

SOCIEDAD DE BIOQUIMICA DE CHILE

II REUNION ANUAL

RESUMENES DE COMUNICACIONES

CONFERENCIA INAUGURAL

El papel de los derivados de dolicol en la glucosilación de proteínas. (The role of dolichol derivatives on protein glycosylation).

L. F. LELOIR.— Fundación Campomar. Buenos Aires. Argentina.

El 12 de noviembre de 1970 en una conferencia en homenaje al Profesor Cabello en Lo Barnechea, mencioné los resultados que habíamos obtenido con el Dr. N. Behrens. Desde entonces los conocimientos sobre glicoproteínas y su biosíntesis han aumentado muchísimo.

En esa época habíamos detectado la formación de dolicol fosfato glucosa a partir de uridina difosfato glucosa y dolicol fosfato. Además habíamos observado que la glucosa del dolicol fosfato glucosa se podía transferir a otro compuesto que creíamos que era proteína. Trabajos posteriores mostraron que dicha substancia no se disolvía en cloroformo metanol 2:1, pero podía solubilizarse en mezclas de cloroformo metanol agua en la proporción 1:1:0.3. Esto permitió

la purificación del compuesto y el estudio de sus propiedades. Se obtuvo evidencia de que era un oligosacárido combinado con dolicol difosfato, formado por 2 acetilglucosaminas, varias manosas y 2 glucosas. Por otra parte se observó que el dolicol fosfato sirve de aceptor para acetilglucosamina formando dolicol difosfato acetilglucosamina y dolicol difosfato N-N-diacetilquitobiosa. Este último puede luego aceptar manosas, formándose así un oligosacárido que se puede transferir a proteína.

Estudios recientes de varios grupos han demostrado que el compuesto que contiene glucosa que ahora llamamos dolicol difosfato G-oligosacárido actúa como dador para la glucosilación de muchas glicoproteínas. Después de la transferencia del oligosacárido al polipéptido actúan glucosidasas que hidrolizan las glucosas y varias manosas y dejan un pentasacárido sobre el cual se transfieren luego residuos de acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. Todo esto ha significado un progreso considerable en el conocimiento de la biosíntesis de las glicoproteínas.

Descomposición Fotoquímica de un ácido hidroxámico cíclico (DIMBOA) de Zea mays L. (Photochemical decomposition of a cyclic hydroxamic acid (DIMBOA) from Zea mays L.).

ARCAYA, G., CORCUERA, L. y TRAVERSO, G. A.— Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago.

DIMBOA (2,4-Dehidroxi-7-metoxi-benzoxazin-3-ona) es un ácido hidroxámico que inhibe el desarrollo de insectos, hongos y bacterias. Esta molécula es inestable en soluciones acuosas, siendo afectada por pH, temperatura y luz. El propósito de este trabajo es determinar el efecto de la luz sobre la estabilidad de DIMBOA.

DIMBOA fue aislado de extractos acuosos de *Zea mays* L. Soluciones de este compuesto (Succinato 0.1 M, pH 6) fueron irradiados a diferentes longitudes de onda. DIMBOA se descompone al ser expuesto a radiación ultravioleta. Al irradiar con luz monocromática ($\lambda = 315$ nm) se observa una reacción primaria con cinética de primer orden con un rendimiento cuántico de 5.6×10^{-3} (moléculas de DIMBOA transformadas/quantum de luz absorbida); no se observaron reacciones fotoquímicas secundarias a esta longitud de onda de irradiación. Sin embargo, cuando el producto primario es expuesto a radiaciones de menor longitud de onda (302-230 nm) se descompone fotoquímicamente.

Por su parte, MBOA (6-metoxibenzoxazolinona), producto principal de la descomposición térmica de DIMBOA, también se degrada fotoquímicamente y el producto es espectralmente igual al de DIMBOA. La cinética de su descomposición es de primer orden.

La isomerización de prolina en el plegamiento de proteínas. (Proline isomerization in protein folding). BABUL, J., y STELLWAGEN, E.— Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Departamento de Bioquímica, Universidad de Iowa.

El plegamiento de muchas proteínas exhibe una multiplicidad de eventos que pueden ser detectados cinéticamente y que sugiere la presencia de intermediarios de estabilidad transitoria entre las conformaciones desnaturaladas y nativas. De acuerdo con el modelo de isomerización de prolina, el estado desnaturalado consiste en una mezcla de isómeros configuracionales (trans/cis) y sólo aquellos que tienen los enlaces peptídicos de prolina en la forma trans se plegarán rápidamente por ser ésta la forma más frecuente en las conformaciones nativas. Esto tendrá como resultado la existencia de dos o más fases cinéticas aun cuando no existan intermediarios de estabilidad transitoria entre las conformaciones nativas y desnaturaladas. También, según el modelo, la fracción de proteína desnaturalada que se pliega rápidamente, depende del número total de prolina por cadena polipeptídica.

En este trabajo se compara la cinética de plegamiento de dos citocromos *c* que difieren en su contenido de prolina (4 en caballo y 3 en atún) para tratar de esclarecer este proceso y poner a prueba el

modelo de isomerización de prolina. Para este efecto se estudió, en un aparato de paro de flujo, el plegamiento de ambas proteínas desnaturaladas por ácido. En forma distinta a los estudios en equilibrio, de las medidas cinéticas se detectaron tres fases cinéticas cuyos tiempos de relajación difieren en un orden de magnitud. Los valores de la fracción de proteína desnaturalada que se pliega rápidamente, en el caso del citocromo de atún y de caballo, no concuerdan con los predichos por el modelo. Estos resultados no apoyan el modelo de isomerización de prolina en el plegamiento de proteínas.

Alteración de organelos subcelulares por compresión (Alteration of subcellular organelles induced by compression).

BRONFMAN, M.— Laboratorio de Citología Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Se ha demostrado que las mitocondrias de hígado de rata pueden ser alteradas por la presión hidrostática que se genera en los rotores de las ultracentrifugas preparativas.

Con el objeto de evaluar este efecto, se estudió la influencia de la presión hidrostática, generada en una prensa hidráulica, en la integridad estructural de los diversos organelos subcelulares de hígado de rata, mediante determinaciones de latencia de diversas enzimas de localización subcelular conocida.

Los peroxisomas, mitocondrias, lisosomas y vesículas microsomales son alteradas considerablemente por presiones hidrostáticas en el rango de las que es posible alcanzar en la ultracentrifuga. Estas alteraciones se manifiestan en una liberación de enzimas, normalmente asociadas a la matriz de los organelos, en solución.

La sensibilidad de los diversos organelos a la presión es diferente, siendo los peroxisomas los más sensibles y los elementos de Golgi los más resistentes. La sensibilidad a la presión aumenta al disminuir la temperatura de 20 a 2°C.

Las alteraciones inducidas pueden ser atribuidas a la presión misma, y no a la decompresión. En todos los casos, el grado de deterioración de los organelos aumenta al aumentar el tiempo bajo presión y es independiente de la velocidad de decompresión. Para una presión determinada el tiempo bajo presión necesario para observar alteraciones varía de un organelo a otro. A tiempos cortos (0.5-1 min.) sólo los peroxisomas son afectados.

Mediciones de resistencia a la presión en Micoplasmas (*Acholeplasma Laidlawii* B) en los cuales la composición de la membrana celular puede ser variada de acuerdo a la composición del medio de cultivo, revelaron que la resistencia a la presión es significativamente mayor en los micoplasmas cultivados en presencia de colesterol. Este resultado sugiere que la diferencia de sensibilidad entre los organelos es una consecuencia de la diferencia de composición de sus membranas.

