: *omp40* y *p30*. La secuencia deducida de la proteína *Omp40* no presenta similitud con otras proteínas de membrana externa conocidas. La secuencia parcial de *P30* presenta un alto nivel de similitud con las proteínas *CbbQ*, *NorQ* and *NirQ*.

Financiado por proyectos FONDECYT P3960002 y ICGEB 96/007.

80

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN DE snoRNA U3 IMPLICADO EN LA REGULACIÓN ESTACIONAL DE LA EXPRESIÓN NUCLEOLAR DE LA CARPA. (Isolation and characterization of the U3 snoRNA gene involved in the seasonal regulation of nucleolar expression in the carp) Quezada, C., Muñoz, E., Vera, M. J. Universidad Austral de Chile, Valdivia y Universidad Nacional Andrés Bello, Santiago.

El proceso de aclimatización de peces euritermales, envuelve la expresión diferencial de genes. En carpas aclimatizadas a invierno, la transcripción y el procesamiento del precursor de RNA ribosomal (pre-rRNA) es escaso comparado con ambos eventos en carpas adaptadas a verano. A nivel ultraestructural, la aclimatización invernal produce segregación de los componentes nucleolares, rasgo morfológico que indica inactivación temporal de la expresión de genes de rRNA. Concomitantemente, el contenido celular de rRNA y del pequeño RNA nucleolar U3 (snoRNA U3) está notablemente disminuido en invierno. Por el contrario, durante el verano, la transcripción y maduración de estos precursores y el contenido de snoRNA U3 son notoriamente mayores en comparación con lo observado en invierno. U3 es el más abundante de los pequeños RNA nucleolares y es esencial para los eventos tempranos de maduración de los pre-rRNA.

Para comprender los mecanismos moleculares implicados en la regulación estacional de la expresión del gen de snoRNA U3 en la carpa, es necesario conocer su secuencia codificante y de la región reguladora, a través de la obtención de clones genómicos que las contengan. Con este propósito, utilizando una sonda homóloga sintetizada por PCR a partir de cDNA oligo-específico y partidores derivados de secuencias consenso, se aislaron bandas desde un *Southern* de DNA genómico de carpa y se construyeron bibliotecas parciales. El rastreo se realizó con la misma sonda homóloga aislandose los clones positivos. El análisis de secuencia de estos últimos y su comparación con las de otras especies, permitirá avanzar en el conocimiento de los elementos *cis* reguladores y los mecanismos moleculares que subyacen en la regulación estacional de genes implicados en la expresión nucleolar de la carpa. Asimismo, se progresará en el estudio comparativo de la secuencia codificante de este gen y sus relaciones evolutivas con las de otras especies.

Proyecto FONDECYT 1970633.

EL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS HEPATITIS B HUMANO (HBsAg) INTERACCIONA CON UNA PROTEÍNA DEL APARATO DE GOLGI. (HBsAg interacts with a protein of the Golgi complex). **Mardones G.** Departamento Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile (Patrocinio: **A. González**).

Las células epiteliales con fenotipo polarizado, tienen la capacidad de segregar proteínas específicas, tanto de secreción como de membrana, a vesículas de transporte apical y basolateral que se generan en la red trans del aparato de Golgi (TGN). Se piensa que este proceso ocurriría por intermedio de señales específicas, presentes en las proteínas, que serían reconocidas por receptores de destinación. De hecho, se han descrito señales para la destinación apical y basolateral de proteínas de membrana. Sin embargo, estas señales permanecen desconocidas en proteínas de secreción, al igual que los putativos receptores de destinación. En nuestro laboratorio estamos estudiando el modelo del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana (HBsAg). Hemos encontrado que se secreta apicalmente al expresarlo mediante transfección en células epiteliales polarizadas, como MDCK y FRT. Con el fin de identificar una proteína de Golgi que pudiera corresponder a un receptor de destinación, hemos realizado experimentos de "ligand-blot" en fracciones enriquecidas en membranas de Golgi preparadas de hígado y riñón de rata. Observamos unión de ¹²⁵I-HBsAg a una proteína de 40 kDa, termosensible, dependiente de pH, saturable, y desplazable por competencia con un exceso de proteína fría.

(Financiado por FONDECYT # 1980974 y Cátedra Presidencial en Ciencia).

EXPRESION DE CITOQUINAS Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4) EN INDIVIDUOS CON FIEBRE REUMÁTICA. (Cytokine expression in rheumatic fever patients). **González, M., Lobos, C., Carrón, F., Lasagna, N., Carmona, S. y Figueroa, F.** Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. (Patrocinio: **Y. Repetto**).

La Enfermedad reumática aguda (ERA) es una afección de naturaleza autoinmune que se presenta en respuesta a una infección por *Streptococo* β -Hemolítico Grupo A (EBGA) en individuos genéticamente predisuestos. Resulta de interés que solo un 3 %, de las personas con infección presentan la enfermedad. Ello sugiere que existen ciertos condicionantes de la respuesta inmune que determinan la aparición de ERA. Recientemente, se ha puesto en evidencia que la forma clínica de algunas enfermedades infecciosas y autoinmunes es dependiente del patrón de citoquinas que se producen. En el hombre, se describen poblaciones celulares Th1 y Th2 que se caracteriza por la producción preferente de IFN- γ o IL-4. En este estudio se investigó mediante reacción de polimerasa en cadena (PCR) la expresión de IFN- γ e IL-4 en pacientes con enfermedad Reumática Inactiva (ERI).

Se aislaron mononucleares de sangre periférica (MSP) de 9 pacientes con ERI y 5 controles sin antecedente personal o familiar de ERA. De cada uno se obtuvieron muestras basales y estimuladas con anti-CD3 (60 ng/ml), de las que se extrajo ARN. A partir de 1 μ g de ARN se realizó la transcripción a ADN complementario que se utilizó como template en las reacciones de PCR. Se agregó un estándar interno específico, de concentración conocida para cada citoquina. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 2% en presencia de bromuro de etidio.

