

COLOQUIO:**Efecto de metales en reacciones enzimáticas****EFFECTO DE Mn^{2+} SOBRE LAS FORMAS MOLECULARES DE LA ARGINASA DE HIGADO HUMANO.** (Effect of Mn^{2+} on the molecular forms of human liver arginase)

NELSON CARVAJAL. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile).

La cromatografía de intercambio iónico de preparaciones semipurificadas de arginasa de hígado humano resuelve la actividad enzimática en dos especies, identificadas como enzima I y II de acuerdo al orden en que eluyen de una columna de CM-celulosa. Ambas especies requieren en forma absoluta de Manganeseo para su actividad catalítica pero, aparte de su carga eléctrica, difieren en forma importante en sus características estructurales y cinéticas.

La enzima II corresponde a una proteína tetramérica de peso molecular 118.000, y se disocia en subunidades inactivas cuando se le remueve el metal activador. Tanto la actividad catalítica como la estructura cuaternaria de la enzima se recuperan cuando se agrega Mn^{2+} a las subunidades. Inmovilizando la enzima nativa a través de una sola subunidad, ha sido posible obtener subunidades aisladas que se activan con Mn^{2+} sin reasociarse. Se han obtenido también dímeros aislados de la enzima. Al comparar las propiedades enzimáticas al pH óptimo (9.5) no se encuentran diferencias entre los tetrameros, dímeros y monómeros. Sin embargo, a pH 7.5 los monómeros y dímeros presentan una cinética michaeliana, mientras que una de tipo alostérico se observa para la enzima tetramérica.

La enzima I presenta un peso molecular considerablemente mayor que la enzima II, y una cinética michaeliana tanto a pH 9.5 como 7.5. Sin embargo, también se disocia en subunidades inactivas cuando se remueve el metal activador. Si estas subunidades son purificadas por filtración en Sephadex y luego se las reactiva con Mn^{2+} , se forma una especie que tiene todas las características de la enzima II. En cambio, cuando la reactivación se realiza en presencia de

las proteínas no arginasa que la acompañan, se regenera la enzima I original.

En la preparación de enzima I se encontró una importante actividad de arginosuccinasa. La interacción entre esta última enzima y la arginasa se demostró al incubarla en presencia de Mn^{2+} con subunidades obtenidas de la enzima II. Al omitir el ion metálico activador, no se observó esta interacción.

Los resultados obtenidos sugieren que la unión de Mn^{2+} en las subunidades de arginasa se acompaña de un cambio conformacional que favorece la formación de la enzima tetramérica libre o de un complejo enzimático.

INTERCONVERSION DE ENERGIA POR LA ADENOSINTRIFOSFATASA Ca^{2+} -DEPENDIENTE DEL RETICULO SARCOPLASMATICO. (Energy interconversion by adenosinetriphosphatase Ca^{2+} -dependent from sarcoplasmic reticulum).

LEOPOLDO DEMEIS. (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biomedicas, Bloco H, Cidade Universitaria, Ilha do Fundao, Rio de Janeiro 21.910-RJ, Brasil.

En condiciones apropiadas, la ATPasa Ca^{2+} dependiente del retículo sarcoplasmático es capaz de catalizar tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. La actividad de la enzima es modulada por la unión del Ca^{2+} en los dos lados de la membrana. La síntesis de ATP comienza con la fosforilación de la enzima por P_i formando una acilfosfoproteína. Esta reacción se observa tanto en presencia como en ausencia de un gradiente de concentración de Ca^{2+} entre un lado y otro de la membrana, y es inhibida por la unión del Ca^{2+} en el sitio de alta afinidad (K_m 1-3 μM a pH 7,0), localizado en la superficie externa de la membrana. Estudios de cinética rápida indican que tanto en la presencia como en la ausencia de gradiente de concentración de Ca^{2+} ,

la fosforilación por P_i transcurre a través de un conjunto de reacciones comunes involucrando formas enzimáticas intermediarias comunes. Una vez formada, la fosfoenzima solamente es capaz de transferir su fosfato al ADP cuando el Ca^{2+} está unido al sitio de baja afinidad (K_m 1-3 mM a pH 7,0) localizado en la superficie interna de la membrana. El ATP puede ser sintetizado en ausencia de un gradiente de concentración de Ca^{2+} . Esto puede ser conseguido de dos maneras: a) *Dos equilibrios*: La ATPasa era inicialmente fosforilada por P_i en ausencia de Ca^{2+} . Después que el equilibrio de esta reacción era alcanzado, se agregaba al medio ADP y un exceso de Ca^{2+} (salto de Ca^{2+}). Cuando el segundo equilibrio era alcanzado, el fosfato de la enzima era transferido al ADP formando ATP. Resultados similares fueron obtenidos en presencia de una concentración constante de Ca^{2+} , variando la afinidad por el Ca^{2+} de los sitios de unión de Ca^{2+} de la enzima mediante una súbita variación del pH del medio (salto de pH). b) *Equilibrio simple*: Pudo observarse un transiente de fosforilación por P_i cuando la enzima fue preincubada en ausencia de Ca^{2+} y luego agregada a un medio que contenía P_i , Mg^{2+} y un exceso de Ca^{2+} . La ATPasa fue fosforilada durante los 100 milisegundos iniciales, siendo hidrolizada en los siguientes intervalos de tiempo. Una pequeña pero significativa cantidad de ATP era sintetizada si se incluía ADP en el medio de incubación conteniendo P_i , Mg^{2+} y Ca^{2+} . Esto no se observaba cuando la enzima era preincubada en presencia de Ca^{2+} . Estos datos sugieren que la energía necesaria para la síntesis de ATP provendría de la remoción del Ca^{2+} del sitio de unión de alta afinidad de la ATPasa.

ROL DE METALES EN LA ACTIVIDAD DE LA DESOXIRIBONUCLEASA PANCREÁTICA. (The role of metals on the activity of pancreatic deoxyribonuclease).

ERNESTO MELGAR, BEATRÍZ LIZÁRRAGA, AURA GIL, CARLOS BUSTAMANTE, DORIS SÁNCHEZ-ROMERO. (Instituto de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú).