Análogo de ATP inmovilizado como adsorbente en cromatografía de afinidad. Purificación de isoapirasa de S. Tuberosum. (Immobilized ATP analogue as Adsorbent affinity Chromatography. Purification of an isopyrase from S. tuberosum).

CALVO, V., VALENZUELA, M. A. y TRAVERSO-CORI, A.— Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

La apirasa o pirofosfohidrolasa de papa hidroliza enlaces pirofosfóricos en presencia de metales bivalentes.

Hemos informado en trabajos anteriores, que el cambio en la molécula de ATP de un puente de oxígeno del pirofosfato terminal por un puente metileno, la transforma en un inhibidor de tipo competitivo con una K_i de 1,35 mM para la actividad ATPásica y 0,91 mM para la ADPásica. Considerando estas propiedades cinéticas se usó como adsorbente en cromatografía de afinidad. La síntesis de ATP fosfonato se efectuó por el método de Myer, y colaboradores a partir de 5'AMP y ácido metilendifosfónico usando como agente deshidratante la dicitclohexil carbodíimida. El ATP-fosfonato se purificó por una columna de DEAE-celulosa. Para unir el análogo de ATP a la agarosa se trató con NaIO_4 para obtener el 2,3-dialdehído el cual se unió a la agarosa previamente transformada en una pentanodiamina. La base de Schiff que se forma posteriormente, se estabiliza con reducción con NABH_4 .

La enzima parcialmente purificada proveniente de una columna de G-100 se absorbe a baja fuerza iónica en presencia de Mn^{++} ya que hay evidencias que el verdadero sustrato de esta pirofosfohidrolasa sería el nucleótido unido a un metal bivalente. En ausencia de metal y con una gradiente de ATP se ha logrado eluir selectivamente la isoenzima.

Con el azul de cibacon unido covalentemente a Sephadex G-100 también se ha obtenido una purificación bastante promisoría. En este caso la elución se ha efectuado con gradiente de fuerza iónica. Se discuten las ventajas de ambos métodos de purificación.

Residuos esenciales de arginina en piruvato quinasa de músculo de conejo. (Essential arginyl residues in pyruvate kinase from rabbit muscle).

CARDEMIL E. y EYZAGUIRRE, J. Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile, Santiago, y Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.

Diversos estudios han demostrado que los residuos de arginina juegan un rol esencial en muchas enzimas, principalmente en el reconocimiento de sustratos o ligandos aniónicos. En el presente trabajo se investigó si existen residuos de arginina importantes para la unión de los sustratos a piruvato quinasa.

Se obtuvo enzima cristalina a partir de músculo de conejo por técnicas descritas. Los estudios de modifi-

cación química se realizaron usando 2,3-butanodiona en borato de sodio 60 mM a pH 8,4 y 30°C. La actividad residual se determinó usando un ensayo espectrofotométrico acoplado con deshidrogenasa láctica.

La enzima se inactiva con cinética de pseudo-primer orden, estimándose que un residuo de aminoácido se modifica por sitio activo de la enzima. Las constantes cinéticas para la reacción de inactivación (K_1 y K_{-1}) son $4,8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y $0,0020 \text{ min}^{-1}$. La inactivación se pudo revertir completamente al eliminar el exceso de borato y butanodiona por filtración en gel. Análisis de aminoácidos de muestras parcialmente modificadas, demostraron que se estarían modificando 3 a 4 residuos de arginina por subunidad catalítica para obtener enzima totalmente inactiva. La inactivación realizada en presencia de sustratos y cofactores, demostró que la presencia de fosfoenolpiruvato 5 mM más K^+ y Mg^{+2} disminuye la constante de inactivación de $0,041 \text{ min}^{-1}$ a $0,014 \text{ min}^{-1}$ mientras que Mg^{+2} 10, mM la aumenta a $0,069 \text{ min}^{-1}$. No se observó efecto por ADP, solo o con metales.

La conocida especificidad de butanodiona, la reversión de la inactivación al eliminar el exceso de reactivo y borato y los resultados obtenidos mediante análisis de aminoácidos, indican que la reacción de modificación ocurre en residuos de arginina. Los resultados también indican que hay un residuo de arginina en o cerca del sitio de unión de fosfoenolpiruvato, y no del sitio de unión de ADP, existiendo más de uno (posiblemente 3 a 4) residuos igualmente reactivos de arginina. En consecuencia, el sitio de unión del nucleótido sería diferente a sitios análogos en otras quinasas. El efecto de Mg^{++} puede deberse a un efecto de carga eléctrica o a un cambio conformacional inducido por el metal en la proteína.

Polisacáridos que constituyen los envoltorios celulares de heterocistos y esporas de una cianobacteria. Estructura de la unidad repetitiva de la molécula. (The polysaccharides from heterocyst and spore envelopes of a blue-green alga. Structure of the basic repeating unit).

CARDEMIL L.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago - Chile.

Glicosidasas específicas cortan selectivamente los residuos terminales, los que forman las ramas de los polisacáridos que constituyen los envoltorios de heterocistos y esporas de *Anabaena cylindrica*. Así se puede determinar la posición y configuración anomérica de los enlaces glicosídicos que unen el azúcar de la rama a la columna vertebral de la molécula.

La enzima (1 → 3) endogluconasa de *Rhizopus arrhizus* Q M 1032, puede cortar la columna vertebral de los polisacáridos de heterocistos y esporas cuando sostienen dos ramas. Los productos de esta degradación enzimática son, para ambos polisacáridos, un mono— un tri— y un pentasacárido. Análisis de metilación de estos digosacáridos permiten establecer la secuencia de la estructura de la molécula completa. Ambos polisacáridos (heterocistos y esporas) tienen la misma secuencia de ramificaciones.

Análisis del extremo reductor de la columna vertebral de las moléculas con borohidruro de sodio tritiado, muestran que es glucosa el azúcar ubicada en el extremo reductor y una estimación del peso molecular promedio de la columna vertebral de 130-150 residuos de azúcares.

Una degradación secuencial, por medio de una modificación del método de degradación de Smith, con identificación del azúcar alcohol previamente tritiado, sugiere que $(\text{Man-glc-glc-glc})_n$ es la unidad repetitiva de la columna vertebral.

Efecto de la eritropoyetina y testosterona sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos de tres fracciones celulares de médula ósea de rata. (Effect of erythropoietin and testosterone on nucleic acids metabolism from three cellular fractions from rat bone marrow). CARU, M., GARRIDO, A. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

La extrema heterogeneidad de las células de la médula ósea de rata en la que están presentes todos los estados de desarrollo de las células sanguíneas circulantes, dificulta los estudios bioquímicos relacionados principalmente con la diferenciación de las diversas series celulares.

El proceso eritropoyético está regulado por la eritropoyetina (EP) y testosterona (T), hormonas que parecen actuar a diferentes niveles bioquímico y citológico.

El propósito de este trabajo es estudiar en qué clase de células actúan ambas hormonas y para ello es necesario disponer de un sistema que tenga fracciones enriquecidas con células de la serie roja.

Utilizando gradientes de densidad de ficoll se obtuvieron tres fracciones celulares de médula ósea, en los cuales se determinó la biosíntesis de RNA y DNA, midiendo la incorporación de formiato- C^{14} a las bases a los tiempos de 30, 60, 120, y 180 min, y bajo la acción de eritropoyetina y testosterona.

Utilizando ratas normales, anémicas y policitémicas, la acción de la EP sobre el RNA a los 30 min es muy marcada en las fracciones I y II de las normales y policitémicas, mientras que la T no aumenta la incorporación. La acción conjunta de ambas hormonas es más manifiesta en la fracción III de estos animales.

En la rata anémica, la T ya a los 30 min estimula la síntesis de RNA, siendo esta actividad muy similar a la observada con las dos hormonas.