Todos los pacientes con ERI que estudiamos presentaron expresión basal de citoquinas (67% IL-4, 78% IFN γ), pese a encontrarse clínicamente inactivos. En contraste, en ninguno de los controles se detectó expresión basal de IL-4 o IFN- γ . Como era de esperar, tanto controles como pacientes expresan ARN mensajero para ambas citoquinas luego de estímulo con anti-CD3. La cuantificación densitométrica de los productos de PCR demostró que los pacientes expresan el doble de IL-4 e IFN- γ que los controles.

Estos datos demuestran que los pacientes con ERI difieren de los individuos normales por cuanto presentan expresión basal de citoquinas Th1 y Th2 y porque presentan niveles elevados de citoquinas en respuesta a estímulo. Ello permite postular que existe un trastorno biológico de estos pacientes que se asocia a un estado basal de activación de las células del sistema inmune.

Proyecto Fondecyt 197-0117

CÉLULAS PROGENITORAS MESENQUIMÁTICAS HUMANAS COMO BLANCO DE TRANSFERENCIA GÉNICA MEDIADA POR VECTORES ADENOVIRALES. (Human bone marrow mesenchymal progenitor cells as a target for adenoviral-mediated gene transfer). **Conget, P. y Minguelli, J.J.** Laboratorio de Biología Celular, INTA, Universidad de Chile.

Las células de estroma de la médula ósea (MO), entre las cuales se encuentra una población de células progenitoras mesenquimáticas (CPM), producen los factores adhesivos y las citoquinas que regulan la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Las CPM son accesibles y pueden ser cultivadas, por lo que representan un potencial vehículo para destinar transgenes a la MO. En este trabajo, a partir de MO humana se aislaron y expandieron *in vitro* CPM. Estas células son adherentes y presentan morfología típica de fibroblastos. En condiciones estándar de cultivo (α -MEM + SFB 10%), el tiempo de duplicación poblacional fue de 33 h; 90% de las células estaban en fases G0/G1 del ciclo celular y fue posible expandirlas hasta 25 veces antes de que murieran por apoptosis. Estas células expresan los antígenos característicos de las CPM, reconocidos por los anticuerpos SH2, SH3, SH4 y la actina α de músculo liso. También expresan las cadenas de integrinas α 4, α 5, β 1; ICAM-1, VCAM-1, CD44H; vWF; citoqueratinas y sintetizan moléculas de matriz extracelular (fibronectina, colágeno I y VI). Las CPM son negativas para PECAM-1, ESA, CD14, CD34, CD45. Las CPM fueron transfectadas con vectores adenovirales (Adv) deficientes en su replicación que contienen el gen lacZ bacteriano (Ad5CMVlacZ) o el gen GFP (proteína fluorescente verde, Ad5CMVGFP), bajo el control del promotor de CMV. Mientras la expresión del transgen lacZ se evaluó por tinción con X-gal o FDG, la expresión de GFP se evaluó directamente por citometría de flujo. Cuando las CPM se infectaron con los Adv (MOI $\geq 10^3$ por 6 h) aproximadamente el 20% de las células expresó el transgen, manteniéndose la expresión *in vitro* por al menos 10 días. La eficiencia de la transferencia génica no pudo mejorarse prolongando el tiempo de infección, ni tampoco aumentando la MOI usada dado los efectos citopáticos. Al analizar en las CPM la presencia de los receptores de unión (CAR) e internalización (integrinas α v β 3, α v β 5) utilizados por los Adv, se encontró que estos se expresaban en una subpoblación de menor tamaño relativo (20% de las células), que resultó ser heterogénea sólo para estos antígenos. Estos resultados muestran que las CPM pueden ser transfectadas con Adv y al ser trasplantadas, podrían expresar en la MO en forma transitoria el producto de un transgen (citoquina, molécula de adhesión o factor de crecimiento), que facilite la recuperación hematológica post-trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. (Financiamiento: FONDECYT 2970016, 8970028 P.C. es becaria de Fundación Andes)

84
IMMUNONEUTRALIZACIÓN DEL COMPLEJO ÓRGANO SUBCOMISURAL-FIBRA DE REISSNER MEDIANTE LA TRANSFERENCIA MATERNA DE ANTICUERPOS A TRAVÉS DE LA PLACENTA Y DE LA GLÁNDULA MAMARIA (Immunoneutralization of the subcommissural organ-Reissner's fiber complex by maternal transfer of antibodies through the placenta and mammary gland) **Vio K, Wagner C, Barria M, Rodríguez S.** Instituto Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile Valdivia

El órgano subcomisural (OSC) es una glándula cerebral que secreta glicoproteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR), donde se agregan para formar una estructura denominada fibra de Reissner (FR), que se extiende a lo largo del acueducto de Silvio (AS), y el canal central de la médula espinal. Se desarrolló un modelo experimental que permite la inmunoneutralización del complejo OSC-FR mediante la transferencia materna de anticuerpos (Ac) anti-FR a los fetos via placentaria, y a las crías a través de la leche. Ratas hembras fueron inmunizadas con glicoproteínas constitutivas de la FR y preñadas entre la segunda y tercera inmunización. Se obtuvieron muestras de sangre de la madre a los 12, 17, y 19 días de preñez y en el día del parto. Se tomaron muestras de sangre y LCR de fetos los días E-17 y E-19, y de las crías en PNI y a las 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 12 semanas. Se recolectó leche del estómago de las crías durante las tres primeras semanas post-natal. Las muestras fueron utilizadas para caracterización por inmunocitoquímica y cuantificación por ELISA de los Ac contra glicoproteínas de la FR. Los Ac maternos llegan a la sangre y LCR fetal a través de la placenta y a las crías por medio de la leche. Los Ac anti-FR se detectaron en la sangre y LCR durante los dos primeros meses de edad. Estos Ac presentes en el LCR de las crías se unieron específicamente a las glicoproteínas de la FR, bloqueando su formación. Estos animales privados de FR, presentaron alteraciones en el SNC, tales como hidrocefalia moderada y trastornos en el clearance de monoaminas del LCR. En alrededor del 30% de las crías estas alteraciones conducen a la muerte durante el primer mes de vida.