La desoxiribonucleasa pancreática, DNasa I, es una enzima que tiene un requerimiento abso-

luto de cationes divalentes para su actividad. Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} y Zn^{++} son activadores de la hidrólisis del DNA; sin embargo, difieren en su efecto sobre la velocidad de reacción, la capacidad de la enzima para romper una sola cadena del DNA o ambas cadenas simultáneamente, los productos finales de hidrólisis, y, por último, se observa que la combinación de algunos pares de cationes, tales como Ca^{++} y Mg^{++} , tienen un efecto sinérgico sobre la actividad enzimática.

Se ha demostrado que tanto el DNA como la DNasa tienen sitios específicos de unión con diversos metales. El DNA liga cationes en sus grupos fosfato, pero además forma enlace coordinados con el Mn^{++} por intermedio de sus bases. La DNasa tiene varios sitios con afinidad para Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} , habiendo sitios específicos y sitios que son comunes en que se observa competición entre cationes.

Existe suficiente evidencia experimental para afirmar que la actividad de la DNasa depende de un plegamiento adecuado de la cadena polipeptídica: la enzima a pH alcalino, baja fuerza iónica o por efecto de la urea, sufre un desenrollamiento molecular que se manifiesta por un incremento del radio de Stokes, observable por filtración en gel, y que está acompañado de pérdida de la actividad. Este fenómeno es completamente reversible en presencia de Ca^{++} , lo que sugiere un rol del catión en la preservación e inducción del plegamiento correcto de la molécula proteica, principalmente cuando la DNasa se encuentra en condiciones que tienden a desorganizar la estructura terciaria.

Por otro lado, se ha observado que el Ca^{++} es un activador muy débil de la enzima, en cambio otros iones como el Mg^{++} , Mn^{++} o Co^{++} presentan velocidades altas de hidrólisis a pH neutro o ácido. Este hecho sugiere que cuando la enzima tiene una conformación correcta reconoce al DNA substrato unido a estos metales. El efecto sinérgico del Ca^{++} en la reacción activada por Mg^{++} confirma esta hipótesis: A pH ácido, cuando la enzima está plegada adecuadamente, el sinérgismo no se observa; por el contrario a pH mayor de 7.0 el sinérgismo es evidente siendo mayor a pHs alcalinos.

En conclusión podemos afirmar que el rol de los cationes en la reacción hidrolítica de la DNasa pancreática es doble: a) formación de un complejo DNA-metal reconocible por la

enzima y b) preservación de la estructura nativa cuando la enzima está en condiciones adversas para su actividad óptima.

INTERACCION ENTRE PIROFOSFOHIDROLASAS VEGETALES Y METALES BIVALENTES. (Interaction of plant pyrophosphohydrolases with bivalent metals).

M. ANTONIETA VALENZUELA P. (Laboratorio de Bioquímica General, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile, Santiago).

La apirasa o pirofosfohidrolasa de *S. tuberosum* cataliza la hidrólisis de enlaces pirofosfóricos tanto de polifosfatos orgánicos como de inorgánicos en presencia de un metal bivalente, principalmente Ca^{2+} .

La determinación de los parámetros cinéticos del sustrato y del metal permite sugerir que el verdadero sustrato de la apirasa es el complejo pirofosfato-metal en relación 1:1.

Los complejos de CrIII con nucleótidos de adenina han sido de gran utilidad para estudiar las interacciones entre un sustrato-metal y enzima. Por su lenta velocidad de intercambio de ligandos son excelentes inhibidores de "fondo de saco" de enzimas que transfieren grupos fosforilos. El CrATP resultó ser un buen inhibidor competitivo con respecto a CaATP y CaADP. La fuerte unión de estos complejos de

CrIII con la enzima a pesar de la inercia química del Cr^{+3} sugiere que la interacción con el sitio activo se efectuaría principalmente a través de la cadena pirofosfórica y no del ion metálico.

La espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica permite confirmar la interacción de metales con proteínas. El espectro de EPR del MnII es muy sensible al medio ambiente electrónico. Por lo tanto el espectro puede cambiar con sustituciones de ligandos o distorsiones geométricas que ocurran en la primera esfera de coordinación del metal. El espectro de EPR del MnII en presencia de la apirasa muestra además del típico sexteto del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$ una transición a campo bajo que puede atribuirse a una distorsión de la geometría del campo cristalino del MnII a una fuerte interacción con la enzima.

La unión de metales bivalentes a la apirasa en ausencia de sustrato, altera sus propiedades cinéticas transformándose en una enzima histerética. Este efecto puede interpretarse como una lenta transición entre dos formas enzimáticas con diferente actividad catalítica.

En conclusión, el complejo nucleótido-metal interactuando a través de la cadena fosfórica sería el verdadero sustrato y que la unión de metales bivalentes a la enzima produce un cambio conformacional desfavorable para la catálisis enzimática. Estas características histeréticas de la apirasa podrían describir un mecanismo de regulación metabólica. (Financiado por subvención B-008-792 del Servicio de Desarrollo Científico y Creación Artística, Universidad de Chile).

COLOQUIO:

Bioquímica de lípidos e isoprenoides

BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS EN *TRYPANOSOMA CRUZI* (Fatty acid biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*)

E.E. AEBERHARD, M.G. LEMA, M.V. DOMÍNGUEZ y D.I.H. BRONIA (Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina).

Hemos demostrado anteriormente incorporación activa de (1-¹⁴C) acetato en ácidos grasos por epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén (XIV Reunión Soc. Argentina Inv. Bioquímica, Argentina, 1978).

Se ha estudiado ahora los ácidos grasos sintetizados a partir de acetato, por cromatografía en capa fina con nitrato de plata, combinada con cromatografía de gases y recolección individual de los ácidos grasos. Se ha comprobado síntesis de ácidos grasos saturados, mono y diinsaturados, principalmente ácidos palmítico (8%), esteárico (14%), oleico (16%) y linoleico (50%). Además se ha determinado la incorporación y metabolismo ulterior de (1-¹⁴C)-ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico) en *T. cruzi* con igual metodología. Los ácidos palmítico y esteárico fueron metabolizados hasta ácidos mono (16-17%) y diinsaturados (52-59%). El ácido oleico fue convertido principalmente en ácidos diinsaturados (39%) mientras que los ácidos linoleico y linolénico no experimentaron metabolización apreciable.