A los 180 min, la acción de ambas hormonas ya sea separadas o juntas, sobre la síntesis de RNA y DNA es significativa, en especial cuando ambas participan reflejando un real efecto sinérgico.

Por las características del estímulo analizado, se postula que las hormonas parecen actuar a diferente nivel citológico, mientras la EP lo hace en células más inmaduras, la T actuaría sobre células intermedias del tipo de eritroblastos basofílicos.

Glucocinases múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-Acetilglucosamina quinasa (Multiple and extrahepatic glucokinases: identification as N-Acetylglucosamine Kinase).

DAVAGNINO J. Y URETA T.—Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Varios grupos de investigadores han comunicado que la glucocinasa de alta K_m de hígado de rata puede presentar dos bandas de movilidad electroforética similar. También se ha comunicado la existencia de esta enzima en varios tejidos extrahepáticos de la rata y otros mamíferos. Estas últimas observaciones son de interés porque su demostración inequívoca permitiría postular mecanismos de regulación del metabolismo hidrocarbonado que se suponen propios del hepatocito. Efectivamente hemos comprobado por cromatografía en DEAE-celulosa la presencia de actividad fosforilante de glucosa de alta K_m en extractos de riñón de rata. Sin embargo, difiere de la glucocinasa por su especificidad de sustrato, peso molecular ligeramente superior y características cinéticas. Esta actividad corresponde a N-acetilglucosamina quinasa, enzima que es capaz de fosforilar varios azúcares aun cuando con valores de K_m muy altos. Resultados similares se obtuvieron al fraccionar extractos de hígado de rata de tres días de edad, placenta humana y eritrocitos de cerdo, tejidos todos en los que se ha comunicado la presencia de glucocinasa.

NAGA quinasa de bazo de vaca se purificó parcialmente y se inyectó en un gallo hasta obtener un antisuero que inhibe la actividad enzimática del antígeno. Este antisuero no reacciona con glucocinasa o hexocinases de baja K_m . La incubación del antisuero con extractos de riñón de rata y de hígado de rata neonatal hizo desaparecer la actividad glucocinasa putativa, lo que no ocurre en los controles incubados con suero de gallo no inyectado. La electroforesis en acetato de celulosa de extractos de hígado de rata adulta, permite demostrar la presencia de tres bandas de actividad fosforilante de glucosa de baja K_m y dos bandas adicionales que sólo se tiñen con altas concentraciones del azúcar. Una de estas bandas de mayor movilidad anódica desaparece si antes de la electroforesis se incuban los extractos con el suero inmune anti-NAGA quinasa.

Los resultados indican que glucocinasa es una enzima hepática que se presenta compuesta de una sola banda electroforética. Cualquier proposición en contrario debe explícitamente demostrar que la actividad observada no corresponde a NAGA quinasa.

Efecto conjunto de EtOH y AcCHO sobre el proceso respiratorio de SNC de ratas "A. G." y "A. G./H₂O". (Effect of both EtOH and AcCHO on CNS respiratory process in "A. G." and "A. G./H₂O" rats).

EGANA, E., SCHOELERMANN, S. y RAMIREZ, M. T.—(Laboratorio de Neurobioquímica, Instituto de Medicina Experimental, Departamento de Clínicas, Facultad de Medicina, Santiago-Sur, Chile).

Nuestro Instituto ha comunicado previamente sobre efecto del EtOH y del AcCHO sobre el proceso res-

piratorio de SNC, particularmente sobre sitio 1 y 2, y estados 3 y 4 (fosforilación oxidativa de ratas con alcoholismo permanente y filial "A. G." rats (actualmente 63 generaciones) y "A. G./H₂O" (en el presente, 18ª generación). El detalle sobre este tipo de alcoholismo ha sido publicado anteriormente. Este trabajo se relaciona con experimentos en los cuales ambos EtOH y AcCHO, separadamente o en conjunto, actúan sobre el proceso respiratorio de SNC.

Ratas: Normal, A. G. y A. G./H₂O; tres edades: adulto, impúber y neonatal. SNC: corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo en las dos primeras edades (cortes y tirillas) y homogenizado de encéfalo total en neonatal; Mitocondria, de las áreas de SNC mencionadas y de encéfalo total. El proceso respiratorio y el efecto de EtOH y AcCHO y substratos, fue medido por el consumo de O₂. Las técnicas usadas fueron: (i) Manométrica: vaso Warburg, Ringer-Elliott-HCO₃, gas fase O₂ 95% - CO₂ 5% o Ringer Krebs-PO₄, gas fase O₂, pH inicial 7.4, 38°, 60 min; cortes de tejido u homogenizado; piruvato 10 mM como substrato; EtOH 11.4 y 22.8 mM; AcCHO 1, 5 y 10 mM (ii) Polarográfica: electrodo Clark, Ringer mitocondria-K⁺-Mg²⁺-PO₄, pH 7.2, N₂ 79% - O₂ 21%, 25°, substrato piruvato 10 mM; ADP 0.05 mM; NAD 0.2 mM, EtOH 11.4 y 22.8 mM y AcCHO 1, 2 y 5 mM. En los experimentos se usó separadamente las dos concentraciones de EtOH, las tres concentraciones de AcCHO y combinaciones de ambos. En las determinaciones manométricas se ensayó la acción estimuladora de KCl 100 mM.

Los resultados obtenidos, en general, son: 1. SNC (cortes, tirillas y homogenizado): 1.1 según las concentraciones de EtOH y AcCHO, respectivamente, estimulan o inhiben la respiración; ambos asociados en general deprimen el proceso. 1.2 Se observó algunas diferencias entre normal, A. G. y A. G./H₂O. 1.3 Las diferentes áreas de SNC estudiadas, presentan diversa reacción frente al EtOH y al AcCHO particularmente en presencia de piruvato y en estimulación con K. 2. Mitocondria. 2.1 Tanto EtOH como AcCHO inhiben la respiración con substrato endógeno y en presencia de piruvato; el R.C.R., también está disminuido. 2.2 NAD no revierte el efecto inhibitorio.

Regulación de la síntesis de proteínas por un inhibidor obtenido de oocitos de Xenopus laevis (Regulation of protein synthesis by an inhibitor from Xenopus laevis oocytes).

R. ERRAZURIZ y ALLENDE J. E.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Stgo. Norte) Universidad de Chile.

La síntesis de proteínas en oocitos crecidos de *X. laevis* está aparentemente regulada post-transcripcionalmente, ya que puede ser gatillada por la fertilización, aún cuando no hay síntesis *de novo* de RNA. Para dilucidar el posible mecanismo de esta regulación, se ha estudiado la capacidad biosintética de proteínas usando diferentes componentes celulares de oocitos de *X. laevis*. Los resultados obtenidos han demostrado que la fracción citoplasmática de oocitos crecidos

contiene un factor termolábil que inhibe fuertemente la síntesis de polifenilalanina dirigida por poli U, en un sistema que emplea ribosomas lavados de oocitos de *X. laevis* y una fracción sobrenadante de 105.000x g obtenida de germen de trigo. Este inhibidor está también presente en el lavado con KCl 0.5M de ribosomas de oocitos de *X. laevis*.

La inhibición sería específica para ribosomas de oocitos, ya que prácticamente no se observa al usar ribosomas de germen de trigo, y por otro lado, la inhibición puede revertirse al agregar un exceso de ribosomas de oocitos lavados con KCl 0.5M. Se ha demostrado que al parecer la etapa de la elongación sensible a esta inhibición sería la unión del aminoacil-tRNA al sitio ribosomal A, catalizada por el factor de elongación EF-1. La unión no enzimática de aminoacil-tRNA que ocurre a altas concentraciones de Mg²⁺ no es afectada, lo que indicaría que para que el inhibidor sea efectivo se necesita la estructura intacta del ribosoma.