FONDECYT E.M. Rodríguez 197-0627

85

ESTERES DEL ACIDO GALICO COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL DE CELULAS TUMORALES. (Esters from gallic acid as selective mitochondrial respiration inhibitors from tumoral cells). *Pavani, M., **Cordano, G., *Guerrero, A., **Muñoz, S., **Medina, J., **Rivera, E. y *Ferreira, J. *Programa Disciplinario de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina y **Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El ácido gálico es un polifenol ampliamente distribuido en vegetales. Posee algunas actividades, como: antimutagenicidad, anticarcinogenicidad, actividad antiviral y antioxidante. Es citotóxico contra una amplia variedad de células cancerosas; pero no lo es contra cultivos primarios de hepatocitos de rata y macrófagos y es levemente citotóxico contra fibroblatos y células endoteliales. Sus ésteres simples presentan mayor efecto, el cual aumenta con el número de átomos de C del alcohol. Estudios con compuestos estructuralmente relacionados, sugieren que los tres grupos hidroxilos adyacentes son responsables de la citotoxicidad y se requiere del grupo carboxilo para distinguir entre las células cancerosas y normales (Inoue y col. Biol. Pharm. Bull. 18:1526-1530, 1995).

Hemos estudiado el efecto de varios sus ésteres sobre la respiración celular del carcinoma de ratón TA3, de su sublínea multiresistente TA3-MTX-R, del sarcoma S786 y de hepatocitos de rata. La velocidad de respiración fue inhibida, tanto en presencia como en ausencia del desacoplante CCCP, lo cual sugiere que son bloqueadores del transporte de electrones de la cadena respiratoria. El grado de inhibición, si bien aumenta con el número de átomos de C y la ramificación del alcohol, fue similar para ambas líneas tumorales, incluyendo a la sublínea multiresistente. En hepatocitos, una inhibición similar es obtenida a una concentración alrededor de 7 veces mayor, lo cual sugiere un grado de selectividad muy importante hacia las células tumorales, que no fue alterada por la esterificación. Mediante el uso de dadores de electrones a distintos niveles de la cadena respiratoria, hemos concluido que el sitio de acción es a nivel del Complejo I. Por consiguiente, la síntesis de ATP mitocondrial estaría inhibida y este hecho estaría relacionado con la citotoxicidad selectiva de estos compuestos contra las células tumorales. Financiamiento: FONDECYT 1981066

87

EFFECTO DE LIGANDOS SOBRE LA ESTABILIDAD DEL MONÓMERO DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *E. coli* EN DISTINTOS ESTADOS DE AGREGACION. (Effect of ligands on the stability of the monomer of phosphofructokinase-2 of *E. coli* in different aggregation states). Cabrera, R., Guixé, V., Rodríguez, P.H. y Babul, J. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

Fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2) es inhibida alostericamente por el sustrato MgATP, ligando que provoca el cambio en el estado de agregación de la enzima de dímero a tetramero. Debido a que estos cambios conformacionales pueden afectar la estabilidad y el grado de compactación de los monómeros de la enzima, se intentó caracterizarlos estudiando el efecto de los ligandos, MgATP y fructosa-6-P, sobre la proteólisis limitada y el estado de agregación de la enzima. Se realizaron medidas de actividad enzimática, cromatografía de exclusión molecular en columnas de alto rendimiento y electroforesis en presencia de SDS

En presencia de MgATP la actividad enzimática y la integridad de la cadena polipeptídica de Pfk-2 están protegidas de la acción de la tripsina y se observa una dependencia sigmoidea del efecto protector con respecto a la concentración del ligando. En MgATP 1 mM, la enzima adopta una conformación completamente resistente al ataque proteolítico. En cambio, en presencia de fructosa-6-P 1 mM, se observa un efecto protector intermedio comparado con el control en ausencia de ligandos.

Para determinar si el efecto protector de MgATP se correlaciona con un cambio en el estado de agregación de la enzima, se realizaron experimentos de exclusión molecular. Al aumentar la concentración de MgATP se observa un aumento sigmoideo de la formación del tetramero con una concentración media de 50 μ M, similar a la curva de protección observada en los experimentos de digestión triptica

Por otra parte, al utilizar una proteasa inespecífica como proteinasa K, se observa que el efecto de los ligandos es similar al con tripsina. Estos resultados indican que la protección ejercida por los ligandos al ataque proteolítico de la enzima, se debe a un cambio global de la estructura, en donde las subunidades en el dímero y en el tetramero adoptan una conformación más compacta que en ausencia de ligandos

Financiado por Proyecto Fondecyt 1981091.

MODELO 1:

REGULACION DE FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS

86

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE LA FORMACION DE LOS PROTOESCOLICES DE *Echinococcus granulosus* EN QUISTES FERTILES Y SU UTILIZACION EN EL RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS MARCADORES DE FERTILIDAD. (Morphogenesis of protoescolices of *E. granulosus* in fertile cysts and its utilization in the recognition of antigens markers of fertility). Gairido, M.; Marchant, C.; Sanchez, G.; Lopez, F. y Galanti, N. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Un adecuado diagnóstico de la hidatidosis implica la discriminación por métodos serológicos entre quistes hidatídicos infértiles y aquellos productores de protoescolices (quistes fértiles). En este trabajo se estudió y caracterizó por microscopía de luz, electrónica de barrido y de transmisión, la formación de protoescolices de *E. granulosus* a partir de la capa germinal de quistes fértiles.

En una primera etapa, se forman pequeñas yemas celulares que emergen de la capa germinal. Posteriormente, las yemas crecen y se elongan. En una tercera etapa comienzan a aparecer los territorios presuntivos que darán origen, en una etapa final, a las regiones morfológicas que estructuran un protoescolice maduro. El protoescolice se mantiene unido a la capa germinal durante todo el proceso de formación. Sin embargo, a partir de la tercera etapa se advierte un aislamiento celular de la yema respecto a la capa germinal, lo que sugiere que este proceso continúa en forma independiente de la capa germinal.

Esta caracterización morfológica de las distintas etapas en la formación de los protoescolices permitiría la localización celular de antígenos de *E. granulosus* de interés diagnóstico para la detección de esta parasitosis.