Estos resultados ratifican nuestras observaciones previas con respecto a la presencia en *T. cruzi* de mecanismos de síntesis de ácidos grasos y activa desaturación de los mismos.

MECANISMOS ENZIMATICOS DE LA BIOSINTESIS DE ISOPRENOIDES EN PLANTAS (Enzyme mechanism in the biosynthesis of isoprenoids in plants).

LILIANA CHAYET (Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas, Universidad de Chile, Santiago).

Los isoprenoides constituyen una amplia gama de compuestos lipídicos de características hidrofóbicas que cumplen muy variadas funciones. Cabe señalar esteroides (componentes de membrana), carotenos (fotorreceptor), poliprenoles fosforilados (transportadores de azúcares), parte de coenzimas respiratorias, feromonas y hormonas y muchos de función desconocida.

Es natural entonces que la estructura esté determinada genéticamente por la presencia y especificidad de diversos grupos de enzimas.

Los isoprenoides se sintetizan a partir de unidades isoprénicas (C₅) que pueden ser usadas para construir el esqueleto completo de una molécula o pueden ser unidas a una molécula no terpénica. Biológicamente el proceso de unión de un terpeno a un aceptor es una reacción de prenilación, siendo más común la condensación 1-4 o paralela, del isopentenilpirofosfato (IPP) y su isómero el Dimetilalilpirofosfato (DMAPP), generando un nuevo pirofosfato alílico de conformación E o Z y liberación de pirofosfato. Otra reacción importante de prenilación es la condensación reductiva 1-1 en que dos moléculas de farnesilpirofosfato o geranylgeranylpirofosfato se unen para dar a través de un intermediario ciclopropil carbinilo productos como escualeno y fitoeno. Finalmente están las reacciones de transferencia de la parte orgánica de un pirofosfato alílico a un aceptor no terpénico, como sucede en la síntesis de ubiquinona y ciertos alcaloides.

Nuestro interés se ha centrado primordialmente en la biosíntesis de mono y sesquiterpenos catalizada por sistemas enzimáticos de *Pinus* y *Citrus*. En el proceso de alargamiento de la cadena isoprénica hemos identificado a los 2 isómeros de C₁₀ Nerilpirofosfato (NPP) y Geranylpirofosfato (GPP) y 2 isómeros de C₁₅ el 2E-farnesilpirofosfato (FPP) y el 2Z-farnesilpirofosfato. Se estableció que independientemente de la conformación del doble enlace, se elimina estereoselectivamente el protón 2-pro R del IPP. Es la configuración del sitio activo de la enzima y no el proceso químico de salida de protones la que determina la estructura final del

compuesto. Los diferentes isómeros son sintetizados independientemente y no provienen de un proceso de isomerización E-Z. Hemos encontrado además un sistema de isomerización —redox dependiente de NAD que daría cuenta de la isomerización E-Z de alcoholes, y que tiene a los aldehídos como intermediarios. Este sistema redox no es responsable de la formación de los diastéromeros E y Z de los pirofosfatos alílicos. Suponemos la existencia de prenil transferasas diferentes para la biosíntesis de los distintos conformeros. Es posible obtener preparados enzimáticos que tienen sólo la actividad formadora de productos E, en el curso de la purificación de las prenilsintetasas de naranja el cociente de producto Z/E aumenta y en experimentos de desnaturación térmica se pierde completamente la actividad Z protegiéndose la E con GPP-Mg. Ogura y Popjak han demostrado que las prenilsintetasas requieren absolutamente del pirofosfato en la molécula, y que deben tener estructura alílica aunque el largo de la cadena hidrofóbica no es crucial.

La prenilsintetasa de *Citrus* y *Pinus* reconoce la geometría del doble enlace tanto en el sustrato como del producto. Requieren absolutamente de metal divalente para la catálisis. Poulter y Rilling han demostrado que el mecanismo de condensación 1-4 es un mecanismo de SN_1 (ionización-condensación-eliminación). El carbocatión resultante se estabiliza por la salida de protón, pero se ha puntualizado aquí que si bien ésta es estereoselectiva no hay mecanismo químico que predetermine la conformación del doble enlace del producto.

Las prenilsintetasas a que nos hemos referido catalizan la transferencia 1-4 de un pirofosfato alílico de 5 ó 10 C a IPP. Sin embargo bajo circunstancias en que el aceptor IPP se encuentra ausente del sitio activo de la enzima la prenilsintetasa de ave es capaz de transferir el pirofosfato alílico a otro nucleófilo: el H_2O , provocando así la hidrólisis del sustrato.

Poco se conoce desde el punto de vista mecánico las reacciones de prenilación de moléculas no terpénicas. La DMAPP-triptófano transferasa cataliza la transferencia de DMAPP a su aceptor triptófano en el C_4 , formando un compuesto intermediario de la biosíntesis de alcaloides clavínicos. Esta enzima es específica tanto para el sustrato alílico de 5 C (DMAPP) como para su aceptor. Es posible visualizar todas

las reacciones de prenilación como reacciones mecanísticamente similares que involucrarían la ionización del sustrato alílico con generación de un carbocatión y eliminación de Pirofosfato, el que luego sufre un ataque nucleofílico ya sea por el doble enlace en C_4 del IPP o en circunstancias particulares por H_2O , o por un C de mayor nucleofilia de un anillo aromático lo que no ocurre en el ejemplo citado por lo que plantea nuevamente problemas tanto estéricos, como mecanísticos.

Los compuestos de 10 C se ciclan con eliminación de pirofosfato y adición intramolecular de un doble enlace generando hidrocarburos terpénicos monocíclicos y bicíclicos como el limoneno y los α o β pineno, en una reacción que podría considerarse como una "prenilación intramolecular".