Este inhibidor ha sido parcialmente purificado usando cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en geles. El inhibidor tendría un peso molecular aproximado de 200.000 dalton, determinado por filtración en columnas de Sephadex G-200.

Actualmente se está estudiando la naturaleza y especificidad del inhibidor, así como su posible papel en el desarrollo de los oocitos de *X. laevis*.

Rol de sulfátidos en la actividad (Na⁺ K⁺) Trifosfatasa en membrana plasmática. (A role for sulphatide in membrane-bound sodium potassium ATPase).

GONZALEZ, M., MORALES, M. y ZAMBRANO, F.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Varios autores han encontrado una alta concentración de sulfátidos en: médula externa de riñón, glándula de la sal de aves marinas, glándula rectal de Spiny dogfish y órgano eléctrico de anguila. Caracterizándose éstos por alta actividad de (Na⁺ K⁺) ATPasa sensible a ouabaina y por poseer un sistema de transporte de Na⁺ corticoesteroide dependiente. Esto, más los resultados obtenidos en las ATPasas aisladas y purificadas por Hokin del órgano eléctrico de la anguila y de la glándula rectal del dogfish (tollo) que muestran un notorio enriquecimiento en sulfátido, nos hacen postular un posible rol de este glicolípido en la actividad (Na⁺ K⁺) ATPasa.

Estudios realizados en branquias y epitelios abdominal de larvas de *C. caudivertebra* en distintas etapas de desarrollo señalan que: 1) la actividad ATPásica está presente cuando el epitelio es fisiológicamente funcional y esta actividad está directamente asociada a la presencia de sulfátidos, 2) la hidrólisis de sulfátidos mediante Arylsulfatasa provoca una inhibición de la (Na⁺ K⁺) ATPasa similar al efecto de ouabaina, y 3) el contenido de fosfatidilserina es constante en los distintos estados larvales no asociándose a la funcionalidad del epitelio.

Estos resultados más los experimentos de De Pont (descarboxilación de fosfatidilserina *in situ*) parecen

refutar el postulado de Post que señala a fosfatidil-serina como el requerimiento lipídico específico de la actividad ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) ATPasa ligada a transporte activo de Na^+ y K^+ .

Prenilsintetasas de flavado de Citrus sinensis. (Prenylsynthetases of Citrus sinensis flavado).

HASHAGEN, U., DE LA FUENTE, M., CECILIA ROJAS, LILIANA CHAYET, LUZ MARIA PEREZ, LUIS ANTONIO FERNANDEZ, OSVALDO CORI.—(Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile).

Las actividades prenilsintéticas de un polvo cetónico de flavado de *Citrus sinensis* fueron purificadas entre 30 y 40 veces a partir de un extracto. El rendimiento obtenido fue del 50%. Se estudiaron las propiedades de la fracción purificada, y luego se caracterizó la actividad C_{15} prenilsintética, que produce pirofosfatos alílicos de 15 átomos de carbono de conformación *trans* alrededor del doble enlace 2-3. Se determinaron para ella las K_m aparentes para ambos sustratos: para geranilpirofosfato fue de 7.3×10^{-7} M y para isopentenilpirofosfato de 4.9×10^{-8} M.

Los análogos del sustrato alílico como nerilpirofosfato, octilpirofosfato, geranilmonofosfato, y nerilmonofosfato fueron inhibidores bastante débiles de la C_{15} prenilsintetasa. La enzima requiere Mg^{++} para su máxima actividad. El Mn^{++} también la activa en cambio el Ca^{++} no tiene ningún efecto.

Se exploró la dependencia de grupos SH activos manifestada por la C_{15} prenilsintetasa ya a lo largo de la purificación. Se encontró inactivación irreversible con parahidroximercuribenzoato y luego, más específicamente, con ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitro-benzoico) una inactivación reversible por ditiotreitól. Geranilpirofosfato- Mg^{++} y nerilpirofosfato- Mg^{++} protegen a la enzima frente al ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitro-benzoico). En cambio estos pirofosfato o bien no tienen efecto protector (nerilpirofosfato) o incluso aceleran la inactivación (geranilpirofosfato) en ausencia de Mg^{++} .

Estos resultados sugieren que el verdadero sustrato sea el geranilpirofosfato- Mg^{++} y que sólo éste se ligue al sitio alílico completo de la prenilsintetasa, es decir, tanto al sitio hidrofóbico como al sitio polar.

Activación diferencial de RNA polimerasas de médula ósea de rata por eritropoyetina y testosterona. (Differential activation of rat bone marrow RNA polymerases by erythropoietin and testosterone).

LUDWIG, U., GARRIDO, F. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

Las hormonas participan en la regulación de la expresión génica, induciendo cambios en el espectro enzimático de células blanco cuando sintetizan RNAs muy específicos.

La eritropoyesis constituye un buen sistema biológico para el estudio de los mecanismos moleculares de la regulación de la actividad del gen y en él par-

ticipan las hormonas Eritropoyetina y Testosterona.

El propósito de este trabajo es comprobar la interrelación bioquímica de ambas hormonas en la regulación del proceso y, específicamente, determinar su acción diferencial a nivel de las RNA polimerasas de núcleos de médula ósea.

Para ello se estudió su efecto en la incorporación de un precursor marcado de RNA (^3H -UTP) a los diversos RNAs sintetizados en núcleos aislados de animales normales, anémicos y policitémicos.

Tomando esta incorporación como medida indirecta de la actividad RNA polimerásica, y usando un sistema de ensayo adecuado para poder discriminar entre las RNA polimerasas I, II y III (distinta fuerza iónica, presencia o ausencia de α -amanitina), se encontró que la eritropoyetina estimula preferencialmente la actividad de la RNA polimerasa II, mientras que testosterona aumenta la actividad de la RNA polimerasa I.

Estos resultados junto a otros encontrados en este laboratorio permiten postular que ambas hormonas actúan sinérgicamente para generar la maquinaria bioquímica que sintetiza la hemoglobina, macromolécula que caracteriza el proceso.

Estudio comparativo de receptores para 5 α -dihidrotosterona en próstata normal y adenocarcinoma prostático de rata. (Comparative study of 5 α -dihydrotestosterone receptors in normal prostate and prostatic adenocarcinoma of rat).

MEDEL, R., SIERRALTA, W. y PINO, A. M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago 11.

Los tumores que afectan a la glándula prostática muestran concentraciones intracelulares de 5 α -dihidrotosterona más elevadas que el tejido prostático normal, debido a que presentan una mayor capacidad de retenerlos.

Un estudio de los receptores para este metabolito en adenocarcinoma prostático de rata, muestran diferencias significativas en las características de unión y cinéticas con respecto a la próstata normal. Los receptores del adenocarcinoma poseen constantes de asociación (K_a) de $3,23 \times 10^{10}$ M^{-1} a 25°C y $8,92 \times 10^9$ M^{-1} a 0°C que son significativamente mayores que las de los receptores del tejido normal ($8,65 \times 10^9$ M^{-1} y $4,9 \times 10^9$ M^{-1} respectivamente). Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de disociación del complejo 5 α -DHT-receptor (K_{-1}) en el caso del adenocarcinoma es menor ($5,95 \times 10^{-7}$) que para el caso de la próstata normal ($1,25 \times 10^{-6}$ seg^{-1}) lo que coincide con las diferencias encontradas para los valores de K_a .