Proyectos FONDECYT No. 1970766 y RTPD (SIDA/SAREC)

88

ARABINOFURANOSIDASA, UNA ENZIMA DESRAMIFICANTE DEL XILANO. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA ENZIMA DE *Penicillium purpurogenum*. (Arabinofuranosidase, a xylan debranching enzyme. Purification and properties of the enzyme from *Penicillium purpurogenum*). De Ioannes, P.¹, Peirano, A.¹, Steiner, J.² y Vyzaguirre, J.¹. ¹Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Universidad Católica de Chile y ²Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. (Patrocinio: P. Bull).

El xilano es un heteropolímero constituido por una cadena principal de xilosas unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4), la cual se encuentra sustituida, entre otros, por residuos de arabinosa. Para la biodegradación de este polímero se requiere la acción concertada de una serie de enzimas. El hongo *Penicillium purpurogenum*, al crecerse en un medio hemicelulósico, secreta una gran cantidad de glicanasas, entre ellas α -L-arabinofuranosidasa (ARF) (E.C. 3.2.1.55), responsable de la remoción de los residuos de arabinosa del xilano.

Se creció el hongo 5 días en un medio líquido con xilano de cáscara de avena (XO) como fuente de carbono. El sobrenadante de cultivo se utilizó para la purificación de la enzima. Se ensayó la actividad ARF midiendo la hidrólisis de p-nitrofenil arabinofuranósido (pNPA).

La enzima se purificó a homogeneidad. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración seguido de un corte con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0 - 80% saturación) y fraccionamiento cromatográfico por filtración en gel (BioGel P-100), intercambio iónico (CM-Sephadex A-50), interacción hidrofóbica (fenil agarosa), y filtración en gel (BioGel P-100), obteniéndose un 7% de rendimiento. La enzima purificada es un monómero de 50 kDa, con pI de 6,5 y es una proteína glicosilada. Entre sus características cinéticas, presenta una elevada especificidad por pNPA, con T óptima de 50°C y pH óptimo 4.0. La cinética es hiperbólica y el K_M es de 1,3 mM. Mediante TLC se determinó que la ARF es capaz de remover arabinosa de XO. La secuencia amino terminal posee una identidad de sobre 72% respecto a otras ARF de hongo. Financiamiento: FONDECYT Proyecto N° 1960241 y DIPUC.

CRISTALIZACIÓN Y MODELO A BAJA RESOLUCIÓN DE R-FICOERITRINA DE *Gracilaria chilensis*. (Crystallization and low resolution Model of R-Phycocerythrin from *Gracilaria chilensis*) José Martínez, Carlos Contreras, Juan Fontecilla Camps* y Marta Bunster. *LCCP, IBS, Grenoble, and Lab. Biofísica Molecular, Fac. Cs. Biológicas, Universidad de Concepción.

R-ficoeritrina es un heterodímero (subunidades a y b), proteína componente del ficobilisoma, agregado macromolecular responsable de complementar la captación y conducción de energía luminosa en algas y cianobacteria. Se purificó la proteína desde el alga, utilizando precipitación fraccionada y cromatografías convencionales de intercambio iónico en gradiente inverso y una última etapa de FPLC. La obtención de monocristales se realizó mediante la técnica de la gota sentada utilizando el método de los factoriales incompletos.

Cristales hexagonales y alargados (0.1x 0.1x 0.5mm) se obtuvieron con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 17% a pH7. La molécula cristalizó en un grupo espacial R3 y las dimensiones de la Celda Unitaria fueron de a=b=187.32 Å c=59.10 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ y 9 moléculas por celda unitaria.

Se recolectaron datos a 2.72 Å de resolución en el Sincrotrón de Grenoble. Se midieron 35606 reflexiones de las cuales 16139 correspondían a reflexiones únicas. Los datos reducidos y corregidos, entregan un $R_{\text{merge}} = 8.1\%$.

Un modelo del trazado de los C_α de la proteína se obtuvo por reemplazo molecular utilizando para ello la estructura de R-ficoeritrina de *Agmenellum quadruplicatum*.

Este proyecto constituye el punto de partida para la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas en el país.

Este trabajo está financiado por los proyectos DÍ UdeC: 973172-1, Proyecto ECOS-CONICYT C9HB2 y Proyecto FONDECYT de Doctorado N° 2970097.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA ACETIL XILANO ESTERASA I DE *Penicillium purpurogenum*. (Purification and characterization of acetyl xylan esterase I from *Penicillium purpurogenum*). Caputo, V., Peirano, A. y Eyzaguirre, J. Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

El xilano, componente principal de las hemicelulosas, es una molécula compleja, en cuya biodegradación interviene una variedad de enzimas. La molécula se encuentra esterificada por grupos acetato, los que son hidrolizables por esterasas específicas, producidas por hongos y bacterias. En este estudio se utilizó una cepa nativa del hongo *Penicillium purpurogenum*, que crece muy bien en desechos agrícolas. Estudios previos del laboratorio han mostrado la existencia de al menos dos acetil xilano esterasas (AXE I y II). AXE II ha sido purificada, secuenciada y se ha determinado su estructura tridimensional a rayos X. Este trabajo se refiere a la AXE I.

El hongo se creció en medio líquido con agitación usando xilano acetilado como fuente de carbono, y la enzima se purificó a partir del sobrenadante. La actividad se ensayó midiendo hidrólisis de p-nitrofenil acetato o α -naftil acetato.

El sobrenadante de cultivo se concentró por ultrafiltración y precipitación por sulfato de amonio. Se purificó la enzima mediante filtración molecular en Bio Gel P 300 (separándola de AXE II), seguida de cromatografía de intercambio catiónico en CMC-Sephadex y cromatografía. Se obtuvo una proteína homogénea cuyo PM es de 48 K y su pI de 7.8. La T óptima de ensayo es de 50° y el pH óptimo de 5.3. La enzima está glicosilada y tiene un sitio de unión a celulosa. Es altamente específica por acetato y muy poco para el alcohol, al igual que AXE II. No presenta reacción cruzada por anticuerpos con AXE II, y su secuencia amino terminal no muestra similitud con la de esta última.