Las carbociclasas de *Pinus* son estereoselectivas para el sustrato Z (NPP) en cambio las de limón forman los hidrocarburos a partir de ambos diastéromeros NPP y GPP lo que plantea un problema estérico en la ciclación del compuesto E. Se ha descartado una isomerización E-Z del sustrato. Se puede pensar en una ionización con eliminación de Pirofosfato, generando un carbocatión alílico. Este, estabilizado por la enzima, rota y adquiere la conformación *syn* necesaria para la ciclación en la cual el producto final es determinado por la salida estereoselectiva de determinados protones por la enzima. Las carbociclasas son estereoselectivas tanto para el sustrato, como para los productos. Esto se ha comprobado indirectamente puesto que hay preparados que pierden la capacidad de utilizar NPP como sustrato. Además las relaciones de los hidrocarburos formados cambia tanto en el curso de la purificación, como frente a distintos metales divalentes.

El requerimiento absoluto de una concentración bastante elevada de metal divalente por ambos tipos de enzima, la prenilsintetasa y la carbociclasa, sugiere un papel fundamental de éste en el proceso catalítico. Se ha determinado que la condensación ocurre por un mecanismo de carbocatión en que el metal ayuda a la eliminación del pirofosfato. Es posible postular un rol análogo del metal en la reacción de ciclación, lo que se ha explorado en un estudio de solvólisis no enzimática de pirofosfatos alílicos catalizada por metal divalente. Se observa que se forman productos cíclicos a partir del conformero E (GPP) y

que además se obtienen hidrocarburos cíclicos como es el limoneno. La especificidad de metal de esta reacción no enzimática tiene un estrecho paralelo en la reacción enzimática lo que no sólo confirma el papel del metal sino que corrobora la validez del modelo.

Finalmente se podría visualizar que el alargamiento de cadena por las prenilsintetasas y la ciclación por carbociclasas son procesos mecanísticamente similares. En ambos casos ocurre una ionización del sustrato alílico ayudado probablemente por metal. Se forma un carbocatión intermediario que por ataque intermolecular de un nucleófilo alarga la cadena o lo transfiere a otra molécula, o intramolecular de doble enlace para ciclar.

(Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el Servicio de Desarrollo Científico, Creación Artística y Cooperación Internacional de la Universidad de Chile (B-005-781) por PNUD-UNESCO (79-19), por National Science Foundation-CONICYT y por la Fundación Henrique Otero Vizcarro. El señor Gonzalo Pérez ha donado gentilmente frutos de Citrus de árboles seleccionados de "Huertos de Betania", Malla-rauco Chile).

INTERMEDIARIOS POLIPRENOLICOS EN LA SINTESIS DE GLICANOS Y DE GLICOPROTEINAS (Polyprenolic intermediates in glycan and glycoprotein synthesis).

M. DANKERT, R. GARCÍA, R. COUSO, L. IELPI, N. ISÓN DE IANNINO (Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campo-mar y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNBA, Buenos Aires, Argentina).

La función que los poliisoprenol-fosfato-azúcares desempeñan en la síntesis de polisacáridos, en procariotes, y de glicoproteínas, en eucariotes, ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años.

En nuestro laboratorio se ha investigado principalmente la participación de estos compuestos en la síntesis de polisacáridos en *Acetobacter xylinum*, una bacteria gram negativa que se caracteriza por producir celulosa. La biosíntesis de este polisacárido a partir de UDP-glucosa fue descrita hace varios años por Glaser.

Utilizando este nucleótido-azúcar radiactivo se observó, en nuestro laboratorio, que preparados enzimáticos de esta bacteria permitían obtener, además de celulosa, un glucano y tres

prenilfosfo-azúcares. De estos últimos, uno fue caracterizado como prenol-difosfato- α -glucosa, y parece participar en la biosíntesis del glucano. Otro se identificó como prenol monofosfato- β -galactosa, y el tercero como prenol-difosfato- α -celobiosa. Si bien hasta el momento no se ha podido demostrar la participación de este último en la síntesis de celulosa, ha resultado capaz de aceptar, in vitro, la adición secuencial de manosa, ácido glucurónico, dos glucosas y ramnosa, para formar un prenol-difosfato-heptasacárido. Los dadores de azúcares son, respectivamente, GDP-manosa, UDP-glucurónico, UDP-glucosa y dTDP-ramnosa, y al lípido-oligosacárido formado se le ha asignado la siguiente estructura:

ramnosa-glucosa- β -1,6-glucosa-glucurónico- β -1,6-manosa- β -1,3-glucosa- β -1,4-glucosa-PP-prenol

Se pudo demostrar también que *A. xylinum* sintetiza otros polisacáridos y uno de ellos, al que se denominó polisacárido γ , produce por hidrólisis: glucosa, manosa, ramnosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. Se piensa que el prenol-difosfato-heptasacárido mencionado es un precursor de este polisacárido γ .

Por otra parte, en la síntesis de glicoproteínas en eucariotes, se ha descrito la participación de prenol fosfo-azúcares derivados de glucosa, manosa y N-acetil glucosamina. Estos lípido-azúcares, juntamente con GDP-manosa y UDP-Acetil-glucosamina, dan lugar a la formación de un derivado con la estructura: dolicol-difosfato - (N - acetil - glucosamina)₂ - (manosa)₃ - glucosa (Dol-PP-oligosacárido-glucosa). Una vez incorporada la glucosa el resto carbohidrato es transferido a un grupo asparagina del péptido naciente que dará lugar a la glicoproteína. El oligosacárido ya ligado a la proteína, sufre un procesamiento durante el cual pierde algunos azúcares (glucosa-manosa) pero puede luego recibir otros (N-acetil glucosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico), directamente donados por los nucleótidos respectivos sin mediación de prenol-fosfatos.

Los preparados de *A. xylinum* ofrecieron la posibilidad de obtener un prenol-fosfato-galactosa e investigar si participaban en alguna de las etapas mencionadas. Se encontró, utilizando enzimas de hígado, cerebro y páncreas de rata, que se transfería galactosa a un compuesto con las propiedades de un Dol-PP-oligosacárido-galactosa. Resultados preliminares parecen in-

dicar que también hay transferencia de Dol-PP-oligosacárido-galactosa a proteínas. Se piensa que, tal vez la transferencia de galactosa además de, o en lugar de, glucosa podría indicar una vía alternativa en el procesamiento arriba mencionado.