Aunque estas diferencias indican la posibilidad de una alteración de tipo estructural de los receptores del adenocarcinoma solo se pudieron establecer pequeños cambios en la movilidad electroforética y especificidad de unión de diferentes hormonas. En el caso del análisis electroforético el pequeño cambio de la movilidad se puede deber a una pequeña diferencia de carga, que presentan entre sí los receptores de estos tejidos. El cambio en la especificidad es claro ya que

la inhibición de la unión de 5α -DHT al receptor producido por testosterona y estradiol es mayor en el caso del receptor del tejido tumoral.

Por último los estudios indican que el adenocarcinoma prostático posee una mayor concentración relativa de sitios receptores ($28 \pm 2,5$ fentomoles/mg proteína) que la próstata normal ($17,5 \pm 2,0$ fentomoles/mg proteína), lo que podría dar cuenta junto con los resultados obtenidos para las K_a de las mayores concentraciones de 5α -DHT encontrada por otros autores en tumores prostáticos.

Efectos del estado nutricional en la actividad de algunos mono-oxigenasas y en el contenido de los componentes de la cadena de transporte de electrones en microsomas de hígado de rata. (Effects of the nutritional state on the activity of some mono-oxygenases and on the contents of the components of the electron-transport chain in rat liver microsomes).

PEDEMONTTE, J. y GIL, L.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

Para estudiar el efecto del estado nutricional en el sistema de oxidasas de función mixta, se han utilizado 2 grupos de ratas. a) Grupo Control. Ratas recién nacidas de la cepa Wistar, fueron mantenidas en camadas de ocho ratas por madre nodriza; a los 21 días fueron destetadas y alimentadas *ad libitum* con una dieta 10% ND₁ Cal. b) Grupo Desnutrido. Ratas recién nacidas de la misma cepa fueron colocadas en camadas de 16 ratas por madre nodriza; a los 21 días fueron destetadas y alimentadas *ad libitum* con una dieta aprotéica. A los 35 días de edad las hembras de ambos grupos fueron sacrificadas, preparándose los microsomas correspondientes.

Al comparar la actividad de algunas desmetilasas e hidroxilasas se observó que la capacidad oxidativa estaba fuertemente disminuida en el grupo desnutrido. El contenido de las hemoproteínas citocromo P-450 y citocromo b_5 , como la actividad NADH b_5 reductasa fueron también menores en animales desnutridos, sin embargo, la actividad NADPH citocromo P-450 reductasa fue similar en ambos grupos.

Análisis de los espectros de Resonancia Electrónica Paramagnética indican la presencia en ambos grupos de formas de la hemoproteína terminal de bajo spin.

Evidencias espectrales cinéticas, de unión de ligandos y electroforéticas sugieren la presencia en ratas desnutridas de algunas especies de la oxidasa terminal, diferentes a las que se encuentran en ratas controles. Los resultados que se discuten demuestran que el estado nutricional afecta drásticamente la actividad catalítica de algunas monooxigenasas y produce alteraciones en la composición del sistema oxidativo.

Hidrólisis de pirofosfatos alílicos por enzimas de flavedo de naranjas. (Hydrolysis of allylic pyrophosphates by enzymes from orange flavedo).

PEREZ, L. M., TAUCHER, G. Y CORI, O.—Laboratorio de Bioquímica General Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

En un sistema libre de células obtenido de flavedo de naranjas, existen fosfatasas que hidrolizan fosfo-monoésteres y fosfoanhídridos. También hidroliza pirofosfatos de estructura isoprénica, que son intermediarios en la biosíntesis de mono y sesquiterpenos, dando como productos finales alcoholes que forman parte de los aceites esenciales de la naranja.

Se purificó parcialmente un extracto de polvo cetónico, mediante precipitación con sulfato de amonio; cromatografía de intervención en Sephadex G-25 y cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa. La actividad prenilfosfatásica se ensayó midiendo la radiactividad soluble en hexano, usando como sustratos $1\text{-}^3\text{H}$ -geranilpirofosfato y $1\text{-}^3\text{H}$ -nerilpirofosfato, obtenidos sintéticamente.

La enzima purificada 40 veces con un 35% de rendimiento, se encuentra libre de colorantes, e hidroliza una serie de sustratos fosforados a diferentes velocidades. La hidrólisis de prenilpirofosfatos ocurre en forma secuencial, con formación de monofosfato como intermediario. Este alcanza una concentración de estado estacionario, dando finalmente un alcohol no reordenado (nerol geraniol). La velocidad de hidrólisis de los prenilmonofosfatos es mayor que la de los respectivos pirofosfatos. La acumulación de prenilmonofosfatos es el resultado de una inhibición de la actividad fosfomonoesterásica por pirofosfatos alílicos. Las actividades prenilpirofosfatásicas disminuyen en presencia de EDTA ó 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato). El pirofosfato inorgánico, ortofosfato y ATP son inhibidores de las prenilfosfatasas. Se demostró una supresión parcial de los efectos inhibitorios de ATP por concentraciones crecientes de P_i . Por otra parte, éste puede activar ligeramente a la enzima inhibida por ATP.

Se piensa que la prenilfosfatasa tendría dos formas E_A y E_B , de las cuales E_B sería más activa. El ATP desplazaría el equilibrio ligándose con E_A y el P_i a su vez desplaza el equilibrio $\text{ATP}\cdot E_A$ hacia E_B .

Isoenzimas de Piruvato Quinasa en hígado de vertebrados. (Pyruvate kinase isoenzymes in vertebrate liver).

PRELLER A. y URETA T.— Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El estudio de las diferencias cualitativas y cuantitativas de componentes de sistemas isoenzimáticos en diversas especies de animales permite establecer correlaciones con algunas peculiaridades de la regulación metabólica en esas especies. En comunicaciones previas se han mostrado estudios de este tipo utilizando las isoenzimas de hexoquinasa de hígado, las que muestran diferencias profundas entre mamíferos y anfibios por una parte y aves y reptiles superiores por otra. Con el objeto de saber si los sistemas isoenzimáticos de una vía metabólica sufren variaciones coordinadas, durante la evolución se estudiaron las piruvato quinasas (EC 2. 7. 1. 40, isoenzimas L, K y M) en el hígado de vertebrados.

Las isoenzimas se aislaron por cromatografía en DEAE-celulosa de extractos de hígado de mamíferos (rata, degu), aves (pato, gallo, gorrion, codorniz),

reptiles superiores (culebra de cola larga y lagartijas de varias especies), quelonios (tortuga) y anfibios bufonidos y leptodactílidos.

La piruvato quinasa tipo K se encontró en el hígado de todas las especies analizadas y es la forma predominante en aves y reptiles. La isoenzima tipo L se observó en mamíferos. Ambas formas presentan cinética sigmoidea y son activadas por fructosa-1,6-bisfosfato. La piruvato quinasa tipo M, de cinética michaeliana e insensible a fructosa-1,6-bisfosfato, se encontró en el hígado de todas las especies analizadas con excepción de mamíferos.

Si bien los diferentes taxa analizados difieren en sus piruvato quinasa, los cambios observados no son equivalentes a los descritos en el caso de las hexoquinasa, por lo que no es posible inferir la existencia de un patrón evolutivo coordinado entre isoenzimas de una misma vía metabólica.

Comparación entre histonas de células somáticas con histonas de células embrionarias en estados de clivaje. PUCHI, M., MASSONE, R., GAMBOA, S. e IMS-CHENETZKY, M.— Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción.

La existencia de histonas típicas durante los primeros estados de desarrollo embrionario ha sido muy discutida, siendo los resultados existentes hasta la fecha poco concluyentes al respecto.

Con el objeto de contribuir a la resolución de este problema se han aislado proteínas solubles en H_2SO_4 0,4 N a partir de cromatina de cigotos de "*Tetrapigus Niger*" 40 y 90 minutos después de la fecundación del oocito.