La producción de varias isoenzimas de AXE que se diferencian en sus propiedades sugiere que ellas cumplen una distinta función en la compleja hidrólisis del xilano.

Financiamiento: FONDECYT 1930673, 1960241 e IR 796006 y DUPUC.

ROLES DE *HIS-141* Y *ASP-128* EN LA ARGINASA DE HIGADO HUMANO: MODIFICACION QUIMICA Y MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA (Roles of *His141* and *Asp128* in human liver arginase. Chemical modification and site-directed mutagenesis) Salas, M., Lopez, V., Uribe, E., Herrera, P., Cerpa, J., Fuentes, M., Olate, J., Carvajal, N. Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Para analizar la importancia de *His141* y *Asp128* en la actividad de la arginasa de hígado humano, junto con profundizar los estudios de modificación química, hemos obtenido y caracterizado las mutantes *H141F* y *D128N*. La especie *H141F* presentó 6-10 % de la actividad de la forma recombinante silvestre (*WT*), sin variación en la K_m para arginina o las K_i para los inhibidores competitivos lisina y ornitina, mientras que la *D128N* resultó ser totalmente inactiva.

Tanto la enzima nativa como la *WT* fueron inactivadas parcialmente por fotooxidación de un solo residuo, siendo protegidas específicamente por el inhibidor competitivo lisina, con una constante de disociación igual a la de inhibición K_i , lo que apoya la localización del residuo fotosensible en el sitio activo. Que el mismo residuo (*His141*) es modificado por DEPC y fotooxidación, es sugerido por los siguientes resultados: (a) especies nativas modificadas con DEPC y luego sometidas a fotooxidación, fueron reactivadas por hidroxilamina, (b) especies fotooxidadas en presencia de lisina, fueron inactivadas por DEPC, con las mismas constantes cinéticas que las especies nativas, y la inactivación fue revertida por hidroxilamina, (c) el mutante *H141F* fue insensible a DEPC y fotooxidación, siendo totalmente inactivado por WRK. Sugierimos que el WRK modifica al *Asp128*, que sería esencial, por su función como base en la producción del hidroxilo (unido al metal) que ataca nucleofílicamente al carbono guanidínico de la arginina. Por el contrario, la *His141* desempeñaría una función crítica, pero no esencial, por ejemplo, en la protonación del producto ornitina, descartándose su participación en la unión del sustrato, como se ha sugerido recientemente FONDECYT 1960103 y P.I. 98.031.076-1.0 (D.I.C. U. de Concepción).

TRANSFORMACIONES TEMPRANAS DEL GA_{12} ALDEHIDO EN LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO GIBERÉLICO EN *Gibberella fujikuroi*. (Early transformations of GA_{12} aldehyde in gibberellic acid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*). Rojas, M.C., Urrutia, O. y Cardona, W. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Las giberelinas son diterpenos producidos en grandes cantidades por el hongo *Gibberella fujikuroi* y en pequeñas cantidades por las plantas, en las que actúan como fitohormonas. Las giberelinas del hongo, especialmente el ácido giberélico (GA_1) son ampliamente utilizadas para regular el crecimiento de tallos y frutos de diversas especies vegetales, por lo que interesa conocer los procesos bioquímicos relacionados con su síntesis. La secuencia de reacciones que genera al ácido giberélico se inicia con el GA_{12} aldehído, primer intermediario de la vía con el esqueleto del giberelano. En este trabajo se utilizó este precursor marcado con carbono 14 para estudiar las oxidaciones que participan en las transformaciones tempranas de esta secuencia en el hongo.

Un sobrenadante de 10.000xg obtenido del micelio activo en la síntesis de giberelinas, transforma al ^{14}C - GA_{12} aldehído en dos productos en presencia de NADPH y oxígeno molecular. La actividad está localizada en los microsomas. El patrón de fragmentación en espectrometría de masas de los derivados trimetilsilil-mentil ester de los productos, así como sus índices de Kovats en GC permitieron identificarlos como ^{14}C - GA_{12} (giberelina hidroxilada en la posición 3) y ^{14}C - GA_{12} (giberelina no hidroxilada) respectivamente. El producto principal es ^{14}C - GA_{12} , en concordancia con el predominio de giberelinas endógenas 3-hidroxiladas en *Gibberella fujikuroi*. Estas giberelinas resultan de la actividad de la 3-hidroxilasa y de la oxidasa del carbono 7, ambas monooxigenasas microsomales. La cinética de generación de ambos productos y la especificidad de la 3-hidroxilasa demuestran que GA_{12} y GA_{12} se producen por dos vías alternativas de oxidación del GA_{12} aldehído. El GA_{12} aldehído, intermediario en la síntesis de GA_{12} , no fue detectado bajo nuestras condiciones. El preparado de microsomas de *Gibberella fujikuroi* fue utilizado para sintetizar ^{14}C - GA_{12} , el sustrato requerido para estudiar las transformaciones posteriores en la biosíntesis de ácido giberélico en el hongo.

Trabajo financiado por FONDECYT, proyecto 1981073

CLONAMIENTO Y EXPRESION DE SOMATOLACTINA DE CARPA *Cyprinus carpio*. (Cloning and expression of carp somatolactin). **Figueroa J., López M.** Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia y Universidad Nacional Andrés Bello, Santiago. (Patrocinio: M. Krauskopf)

Somatolactina es una hormona caracterizada recientemente y estructuralmente relacionada con hormona de crecimiento y prolactina. Se sintetiza en la *pars intermedia* de la hipófisis de teleosteos. La expresión de esta hormona está bajo el control del factor de transcripción Pit-1 que también se expresa en células de la *pars intermedia* pero que, de acuerdo a observaciones realizadas en nuestro laboratorio, se articula con las variaciones estacionales del ambiente, particularmente con la aclimatación a verano e invierno. Entre las funciones atribuidas a somatolactina se encuentran la respuesta fisiológica al stress y el confinamiento, por ello postulamos que podría estar también implicada en la aclimatación de ectotermos eurtemales a variaciones estacionales del habitat. Para obtener clones genómicos de esta hormona se amplificó una sonda homóloga para secuencias de somatolactina de carpa empleando oligonucleótidos derivados de dos regiones de consenso de las estructuras génicas de somatolactinas existentes en los bancos de datos. Esta sonda de 114 pb se marcó radiativamente por PCR y con ella se rastreó una biblioteca genómica de carpa construida en el vector Lambda Fix II, de la que se aisló un clon de 15.500 pb denominado cSL122. La caracterización de este clon por análisis de *Southern* ha mostrado sitios de restricción para diversas enzimas de restricción, lo que permitirá generar un subclon destinado a su posterior secuenciación.