ORGANIZACION DEL SISTEMA DE OXIDACION DE ACIDOS GRASOS EN PEROXISOMAS. PROPOSICION DE UN MODELO. (Organization of the Fatty Oxidation System in Peroxisomes. Proposal of a Model).

FEDERICO LEIGHTON, MIGUEL BRONFMAN y NIBALDO C. INESTROSA. Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

En peroxisomas de hígado de rata se ha detectado el complemento enzimático necesario para realizar β -oxidación de ácidos grasos en un proceso insensible a cianuro. La primera enzima de la secuencia ha sido caracterizada en nuestro laboratorio, tanto para hígado de rata como para hígado humano (Biochem. Biophys. Res. Commun. 88: 1030-1036 (1979); Biochem. J. 182: 779-788 (1979); Life Sciences 25: 1127-1136 (1979)). Esta enzima, ácido graso-CoA oxidasa (OAG), es específica para peroxisomas y aparece como etapa limitante de la reacción. Es específica para ácidos grasos saturados de cadena larga C_{12} - C_{18} y muy poco activa para C_6 - C_8 . La OAG es una flavoproteína con FAD unido no covalentemente y con muy baja afinidad, lo que sugiere un posible rol regulador.

La detección específica en peroxisomas, junto con la OAG, de crotonasa, β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y tiolasa, indica que el sistema peroxisomal debería producir ácidos grasos de cadena mediana (C_6 - C_8), acetyl-CoA y NADH como resultado de la oxidación de un ácido de cadena larga. La detección de carnitina-acetil transferasa y de carnitina-octanoil transferasa en peroxisomas sugiere que estas enzimas serían

responsables de la translocación de residuos C_2 y C_6 - C_8 . Dado que las transferasas se comportan como enzimas solubles —de la matriz peroxisomal— su rol sería la obtención de un residuo capaz de atravesar la membrana peroxisomal sugiriendo a la vez la existencia de un pool intraperoxisomal de HS-CoA potencialmente regulador del sistema. La actividad de palmitoil-carnitina transferasa, en contraste, es muy baja sugiriendo que los ácidos grasos de cadena larga podrían cruzar la membrana peroxisomal por difusión; este mecanismo sugiere un rol regulador fundamental para la proteína citosólica que transporta ácidos grasos con mayor afinidad por los CoA-derivados. El mecanismo postulado requeriría de la activación peroxisomal de los ácidos grasos; de hecho, hemos detectado también actividad tioquinasa peroxisomal, planteándose la necesidad de una fuente de ATP.

El NADH resultante de la β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa peroxisomal podría ser reoxidado en el organelo o difundir al citoplasma. En peroxisomas existen mecanismos que permitirían su reoxidación *in situ*: Se ha detectado láctico deshidrogenasa peroxisomal, además de la L- α -hidroxiácido oxidasa (HAO) peroxisomal que es activa sobre lactato. Podría así reoxidarse NADH mediante reducción de piruvato, al que la membrana peroxisomal es permeable, y el lactato resultante sea difundir al citoplasma o alternativamente, ser oxidado fútilmente por la HAO. La presencia en la membrana peroxisomal de citocromo b_5 y NADH citocromo b_5 reductasa, detectada en otros laboratorios, ha sido considerada como la base de un sistema translocador de equivalentes reducidos; sin embargo su localización en la cara externa de la membrana plantea un problema topológico.

Finalmente, resta considerar el destino del acetato producido en peroxisomas que sería liberado al citosol como acetyl-carnitina. En la actualidad, estamos evaluando su posible rol cetogénico. (Financiado por proyecto DIUC 50/79).

COLOQUIO:

Receptores hormonales. Mecanismos moleculares de acción

RECEPTORES PARA SOMATOTROFINAS EN HIGADO DE RATA (Somatotrophin receptors in rat liver)

JUAN M. DELLACHA, A.C. PALADINI y J.A. SANTOMÉ (Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires y Centro para el Estudio de las Hormonas Hipofisarias, Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina)

Los estudios de distribución *in vivo* de somatotrofinas marcados con radiactivos demuestran que el hígado es uno de los órganos que capta la hormona. Esta unión presenta alta afinidad, es específica y el proceso es saturable.

Estudios de competición *in vivo* señalan que en el hígado de animales normales las somatotrofinas bovina, equina y humana compiten con la hormona de origen bovino marcada con ^{125}I ; no así con la prolactina ovina. Cuando se utiliza somatotrofina humana marcada con ^{125}I , la prolactina y la somatotrofina bovina compiten por los sitios de unión de la hormona humana. Estos hechos sugieren la presencia en el hígado de por lo menos dos tipos de receptores distintos: uno de crecimiento o somatogénico y otro lactogénico. Cuando las experiencias se realizan con animales hipofisoprivos sólo se detectan receptores de crecimiento.

Para caracterizar estos últimos, se trabajó con hepatocitos provenientes de ratas hipofisoprivas. Se demostró la presencia de dos grupos de receptores somatogénicos. Uno de ellos, en número próximo a los 10.000 por célula, presenta una constante aparente de disociación de $4.2 \times 10^{-8}\text{M}$; el otro grupo cuenta con 6000 receptores por célula, con un valor para su constante de $1.7 \times 10^{-7}\text{M}$.

En lo que respecta al receptor lactogénico cabe mencionar que ha sido posible solubilizar, a partir de microsomas de hígado de rata hembra, una fracción proteica que presenta la particularidad de interaccionar específicamente con somatotrofina humana marcada con ^{125}I . La constante de disociación del complejo hor-

mona-receptor soluble es de $8 \times 10^{-10}\text{M}$; valor muy similar al informado por otros autores para el receptor particulado.

RECEPTORES HORMONALES EN REPTILES (Hormonal receptors in reptiles).

MARÍA MARQUES, ROSELIS S.M. DA SILVA, DANIEL TURYN y JUAN M. DELLACHA (Departamento de Fisiología, Farmacología e Biofísica, Instituto de Biociencias, Universidad Federal do Rio Grande do Sul, 90.000 Porto Alegre, Brasil, y Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, y Centro para el Estudio de las Hormonas Hipofisarias, Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina).