Estas proteínas han sido comparadas con: histonas típicas aisladas de células somáticas (típo de ternera e hígado de rata); con histonas provenientes de gametos y de embriones en estado más avanzado de desarrollo (prisma).

Los resultados obtenidos indican que la dotación de histonas de las células en clivaje es muy semejante a la de ovas; tanto en su movilidad electroforética como en su composición de aminoácidos; son sin embargo, muy diferentes a las presentes en gametos masculinos. Tanto los patrones electroforéticos como la relación lisina/arginina sugiere que en células en clivaje estarían presente los 5 tipos fundamentales de proteínas histónicas H2A, H2B, H3, H4 y H1.

Las histonas de células en clivaje difieren principalmente de histonas típicas en la heterogeneidad de la fracción H1 y en un mayor contenido de Acido Aspártico. Se discute la posibilidad de existencia de histonas tipo H1 (ricas en lisina) atípicas, durante los primeros ciclos replicativos de embriones de "*Tetrapigus Niger*".

Regulación hormonal de la γ -glutamyltranspeptidasa en hígado y glándula mamaria de rata, durante el ciclo lactogénico y la preñez inducida (Hormonal regulation of γ -glutamyl transpeptidase in liver and mammary gland during the lactogenic cycle and induced pregnancy in the rat).

PUENTE, J., VARAS, M. A., BECKHAUS, G. Y SAPAG-HAGAR, M.—Laboratorio de Química Fisiológica y Patológica. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

Los cambios metabólicos que se producen en la glándula mamaria entre el final de la preñez y el comienzo y mantención de la lactancia son considerables y hasta el momento no del todo conocidos.

La enzima de membrana γ -glutamyltranspeptidasa (γ -GT), característica de los tejidos secretores, es regulada en hígado por AMPc y en vesículas seminales por testosterona. Se le supone la función de transportar aminoácidos al interior de la célula utilizando glutatión reducido (GSH) como aceptor de los aminoácidos. Hemos comparado la γ -GT de glándula mamaria e hígado de ratas en ciclo lactogénico y en la preñez inducida hormonalmente, con el fin de determinar si presentan el mismo patrón de regulación.

Se trabajó con ratas Sprague-Dawley en ciclo lactogénico natural y ovariectomizadas con tratamientos de estradiol-progesterona para inducir preñez. La γ -GT se determinó con L- γ -glutamyl-p-nitroanilida como sustrato, el AMPc y adenilato ciclasa radioisotópicamente y GSH con el reactivo de Ellman.

Las variaciones de γ -GT y AMPc en la glándula mamaria no presentan una correlación directa, sin embargo, en hígado son prácticamente coincidentes. El alza de AMPc y γ -GT en la glándula mamaria ocurre al mismo tiempo, límite entre preñez y lactancia, que la disminución de ambos en hígado. El fenómeno es cualitativamente homologado en la preñez inducida, demostrándose que la γ -GT mamaria aumenta dependiendo del tiempo de tratamiento con estradiol-progesterona. Ambas hormonas aumentan la actividad *in vitro* de la adenilato ciclasa. Se postula que la señal hormonal de control de AMPc en los dos órganos podría ser directo o indirectamente estradiol-progesterona.

Purificación y propiedades de una enzima que relaja DNA en Pseudomona marina BAL-31. (Purification and properties of a DNA relaxing enzyme from marine Pseudomone BAL 31).

REINBERG, D., BULL, M., VICUNA, R. y YUDELEVICH, A.— Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Se ha purificado parcialmente una enzima capaz de relajar DNA sobreenrollado a partir de Pseudomona Bal 31. La enzima muestra requerimientos absolutos de Mg^{2+} para su actividad. La presencia de sales, tales como Na^+ o K^+ son también requeridas, alcanzándose una actividad máxima en presencia de Na^+ 0,2M. Espérmidina no tiene ningún efecto sobre la enzima, N' etil maleimida inhibe parcialmente la actividad de ésta.

Al parecer, la enzima es dependiente del grado de sobreenrollamiento que posee el DNA usado como sustrato, ya que, relaja completamente DNA col E₁ y parcialmente un híbrido formado por col E₁ y DNA de levadura.

Esta enzima posee algunas características similares a las encontradas en otras enzimas "Nicking-Closing" de origen procarriótico, tales como, requerimiento absoluto de Mg^{+2} y una fuerte dependencia del grado de sobreentrenamiento del sustrato.

Purificación y caracterización de una Beta-Lactamasa extracelular de streptomyces UCSM 104. (Purification and characterization of an extracellular Beta-Lactamase of streptomyces UCSM 104).

REINICKE, K. y GARCÉS, E.—Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción.

La producción de la beta-lactamasa por la cepa de *Streptomyces UCSM-104* es alta y se acompaña de pigmentos que es posible eliminar totalmente con la metodología de purificación descrita en el presente trabajo.

En cromatografía de DEAE-Celulosa manifiesta su carácter aniónico, eluyendo a una fuerza iónica correspondiente a 135 mM de KCl, lo que se corrobora por electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta enzima es una proteína globular de bajo peso molecular, con aproximadamente 124 residuos de aminoácidos.

Frente a diferentes sustratos ensayados, se comporta como penicilinas, presentando mayor actividad con bencilpenicilina y ampicilina. A su vez, cloxacilina y meticilina presentan una inhibición de tipo competitiva lineal frente a bencilpenicilina como sustrato. De acuerdo al criterio de Jack y Richmond, la hidrólisis enzimática de cefaloridina es inhibida por meticilina y resistente a cloxacilina. Su actividad catalítica no es influenciada por altas concentraciones de sulfato de amonio (0.2 M) ni por fosfato de sodio (0.1 M), obteniéndose además muy poca variación en un amplio rango de pH. Tampoco requiere la presencia de metales para efectuar la hidrólisis enzimática de bencilpenicilina, manifestando por el contrario, sensibilidad a la inhibición por iones cobre.

Experiencias con reactivos tiólicos indican la presencia de grupos sulfhidrilos y por lo tanto residuos de aminoácidos de cisteína. Evidencias adicionales indican que por lo menos algunos de los residuos de cisteína participan en el sitio activo de la enzima.

Síntesis y purificación de ATPCr y ADPCr. Propiedades cinéticas de las pirofosfohidrolasas de S. Tuberosum en presencia de estos complejos. (Synthesis and purification of ATPCr and ADPCr. Kinetic Properties of Pyrophosphorylases from S. tuberosum in the presence of these complexes).

RIVERA, J., VALENZUELA, M. A. y TRAVERSO-CORI, A.—Laboratorio de Bioquímica, Depto. Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

Se obtuvieron complejos de ATPCr y ADPCr a partir de $Cr(NO_3)_3$. Estos complejos fueron separados y purificados de su medio de reacción cromatográfica-

mente a través de columnas de intercambio catiónico (Dowex X 2; (H^+)). Los complejos se identificaron mediante los métodos de fósforo total (P_t); cromo total; fósforo ácido lábil (Plábil); absorción a λ 260; cromatografía en papel y electroforesis en papel.

Ambos complejos son estables en soluciones ácidas y pueden guardarse a $-20^\circ C$ por meses, sin sufrir modificaciones.

Los complejos de cromo de estos nucleótidos no son sustratos de las pirofosfohidrolasas de la papa, comportándose más bien como análogo de sustratos químicamente inertes que afectarían en consecuencia ciertas propiedades cinéticas características de estas enzimas vegetales.

El ATPCr es un buen inhibidor de la actividad ADPásica, sin embargo, un mal inhibidor de la actividad ATPásica tanto en las pirofosfohidrolasas provenientes de *S. tuberosum* var. Pimpernel como la de la var. Desireé.