Empleando la misma sonda se hicieron análisis de *Northern* a partir de RNA total de pituitaria de carpa, que sugieren dos mensajeros para somatolactina con tamaños aproximados de 1.900 y 950 nucleotidos. El uso de una sonda oligonucleotídica antisense corrobora este mismo hallazgo. El mismo oligonucleótido utilizado para el análisis de *Northern* (antisense), más otro complementario al análisis (sense), se marcaron no isotópicamente con 11-dUTP-digoxigenina, para dimensionar la transcripción de somatolactina por hibridación *in situ* en cortes de pituitarias de carpa aclimatizadas a verano e invierno. La hibridación se cuantificó digitalizando las señales con el programa UN-SCAN-IT. A través de este procedimiento no se encontraron diferencias significativas entre las hibridaciones de ambas estaciones. Financiado por FONDECYT 1970651

REMODELACION NUCLEOSOMAL *IN VITRO* INDUCIDA POR LA UNION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION AML1 A SU SECUENCIA ESPECIFICA EN EL PROMOTOR DE OSTEOCALCINA (Nucleosome remodeling induced by the binding of transcription factor AML1 to its specific sequence at the osteocalcin promoter *in vitro*). José Gutiérrez, José Sierra, Marcia Puchi, María Inschenetzky y Martín Montecino Depto. Biología Molecular, Fac. Cs. Biológicas, U. de Concepción

El gen de osteocalcina (OC) codifica para una proteína de 10 kDa, la cual se expresa específicamente en células de tejido óseo. Los niveles de expresión de este gen se encuentran bajo el control de secuencias regulatorias distribuidas dentro de 2 sitios en la región promotora que presentan hipersensibilidad a DNasa I (sitio proximal -170 a -70; sitio distal -600 a -400). La presencia de estos sitios hipersensibles está estrechamente relacionada con los niveles de actividad transcripcional, ya que no son detectados en células provenientes de tejidos distintos al óseo o en células derivadas de hueso, pero que no expresan osteocalcina. Se ha descrito que en ambos sitios hipersensibles existen secuencias de reconocimiento específicas para un factor de transcripción perteneciente a la familia AML. Se ha demostrado que la unión de este factor es indispensable para la inducción de la actividad transcripcional basal y se ha sugerido que podría promover la formación de los sitios hipersensibles. Para esto, debería ser capaz de asociarse a sus secuencias de reconocimiento dentro del contexto nucleosomal y promover consecuentemente la pérdida de la organización nucleosomal en estas zonas. Para analizar esta posibilidad, hemos realizado reconstrucción nucleosomal *in vitro* de segmentos de la región promotora proximal del gen de osteocalcina, los cuales contienen la secuencia de reconocimiento específica de AML1. Fueron realizados estudios de unión de AML1 a su secuencia diana mediante ensayos de retardación en gel, análisis de accesibilidad a enzimas de restricción y de patrones de digestión con nucleasa micrococcal y DNasa I. Los resultados demuestran que AML1 posee la capacidad de unirse a su secuencia de reconocimiento específica cuando ésta se encuentra dentro de la conformación nucleosomal.

FONDECYT 1971077 y DILC 96.031.071-1.1D

IDENTIFICACIÓN INAMBIGUA DE LAS HISTONAS DE *Crithidia fasciculata* y *Leishmania mexicana* POR SECUENCIACIÓN AMINOACIDICA. (Unambiguous identification of *Crithidia fasciculata* and *Leishmania mexicana* histones by amino acid sequencing). ⁽¹⁾ Espinoza, I. y ⁽²⁾ Hellman, U. (1) Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, (2) Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden.

La familia Trypanosomatidae está caracterizada por protozoos flagelados que presentan un kinetoplasto. Varios géneros de esta familia contienen especies que son patógenas para el hombre y animales domésticos. Presentan una serie de rasgos biológicos que les son característicos, entre los cuales se encuentran la no condensación de la cromatina en cromosomas durante la división celular. De este modo, como una contribución al entendimiento de aspectos básicos de la organización de su genoma, en este trabajo se muestra una identificación unambigua de las histonas de dos especies de la familia Trypanosomatidae, *Crithidia fasciculata* y *Leishmania mexicana*. Para esto, se realizó una secuenciación aminoacídica parcial de las histonas de estos dos parásitos, previamente purificadas y caracterizadas por métodos bioquímicos. En *C. fasciculata* identificamos por secuenciación aminoacídica las histonas H2B, H4 y H1, y en *L. mexicana* las histonas H2A, H2B, H3 y H4. De acuerdo a estos resultados y a otros obtenidos previamente, *C. fasciculata* y *L. mexicana* presentan el set completo de histonas, con características muy similares a las de eucariotes superiores pero muy distintas a las de eucariotes superiores. En consecuencia la cromatina de Trypanosomatidae podría contener constituyentes particulares, diferentes a los presentes en eucariotes más recientes, ya un proceso de condensación-decondensación de la cromatina distinto al de eucariotes superiores, constituyendo éstos posibles blancos farmacológicos. Financiado por proyecto RCTP (SIDASAREC)

CARACTERIZACION Y EXPRESION DE LA SUBUNIDAD β DE PROTEINA QUINASA CK2 EN EL PEZ *C. carpio* DURANTE SU ACLIMATIZACION. (Characterization and expression of protein kinase CK2 β subunit during the acclimatization of the fish *C. carpio*). Kausel G., Barrera R., Krauskopf E., Universidad Austral de Chile y Universidad Nacional Andrés Bello. (Patrocinio: M. Inés Vera)