Muchas evidencias experimentales indican que la primera etapa de la acción hormonal es la ligación de la hormona a sitios específicos de las membranas de las células "blanco". Estos estudios han sido realizados principalmente en mamíferos, *in vivo* e *in vitro*, pero muy pocos datos existen con relación a otros vertebrados. Así, hemos decidido extender a un reptil, la tortuga, los estudios sobre distribución y ligación *in vivo* realizados previamente en ratas (Retegui-Sardou *et al.*, 1977; Turyn y Dellacha, 1978) para verificar la presencia de receptores a las hormonas de crecimiento de mamíferos. La tortuga, que es un animal heterotérmico, constituye un modelo biológico adecuado para estudiar la influencia de la temperatura sobre la ligación de la hormona *in vivo*. Ha sido ya demostrado que temperaturas elevadas reducen el tiempo de ligación *in vitro*.

Hormonas de crecimiento bovina (bGH) y humana (hGH) marcadas con ^{125}I fueron inyectadas en la tortuga *Chrysemys d'orbigni* para estudiar su distribución en los tejidos. La radiactividad fue básicamente concentrada por el hígado y el riñón, con un máximo de captación

a las 4 horas de la inyección de la hormona marcada. Cuando la hormona de crecimiento fue inyectada juntamente con un exceso de la hormona no marcada, solamente el hígado mostró una reducción significativa de la captación de la radiactividad. Esta reducción fue dependiente de la dosis. La inyección de $[I^{125}]$ iodo-hGH produjo mayor captación de la radiactividad por el hígado que la inyección de $[I^{125}]$ iodo-bGH. Estos resultados sugieren: 1) captación específica de hGH o de bGH por el hígado, y 2) la presencia en el hígado de sitios de ligación con características de sitios lactogénicos y somatogénicos.

Experimentos similares fueron realizados simultáneamente en tortugas mantenidas a 30°, 23° ó 14°C de temperatura ambiente. La temperatura corporal (medida en la cloaca) se mantenía cercana a la del ambiente. La máxima captación de la radiactividad por el hígado fue alcanzada 2, 4 y 8 horas después de la inyección del $[I^{125}]$ iodo-hGH en tortugas a 30°, 23° y 14°C, respectivamente.

RECEPTORES DE ESTRADIOL: REGULACION DE SUS NIVELES EN UTERO DE RATA (Estradiol receptors: Regulation of its levels in rat uterus).

WALTER SIERRALTA (Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Chile, Santiago).

Al analizar las concentraciones de receptores de estradiol en útero de rata tras la administración de estradiol, se evidencian cambios dramáticos en la distribución intracelular de ellos. Estas modificaciones son consecuencia principalmente

de la traslocación de citoplasma a núcleo y de posterior síntesis de novo de los receptores. Las fases de depleción inicial y de la consiguiente reposición han sido analizadas con bastante énfasis por diversos grupos, disponiéndose de abundante información experimental al respecto.

Cuando se ha analizado la vida media de los receptores citosólicos para estradiol en útero de ratas ovariectomizadas o inmaduras, se ha detectado que ella es una magnitud superior a los cinco días. En cambio en animales normales y durante el ciclo estral de cuatro días, hay cambios dramáticos de hasta 300% en los niveles de receptores citoplasmáticos y/o totales, lo cual implica seguramente un cambio en la vida media de dichos receptores como consecuencia del ambiente hormonal normal en el animal. Estas modificaciones en la vida media de los receptores de estradiol durante el ciclo estral podrían estar relacionados con las variaciones en la distribución de los receptores dentro de las células uterinas tras la administración de estradiol.

Actualmente disponemos de resultados experimentales que indican una activa participación de estradiol y de progesterona en la regulación de los niveles de receptores de estradiol en útero de rata. Dichas hormonas esteroidales actuarían tanto sobre los procesos de reposición de receptores como a nivel de la inactivación de los mismos. Se discute la posible participación en estos procesos de algunos organelos celulares y se plantea un modelo que intenta explicar la(s) relación(es) entre dichos organelos, los receptores y las hormonas esteroidales en los animales sometidos a las condiciones experimentales empleadas.

(Financiado en parte por PLAMIRH (Proyecto 129-228-278) y por Servicio de Desarrollo Científico, de Creación Artística y Cooperación Internacional (B 309-792), Universidad de Chile).

COLOQUIO:

Bioquímica de la neurotransmisión central

ACOPLAMIENTO ENTRE DEPOLARIZACIÓN NEURONAL Y SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (Coupling between neuronal depolarization and catecholamine synthesis in the central nervous system).

GONZALO BUSTOS (Laboratorio de Farmacología Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile).

Hallazgos recientes han demostrado la existencia, en terminales nerviosos catecolaminérgicos, de mecanismos muy finos que regulan la síntesis del transmisor, permitiendo así una concentración constante del mismo en el terminal cualquiera sea el tráfico de impulsos en la neurona. La anterior regulación se ejerce a través de una activación de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que aumentos de la frecuencia de impulsos en neuronas catecolaminérgicas producen cambios alostéricos en la enzima TH, lo que se traduce finalmente en un aumento en la síntesis de neurotransmisor en el terminal nervioso. Se ha postulado que el aumento de AMPc, que se produce durante la depolarización del terminal, es un paso necesario y previo para la activación de la TH, y para el aumento de síntesis del transmisor monoaminérgico. Apoyando esto último hay hallazgos que indican que la incubación de preparaciones solubles de TH estriatal e hipocámpica en presencia de ATP, Mg^{2+} y AMPc producen cambios cinéticos en la TH similares a los que se producen luego de la depolarización neuronal. Sin embargo, existe evidencia experimental que no apoya este modelo en forma concluyente. Drogas como el haloperidol o la reserpina producen *in vivo* una activación de la TH sin producir cambios en los niveles de AMPc. Por otra parte, el agregado de Mg^{2+} , ATP y AMPc, a TH activada previamente, por condiciones óptimas de depolarización con K^+ resulta en una activación aún mayor de la enzima. Tales observaciones argumentan en contra de la conclusión de que la depolarización neuronal

produce una activación de la TH primariamente a través de una fosforilación dependiente de AMPc. En el último tiempo han aparecido evidencias que argumentan en favor de un rol primario para el ion Ca^{2+} en la activación de la TH inducida por depolarización. El agregado de Ca^{2+} activa TH soluble en una forma similar a la que resulta luego de la depolarización. Por otra parte, en cortes cerebrales manipulados experimentalmente para producir un aumento del Ca^{2+} intraneuronal, también se produce una activación cinética de la TH. Los anteriores efectos no aparecen estar mediados por AMPc o por una fosforilación dependiente de AMPc. Sin embargo, no se puede descartar que durante la depolarización, el AMPc y el Ca^{2+} actúen paralela e independientemente para activar la TH o que el AMPc actúe a través de desplazamientos de Ca^{+2} desde compartimientos intraneuronales.