Estudios de protección por estos complejos de Cr de la acción inactivante específica de algunos reactivos modificadores de residuos de triptofano nos hacen suponer que estos complejos de cromo, químicamente inertes podrían reaccionar más bien con los residuos envueltos en la unión del sustrato y no en la catálisis.

Biosíntesis de hidrocarburos monoterpénicos cíclicos (Biosynthesis of cyclic monoterpene hydrocarbons) ROJAS, M. C., CHAYET, L., SANCHEZ, G., VIAL, M. V., CORI, O.—(Facultad de Ciencias Químicas) y GLORIA PORTILLA (Departamento de Química, Facultad de Ciencias) Universidad de Chile.

Se describe la purificación de una homociclasa obtenida de flavedo de *Citrus limonum* usando precipitación con polietilenglicol e intercambio aniónico.

La o las homociclasas producen β -pineno, α -pineno y limoneno a partir de ($1-^3H$) nerilpirofosfato (NPP) o de su isómero *trans*, el ($1-^3H$) geranilpirofosfato (GPP) sin que medie una isomerización *trans-cis* en el proceso. En algunas partidas de enzima se observa además la aparición de sabineno. Se descartan además isomerizaciones no enzimáticas de los hidrocarburos en el proceso analítico que implica tratamiento con ácido silícico.

Las homociclasas requieren de la presencia de grupos SH, como se demuestra por el requerimiento de mercaptoetanol o ditiotreitól en el proceso de purificación y por la inactivación por (para) cloromercuribenzoato o por 5,5' bis-ditio (2 nitrobenzoato).

Los monofosfatos de nerol y geraniol no son sustratos, sino que son inhibidores. Lo mismo ocurre con el pirofosfato inorgánico. La enzima requiere Mn^{++} en forma absoluta; el Mg^{++} no puede reemplazarlo.

Se estudian las condiciones para la formación no enzimática de limoneno a partir tanto de NPP como de GPP, catalizada por Mn^{++} y no por Mg^{++} . Esto sugiere que la transformación del carbocatión *trans* generado por el GPP puede cambiar su conformación sin necesidad de enzima, y que el Mn^{++} hidratado podría participar en este proceso.

Requerimientos Estructurales en las Reacciones de la UDP-glucuroniltransferasa con compuestos Opioides. (Structural requirements in the reaction of UDP-glucuronyl transferase with Opioids compounds).

SANCHEZ, E. y DEL VILLAR, E.— Departamento de Farmacología y Departamento de Bioquímica, Fac. Medicina Norte, Universidad de Chile.

Se estudia la influencia de los grupos 3-hidroxilo y N-alquilo presentes en la estructura de narcóticos en su reactividad con la UDP-glucuroniltransferasa. Narcóticos que poseen ambos, uno o ninguno de estos grupos se ensayaron en su capacidad para inhibir la glucuronidación de morfina en microsomas hepáticos de conejo. Aquellos con un solo grupo, ya sea 3-hidroxilo (Normorfina) o N-alquilo (Codeína, Etilmorfina) fueron inhibidores competitivos menos potentes que aquellos, conteniendo ambos grupos (dextrorfano, levorfano). Nalcodeína que carece de ambos grupos no tuvo efecto inhibitorio. Los narcóticos sintéticos (+) — y (—) — metadonas, (—) — α — acetilmetadol y meperidina, que contienen solamente grupo N-alquilo, produjeron notable inhibición competitiva. No se observó estereoselectividad de la morfina-glucuroniltransferasa por los isómeros opioides.

Resultados indican que el grupo N-alquilo en la estructura de opioides juega un papel fundamental en la interacción de narcóticos.

Caracterización de RNA liberado por células tumorales en cultivo. (Characterization of RNA released by tumor cells in culture).

SIERRA TIRADO, L. F. y OJEDA, J. M.— Sección Virología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Santiago Norte, Universidad de Chile.

Cultivos *in vitro* de células HEP-2 son capaces de liberar RNA a su medio de cultivo. Este RNA extracelular fue purificado mediante digestión con pronasa, diálisis exhaustiva, extracción de proteínas con fenol y filtración en columnas de Sephadex G-75. El producto así obtenido se caracteriza por: incorporar ^3H -Uridina, da reacción de orcinol positiva, es precipitable por TCA al 15% y tiene un coeficiente de sedimentación tipo 4-5S determinado en gradiente de sacarosa. Además, este RNA tiene un alto contenido en bases metiladas detectables por espectroscopia de luz infrarroja y ultravioleta, y por incorporación de grupos metilo marcados radiactivamente, y presenta una mayor resistencia a la acción hidrolítica por ciertas ribonucleasas que el RNA celular. Se discute una posible asociación con componentes proteicos y polisacáridos, así como su función biológica.

Diferentes tRNA Metil transferasas en núcleo y citoplasma de oocitos Xenopus laevis. (Different Transfer RNA Methyl Transferases in Nuclei and Cytoplasm of Xenopus laevis Oocytes).

SOLARI, A. y ALLENDE, J. E.— Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile.

Los tRNA₄ al igual que otras especies de RNA sufren importantes modificaciones post-transcripcionales que son consideradas como reacciones de "procesamiento". Una de esas modificaciones es la metilación de nucleótidos ya sea en los azúcares o en sus bases. Las enzimas que catalizan estas reacciones usan como donador de grupos metilo S-Adenosil L metionina (SAM) y han sido caracterizadas en múltiples tejidos. Algunos autores han postulado que estas enzimas juegan papeles importantes en la regulación de la proliferación celular. Nosotros hemos comenzado a estudiar las tRNA metil transferasas en oocitos de *Xenopus laevis* como un nuevo enfoque destinado a explorar el procesamiento de los tRNA₄. Usando extractos crudos de ovarios de *X. laevis* y SAM (^3H metil) hemos encontrado que tRNA total de *E. Coli* B sirve como aceptor de grupos metilo. Preparaciones purificadas de tRNA como ovario de *X. laevis*, levadura y germen de trigo fueron pobres aceptores, indicando que probablemente están completamente metilados en las posiciones específicas para las enzimas de ovario.

Con el aislamiento de núcleos por disección manual ha sido posible determinar que el núcleo contiene una actividad de tRNA metil transferasa que representa aproximadamente el 50% de la actividad celular. Esta fracción enzimática difiere de la actividad encontrada en citoplasma (oocitos enucleado), en que es estimulada en gran medida por Mg^{+2} y espermína, los cuales no tienen efecto en la (s) enzima (s) citoplasmática. A su vez las Km para tRNA total de *E. Coli* son distintas para ambos casos: usando tRNA específicos de fenilalanina de *E. Coli* se ha encontrado que resulta ser un excelente sustrato para la fracción enzimática citoplasmática a diferencia de la nuclear. Trabajos futuros nos permitirán caracterizar estas actividades enzimáticas y determinar su posible función.

Modificaciones in vivo de los niveles de glutathion reducido y cisteína por nucleótidos cíclicos, glucagón e insulina en hígado de rata. (In vivo modifications of reduced glutathione and cysteine levels by cyclic nucleotides, glucagon and insulin in rat liver).

SPEISKY, H., SOMLAI, A., DONOSO, E. y SAPAG-HAGAR, M.— Laboratorio de Química Fisiológica y Patológica. Depto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

Se sabe desde hace un tiempo que el ayuno (12-15 horas) en la rata induce a la γ -glutamyltranspeptidasa hepática con una disminución concomitante en los niveles de glutatión reducido (GSH). Se ha descrito igualmente un aumento del AMP cíclico (AMPc) en el hepatocito por el ayuno.