La adaptación del pez *C. carpio* a las condiciones cíclicamente fluctuantes de su medio ambiente implica la modulación de la expresión de una amplia variedad de genes. La aclimatación invernal de la carpa, afecta acentuadamente la actividad transcripcional de los genes nucleolares, que se refleja fenotípicamente en la segregación de los componentes del nucléolo, indicando inactivación temporal de la expresión de los genes de RNA ribosomal (rRNA). En verano, por el contrario, estos genes se transcriben activamente. Numerosas enzimas que conforman la maquinaria transcripcional de los genes de rRNA (pol I, topo I, factores de transcripción, etc) y nucleolina, la proteína más abundante en nucléolo, son fosforiladas por proteína quinasa CK2. La estrecha relación entre la regulación de la expresión de los genes nucleolares y su nivel de fosforilación por CK2, indican la conveniencia de caracterizar la secuencia del cDNA y el nivel de expresión de CK2 en el proceso de aclimatación estacional de la carpa.

Con este propósito se rastreó una biblioteca de cDNA de hígado de carpa usando una sonda homóloga de la subunidad β de CK2 de carpa preparada por PCR con partidores derivados de secuencias de consenso y DNA genómico como molde. Se aislaron clones positivos, y se secuenciaron, confirmando que corresponden a los nucleótidos que codifican para 206 de los 215 aa esperados, faltando los 9 aa del extremo amino terminal. Experimentos preliminares de hibridación *in situ* muestran resultados que indicarían una expresión similar de esta subunidad en hígado, hipófisis y riñón de carpa en ambas condiciones de aclimatación, verano e invierno. Se realizarán experimentos de RT-PCR MIMIC para clarificar estos resultados con precisión. Proyecto FONDECYT 1970633.

CROMATINA E HISTONAS EN *Giardia lamblia* (Chromatin and histones in *Giardia lamblia*). Triana, O¹, Olea, N² y Toro, GC² 1 Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia. 2. Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Giardia lamblia, es un protozoo parásito que habita el intestino superior de humanos y de otros mamíferos, y es el agente causante de la giardiasis. Además de su importancia médica, *Giardia* es foco de notable interés biológico debido a que es la célula eucariótica más primitiva que se conoce, al punto de ser considerada el eslabón perdido entre procariontes y eucariontes.

En este trabajo se muestra por primera vez la estructura nucleosómica de la cromatina de *G. lamblia*, como también la caracterización de las histonas de este parásito.

En eucariontes inferiores, el DNA se encuentra enrollado, al igual que en eucariontes superiores, sobre un octámero de histonas. Sin embargo, estas proteínas presentan un alto grado de divergencia con respecto a sus homólogas en eucariontes superiores, lo cual podría estar relacionado con la ausencia de compactación de la cromatina en la mitosis y mayor fragilidad al ataque de nucleasas. Teniendo en cuenta que los organismos procariontes no organizan su DNA en nucleosomas, el estudio de la estructura de la cromatina y las histonas en *Giardia*, es de gran importancia, ya que podría encontrarse una etapa primaria en la formación del nucleosoma y de las histonas como proteínas propiamente tales. En este sentido, en el presente trabajo hemos purificado y caracterizado las histonas de *Giardia lamblia* por dos sistemas electroforéticos: geles SDS y TAU-PAGE. Utilizando como criterio, cantidad de proteína y migración relativa con respecto a los estándares, se observan en *Giardia*, 8 proteínas con características de histonas. Las bandas G1 y G2 migran por encima de la histona H2A de los controles. Por su parte, las proteínas G5, G6, G7 y G8, se encuentran en la región de migración de las histonas H3, H2B y H4. Este patrón está indicando que las histonas del núcleo nucleosomal de *Giardia*, presentan alta divergencia en comparación con otros eucariontes inferiores (*Trypanosomátidos*) y a eucariontes superiores. El análisis de secuencias de estas proteínas, las cuales fueron purificadas por HPLC, permitirá en un futuro cuantificar la divergencia de las histonas en este eucarionte primitivo y eventualmente sugerir una historia evolutiva para las histonas. Además, permitirá postular un modelo del nucleosoma primitivo.

Financiado por RTPD (SIDA/SAREC)

POLILISINA ACTIVA ENTRADA DE Ca^{2+} EN ESPERMATIDAS DE RATA. (Polylysine activates Ca^{2+} entry in rat spermatids). Reyes J.G., Cisternas C., Herrera E., Jorquera R. y Benos D.J. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso; Instituto de Ciencias Biomédicas, Fac. Medicina, Universidad de Chile y Dept. Physiology and Biophysics, Univ. Of Alabama at Birmingham, USA. (Patrocinio: Dr. M.Tulio Nuñez).

En células espermatoogénicas se ha demostrado la existencia de canales de Ca^{2+} tipo T (Lievano et al., 1996; Arnoult et al., 1996). En espermios, estos canales son activados por la proteína ZP3 de la envoltura de los oocitos. En espermátidas de rata hemos observado que polilisina (PL), un homopéptido policatiónico, que se puede considerar una "heparin-binding protein", activa la entrada de Ca^{2+} . La farmacología de la entrada de Ca^{2+} activada por PL sugiere que esta molécula activa los canales de Ca^{2+} en espermátidas de rata. Este efecto de PL es inhibido por heparina. PL induce también entrada de Ca^{2+} en célula única, indicando que su efecto no está asociado exclusivamente a interacción célula-célula. Las concentraciones que inducen entrada de Ca^{2+} no inducen lisis celular estimada microscópicamente por incorporación de bromuro de etidio a las células. Para producir estos efectos se requieren PL de $PM > 7.000$, lo que sugiere la necesidad de interacción con varios sitios de unión en la membrana. PL-FITC evidencia una unión homogénea en la membrana celular, la cual progresa a formación de dominios fluorescentes, en un fenómeno tipo "clustering". Nuestros resultados sugieren que PL interacciona con sitios de unión en la membrana plasmática de las espermátidas los cuales estarían acoplados a la activación de canales de Ca^{2+} en estas células. (Financiado por Fondecyt 1960398 y DGIP-UCV)