EFEITOS DE TOXINAS SOBRE A LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISORES

(Effects of toxins on neurotransmitters release).

C.R. DINIZ (Departamento de Bioquímica e Imunología, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil).

Informação sobre as propriedades dos componentes macromoleculares envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores é ainda relativamente escassa. A verificação de que uma proteína tóxica obtida do veneno da serpente asiática *Bungarus multinctus*, α bungarotoxina, é útil como "probe" para o receptor nicotínico da acetilcolina permitiu considerável avanço no conhecimento sobre localização, propriedades ultraestruturais e quantificação deste receptor de músculo e de outros tecidos excitáveis. De outro lado, certo número de neurotoxinas que interferem especificamente com processo de liberação de mediadores químicos tem sido identificadas. Elas po-

derão igualmente se tornarem úteis para o estudo de neurotransmissão. Certas toxinas do veneno de escorpiões causam despolarização de membranas e indiretamente aumentam a liberação de neurotransmissores. β bungarotoxina, taipotoxina, notexina e crotoxina isoladas de venenos de serpentes parecem atuar em sinapses colinérgicas. Toxinas de venenos de aranhas afetam diversas sinapses equanto a toxina botulínica bloqueia especificamente a liberação de acetilcolina.

O conhecimento preciso da especificidade e do sítio de ação destas toxinas em relação às diferentes sinapses não está ainda estabelecido. Mesmo assim elas poderão ser úteis ao estudo de aspectos particulares da atividade do sistema nervoso central.

NATURALEZA Y MECANISMOS DE SECRECIÓN DE NEUROTRANSMISORES CENTRALES. (Nature and release mechanisms of central transmitters).

F. ORREGO (Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

Se analizará en qué medida los neurotransmisores centrales, reales o supuestos, como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, sustancia P, somatostatina, VIP, neurotensina, endorfinas, GABA, glutamato y otros, cumplen con los criterios primarios y secundarios propuestos para aceptar una función neurotransmisora real (*Neuroscience* 4, 1037-1057, 1979).

Se analizarán los mecanismos de liberación de noradrenalina en sinapsis centrales, y su dependencia de los parámetros de estimulación y del calcio extracelular, y de qué modo este paradigma es aplicable a la liberación de otras aminas centrales. Se analizarán los mecanismos de liberación de sustancias no transmisoras presentes en el citoplasma soluble de las neuronas y en células gliales.

COLOQUIO:

Transducción de energía y fotofosforilación en cloroplastos

THE ROLES OF A MEMBRANE POTENTIAL AND A PROTON CONCENTRATION GRADIENT AS DRIVING FORCES FOR ATP FORMATION IN CHLOROPLASTS

MORDHAY AVRON (Biochemistry Department, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel).

It can be said to be well established today that the major observable intermediary energy storage device in the steady state in chloroplasts, is the transmembrane proton concentration gradient. This conclusion is supported by a large variety of experimental observations such as: 1. Measured transmembrane electrical potential gradients are energetically insignificant. 2. The rate of ATP formation is a function (albeit a non-linear function) of the magnitude of the transmembrane ΔpH in both continuous and post illumination ATP formation. 3. In post-illumination ATP formation the amount of ATP formed at constant ΔpH is a function of the buffer capacity, and can be markedly increased by introducing appropriate buffers. 4. The amount of ATP formed in the dark on Acid-Base-Transition is a function of both ΔpH and the buffer capacity of the chloroplasts. 5. ATP induced reverse electron flow is dependent upon the intermediate creation of a transmembrane pH gradient.

However, It was shown that under appropriate experimental conditions steady state ATP formation can be driven also by an artificially imposed transmembrane electrical gradient. Such conditions were realized, for example, when an artificial transmembrane electrical gradient —was superimposed on a suboptimal pH gradient.

Recently evidence has been accumulating indicating that this conclusion is insufficient to explain the mechanism of ATP formation during the first few seconds following a dark-light

transition. Experiments will be presented which support the suggestion that during this period the transmembrane electrical gradient provides a major part of the energy needed to drive ATP formation. The evidence includes: 1. Rapid kinetics of ATP formation following a dark-light transition indicate that early ATP synthesis is insensitive to nigericin but sensitive to valinomycin. The opposite is true for steady state phosphorylation. 2. ATP induced reverse-electron-flow-luminescence is relatively insensitive to either nigericin or valinomycin but sensitive to the combination of both. 3. Artificially induced transmembrane electrical gradients increase or decrease the ΔpH induced reverse-electron-flow-luminescence, depending on the polarity of the imposed gradient.

These observations lead to the hypothesis that following a dark-light transition, large transmembrane electrical gradients are rapidly formed which are slowly replaced by energetically equivalent transmembrane proton concentration gradients. Either or both can be used as the driving force for ATP formation.

UNCOUPLING AND ENERGY TRANSFER INHIBITION OF PHOTOPHOSPHORYLATION BY MALEIMIDES

RICHARD E. MCCARTY and JAMES V. MORONEY (Section of Biochemistry, Cornell University, Ithaca, N.Y. 14850 USA).

Illumination of chloroplast thylakoids in the presence of either mono-¹ or bi-functional² maleimides causes a partial inhibition of photophosphorylation and a modification of a group within the γ subunit of coupling factor 1 (CF₁)³. Bifunctional maleimides are much more effective inhibitors than monofunctional ones. Moreover, phosphorylation is largely uncoupled in thylakoids illuminated in the pre-

sence of a bifunctional maleimide and the proton permeability of the membrane is enhanced. In contrast, monofunctional maleimides are energy transfer inhibitors.