Hemos estudiado el efecto *in vivo* de la inyección i. p. de dibutiril-AMPc y del glucagón sobre la γ -glutamyltranspeptidasa y de los metabolitos GSH y cisteína en hígado de ratas no ayunadas.

Tanto el AMPc, como el glucagón producen una caída del GSH a la tercera parte del valor basal original a las dos horas, con un simultáneo aumento de cisteína.

La γ -glutamyltranspeptidasa en estas condiciones no presenta una modificación apreciable que explique las variaciones de GSH. Por otra parte, la actinomicina D anula el efecto del AMPc o glucagón sobre el GSH y cisteína, sugiriendo la existencia de otro sistema que dé cuenta de dichos cambios.

La inyección i.p. de dibutiril-GMPc no modifica los cambios producidos por el AMPc, sugiriendo que estos dos nucleótidos, en el sistema en estudio, no actúan en forma opuesta. Iguales resultados se obtuvieron con insulina, que se postula actúa vía GMPc.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el reservorio de cisteína representado por el GSH podría movilizarse por efecto del AMPc, segundo mensajero de la acción hormonal, en algunas situaciones neoglucogénicas.

Mecanismos Biológicos de Defensa: Posible participación de las enzimas Superoxidismutasa y Catalasa en la formación de un sistema protector de la célula contra la toxicidad del oxígeno. (Biological Mechanisms of Defense: Possible role of the enzymes Superoxidismutase and Catalase in the formation of a protein system in the cell against oxygen toxicity).

VALENZUELA, A., GOMEZ, P., HOFMANN, J.—Laboratorio de Bioquímica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile.

El metabolismo del oxígeno molecular implica la formación de radicales libres de alta reactividad como son los radicales superóxidos y los radicales hidroxilos. Estos radicales son iniciadores de la lipoperoxidación celular cuyas consecuencias a nivel celular son bien conocidas. Los productos de este proceso alteran sistemas enzimáticos, estructuras subcelulares, etc. e incluso se les ha relacionado con el envejecimiento celular. Se ha descrito un sistema enzimático, integrado por la enzima glutatión peroxidasa, que permitiría detoxificar la célula al metabolizar los peróxidos derivados de la lipoperoxidación. Nuestros resultados nos permiten postular que las enzimas superoxidismutasa y catalasa integrarían otro sistema enzimático cuya función sería impedir el inicio de la lipoperoxidación al destruir los radicales libres iniciadores del proceso.

Propiedades cinéticas de dos isoenzimas de S. Tuberosum. (Kinetics properties of two isoenzymes of *S. tuberosum*).

VALENZUELA, M. A., KETTLUM, A. M., URIBE, I., SILVA, S. y TRAVERSO-CORI, A.—Laboratorio Bioquímica General. Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile.

La hidrólisis enzimática de enlaces pirofosfóricos de compuestos orgánicos e inorgánicos la hemos llamado actividad pirofosfohidrolásica o apirásica. Los substratos comúnmente usados son el ATP y el ADP. Según la V_{max} , con que hidrolizan a estos substratos

hemos clasificado las isoenzimas en las de cociente ATPásico/ADPásico: alto, bajo e intermedio. Estas isoenzimas se han obtenido de diferentes variedades de *S. tuberosum*.

El presente trabajo compara las propiedades cinéticas de las actividades ATPásica, ADPásica, tripolifosfatásica y pirofosfatásicas de dos isoenzimas de *S. tuberosum*.

Se encontró que estas cuatro actividades enzimáticas en ambas isoenzimas son absolutamente dependientes de metal bivalente medidas en el pH óptimo correspondiente de cada actividad hidrolítica, aun cuando las actividades con substratos inorgánicos (PPP y PP) son de pH óptimo 5,0.

Los perfiles de pH de las actividades enzimáticas de las dos isoenzimas usando Ca^{++} o bien Mn^{++} saturante tienen máximos de actividades que difieren el uno del otro en 1,0 a 0,5 unidad de pH.

Las K_m de las cuatro actividades enzimáticas en las dos isoenzimas son prácticamente las mismas solo difieren en las V_m de ATP lo cual explica los diferentes cocientes enzimáticos.

Los P.M. para las dos isoenzimas son alrededor de 50.000 Dalton.

Efecto selectivo de la eritropoyetina y testosterona sobre la biosíntesis de diferentes tipos de RNA nuclear de médula ósea de rata. (Selective effect of erythropoietin and testosterone on the biosynthesis of different nuclear RNA types of rat bone marrow).

WAISSBLUTH, L., GARRIDO, F. y PERRETTA, M.—División de Bioquímica y Biofísica. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Chile. Santiago.

La citodiferenciación de los eritrocitos a partir de células basales pluripotenciales (stem cells) en médula ósea de rata, provee de un sistema adecuado para estudiar algunos de los eventos bioquímicos de la acción hormonal. En el presente trabajo se han realizado experimentos tendientes a demostrar la acción de la eritropoyetina y testosterona como moduladores de la eritropoyesis.

Análisis electroforéticos del RNA nuclear muestran que la eritropoyetina activa principalmente la RNA polimerasa II, induciendo la síntesis de RNAs con coeficientes de sedimentación 30S, 21-22S, 15-16S y 9S, correspondiendo los tres primeros a especies precursoras del RNA 9S, que ha sido descrito como el mensajero funcional para las globinas. Por otra parte, la testosterona activa la RNA polimerasa I, aumentando fundamentalmente la síntesis de las especies ribosomales 28 y 18S. Así mismo, aparece aumentada por acción del andrógeno la síntesis de un RNA 4S que correspondería al RNA de transferencia.

Los resultados presentados parecen indicar que la eritropoyetina y testosterona ejercen su acción de manera sinérgica en médula ósea de rata, induciendo la síntesis de diferentes especies de RNA, los que finalmente conformarán la maquinaria bioquímica necesaria para sintetizar las globinas.

Purificación y propiedades de la RNA polimerasa de Thermus thermophilus HB-8. (Purification and properties of Thermus thermophilus RNA polymerase). ZALDIVAR, M. J., QUIROGA, M. y VENEGAS, A.—Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile, Santiago.

Para estudiar el proceso de síntesis de RNA a altas temperaturas, hemos purificado, como etapa inicial, la RNA polimerasa de *Thermus thermophilus* HB-8, un termófilo extremo.

La purificación se realizó mediante fraccionamiento con sulfato de protamina y cromatografía en DEAE Sephadex, Sepharosa 6B y DNA celulosa. Se obtuvo una enzima con una actividad específica de alrededor de 5.000 unidades/mg de proteína, lo que corresponde a una purificación de aproximadamente 400 veces. Estudios estructurales indican que esta enzima está

constituida por 5 subunidades de PM 175.000, 130.000, 80.000, 42.000 y 38.000 daltons. Los requerimientos de cofactores y pH son similares a los de la enzima de *E. coli*, pero la diferencia una gran termoestabilidad y resistencia a agentes desnaturalantes.

Se estudió la unión de la enzima a DNA, midiéndose la retención del complejo (enzima-DNA) en filtros de nitrocelulosa, a diferentes temperaturas (entre 20° y 80°). Estudios con la fracción Sepharosa 6B, muestran que este proceso es independiente de la temperatura en el rango estudiado. Estudios de entrecruzamiento entre DNA y la enzima por acción de luz ultravioleta, indican que es la subunidad de PM 170.000 daltons la que se une covalentemente a DNA.

En conclusión, la enzima purificada de este bacterio termofílico presenta propiedades estructurales y rasgos generales similares a las RNA polimerasas de otros procariontes, exceptuando su gran estabilidad frente al calor y agentes desnaturalantes.