IDENTIFICACION INMUNOQUIMICA DE DOS COMPUESTOS SECRETADOS POR LA PARS TUBERALIS. ¿NUEVAS HORMONAS HIPOFISARIAS? (Immunohistochemical identification of two compounds secreted by the pars tuberalis. Two novel pituitary hormones?). Rodríguez, E.M., Guerra, M. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

La pars tuberalis (PT) es una región hipofisaria de alta constancia filogenética, y cuya función es desconocida. La principal población celular de la PT corresponde a las llamadas células PT-específicas, las cuales presentan todas las características de células diferenciadas en la síntesis de proteínas secretorias. El producto secretorio de estas células aún no ha sido identificado. La PT es la única región hipofisaria que está en contacto directo con el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaragnoideo. Por otro lado, los vasos que irrigan la PT corresponden a los capilares del sistema porta hipotálamo-hipofisario. La atractiva posibilidad que el o los compuestos secretados por las células PT-específicas participen en la regulación de la pars distalis, a través de la circulación portal, o la de alguna región del SNC, a través del LCR, nos condujo a la presente investigación, la que tuvo como primer objetivo identificar el o los compuestos secretados por las células PT-específicas. Se utilizó un sistema de cultivo organotípico de la PT bovina. En los medios condicionados se detectaron varios compuestos. Mediante electroforesis preparativa de los medios condicionados se obtuvo anticuerpos policlonales contra cada uno de estos compuestos. Los anticuerpos fueron utilizados para estudios de *immunoblot* e inmunocitoquímicos a nivel óptico y ultraestructural de la PT bovina (in situ y cultivada) y de la PT de rata adulta y embrionaria. Dos compuestos de 22 y 72 kDa corresponderían a productos secretorios específicos de la PT, preliminarmente denominados "tuberalina I" y "tuberalina II". En la rata, la tuberalina I se expresa muy tempranamente en el desarrollo, y podría corresponder a la primera hormona que secreta la hipófisis durante la etapa embrionaria.

CARACTERIZACION DE CELULAS EPITELIALES DE OVIDUCTO HUMANO EN CULTIVO. (Characterization of cultured epithelial cells from human oviduct). Ossandón, P., Ultras, E., Varela, L., Cardenas, H., Imarai, C.M. Laboratorio de Inmunología de la Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

Las células en cultivo sufren cambios importantes en la expresión de algunas proteínas como consecuencia de la desdiferenciación que experimentan. El propósito de este trabajo fue determinar si el cultivo de las células epiteliales de oviducto humano afecta la expresión de las proteínas de superficie HLA-DR, HLA-DQ e ICAM-1, presentes en el epitelio de este órgano *in vivo*. Se obtuvo oviductos de mujeres sometidas a histerectomía previo consentimiento informado. Un trozo de tejido se procesó para inmunohistoquímica y el resto se utilizó para obtener el tejido mucoso y aislar células epiteliales para cultivo. Después de 2 a 3 días las células se organizan en grupos que expresan citoqueratina 18, una proteína del citoesqueleto propia de las células epiteliales. La confluencia de los cultivos se alcanzó al cabo de 6 a 7 días. Utilizando las técnicas de inmunohistoquímica y retro-PCR, se estableció que, en este período, 10 a 20 % de las células expresaron ICAM-1 pero no hubo expresión de las proteínas del complejo HLA-D. El tratamiento de los cultivos con interferón gamma (IFN γ) produjo un aumento del porcentaje de células que expresan la proteína y un incremento en los niveles del mRNA, lo que demuestra la presencia del receptor de IFN γ en este cultivo. Las citoquinas inflamatorias Interleukina 1, Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) e IFN γ , que inducen la expresión de las proteínas del MHC de clase II (HLA-D) en otros tejidos, no estimularon la expresión de HLA-DR ni de HLA-DQ. Los resultados demuestran que las células epiteliales de oviducto humano en cultivo se desdiferencian afectándose la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Financiado por Fondecyt 1950272 y Dicyt-USACH

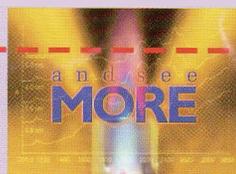
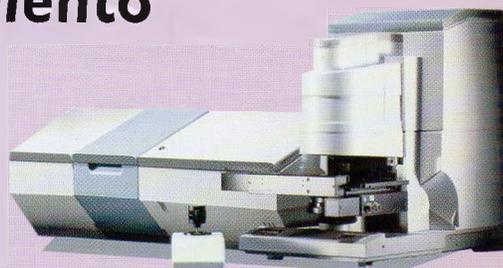
PERKIN ELMER CHILE

MÁS
QUE INSTRUMENTOS DE CALIDAD.



MÁS

**soluciones
soporte
comunicación
rendimiento**



PERKIN ELMER CHILE

Consúltenos y encuentre más.

Esperamos su llamada en el TELÉFONO (562) 655 1600
y su FAX en el (562) 269 8070
Visite nuestra Website en www.perkim-elmer.com.

Y VISÍTENOS PERSONALMENTE EN
Av. Francisco Bilbao 882
Providencia - Santiago - Chile

CALIDAD Y SERVICIO, PILARES FUNDAMENTALES DE NUESTRA FILOSOFIA

INNOVACION PERMANENTE Y UNA
INFRAESTRUCTURA ADECUADA, NOS PERMITEN
BRINDAR A USTED UN SERVICIO AGIL,
INTEGRAL Y EFICIENTE.

REPRESENTANTES EXCLUSIVOS
PARA CHILE DE:

LIFE - TECHNOLOGIES INC. (GIBCO BRL)

NUNC

M.J. RESEARCH

BRINKMANN - EPPENDORF

VILBER LOURMAT

PHARMAGEN S.A.

AGDIA INC.

LIFECODES INC.

QUALITY SCIENTIFIC PLASTIC

 **BIOS Chile**
INGENIERIA GENETICA S.A.

AV. MARATHON 1943 Ñuñoa - Santiago
TELEFONO: (56-2) 238 1878 FAX: (56-2) 239 4250
e-mail: ventas@bioschile.cl