Bifunctional maleimides appear to cross-link two groups within the γ subunit of CF_1 . To test whether this cross-linking is the cause of the enhanced proton permeability of thylakoids treated in the light with bifunctional maleimides, a bifunctional maleimide with a cleavable bridge was synthesized. This compound, dithiobisethylmaleimide (DTEM) inhibits phosphorylation and proton uptake like other bifunctional maleimides. However, low proton permeability is restored to DTEM- and light-treated thylakoids by incubation with either β -mercaptoethanol or dithiothreitol (10-50 mM). The disulfide bond of the DTEM is cleaved under these conditions. Thus, cross-linking within the γ subunit of CF_1 makes thylakoids leaky to protons. This finding suggests a role for the γ component in the proton translocating function of the ATPase complex.

¹McCarty, R.E., Pittman, P.R. and Tsuchiya, Y. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3048.

²Weiss, M.A. and McCarty, R.E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8007.

³McCarty, R.E. and Fagan, J. (1973) Biochemistry 12, 1503.

MODIFICACION QUIMICA DE ENZIMAS FOTOSINTETICAS UNIDAS A LA MEMBRANA TILACOIDE

R.H., VALLEJOS. Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

La fijación fotosintética de CO_2 requiere ATP y NADPH que son generados en cloroplastos

por el complejo ATPásico (CF_0 - CF_1) y por la ferredoxina (F_d)-NADP reductasa. La síntesis de ATP es inhibida en cloroplastos iluminados en presencia de *o*-iodosobenzoato. El efecto se debe a la formación de dos nuevos puentes disulfuro en CF_1 : uno en la subunidad β y otro en la γ . CF_1 tiene 8 tioles libres distribuidos 4:2:0:0:2 en las subunidades α , β , γ , δ , y ϵ , respectivamente. Después de la activación térmica se produce un intercambio de disulfuros entre las subunidades α y γ quedando la distribución en 2:2:2:0:2. Presumiblemente un intercambio similar ocurre *in vivo* cuando la enzima es activada por luz.

CF_1 al igual que otras H^+ -ATPasas (RF_1 , TF_1 y F_1) tiene una arginina y un carboxilo esenciales en el sitio catalítico. La modificación de ellos es prevenida por adeninnucleótidos y la modificación de la arginina es más rápida en la luz.

La actividad de diaforasa de la Fd-NADP reductasa unida a membrana es insensible al cloruro de dansilo mientras que la fotorreducción del NADP es inhibida igual que por fenilgloxal, un reactivo de arginina. La velocidad de modificación es mucho mayor en luz con ambos reactivos y este efecto es prevenido por desacoplantes. La inhibición de la fotorreducción de NADP por fenilgloxal fue protegida por NADP más en la luz que en la oscuridad. El K_d aparente para esta protección varió de 0,1 a 0,9 mM, respectivamente, lo que sugiere que la energización de la enzima por luz aumenta la afinidad por NADP. Ferredoxina protege completamente a la enzima contra el cloruro de dansilo. Este efecto es revertido por DTE lo que sugiere que hay un tiol expuesto en el sitio de unión de la ferredoxina.

Los resultados presentados sugieren que los modificadores químicos pueden servir para detectar cambios conformacionales inducidos por energización en enzimas unidas a membranas.

COLOQUIO:

Estructura de genes y replicación de DNA

STRUCTURE OF MAMMALIAN INSULIN GENES. (Estructura de genes insulina de mamíferos).

BELL, G.I., PICTET, R., CORDELL, B., GOODMAN, H.M., RUTTER, W.J. Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143, USA.

A double-stranded cDNA prepared from mRNA encoding human preproinsulin has been cloned in bacteria and its sequence determined and compared with that of rat insulin mRNA. This sequence comparison between human and rat insulins at the nucleotide level confirmed the high degree of sequence homology in the regions DNA encoding the B and A chains of the insulin molecule. Furthermore, it also revealed a region of extensive homology in the 5'-end of the prepeptide portion of the molecule and near the polyA addition site.

This human insulin cDNA has been used as a probe to isolate a genomic DNA fragment containing insulin gene sequences. The structure of this cloned molecule is being determined in order to assess the role of gene organization in regulation of insulin expression.

PROTEINAS QUE PARTICIPAN EN LA REPLICACION DEL DNA DE ESCHERICHIA COLI (Proteins involved in DNA replication in *Escherichia coli*).

JOSÉ RAFAEL VICUÑA (Laboratorio de Bioquímica, Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile).

Los estudios de replicación del DNA en *Escherichia coli* se han visto facilitados con la identificación genética de algunas funciones esenciales para este proceso. Estas han sido definidas mediante el aislamiento de mutantes termosensibles en replicación, las que a temperatura no permisiva pueden bloquear, ya sea la iniciación, o bien el alargamiento de cadenas de DNA. Entre las primeras se encuentran las mutantes dnaA, dnaB, dnaC(D), dnaI y dnaP, además de la RNA polimerasa. Los mutantes de elongación, es decir, aquellos que detienen de inmediato la síntesis de DNA cuando se hace un cambio a temperatura no permisiva, incluyen dnaB, dnaC(D), dnaE, dnaG, dnaZ, ligasa y PolAex (exonucleasa 5'-3'). Estudios con ácido nalidixico y novobiocina, inhibidores de la DNA girasa, han también involucrado a esta enzima en la elongación del DNA.

Para estudiar replicación *in vitro*, se han desarrollado modelos que utilizan el pequeño cromosoma de algunos fagos cuyo DNA es circular y de una sola hebra, entre ellos fd, $\alpha 3$, y $\phi X 174$. El modelo resulta apropiado ya que prácticamente todas las proteínas usadas para la multiplicación de estos fagos están codificadas por el huésped.

Además de los productos de los genes mencionados anteriormente, experimentos *in vitro* han evidenciado el requerimiento de otras proteínas para las cuales no existe todavía identificación genética. Entre ellas se encuentran los factores de discriminación α y β , RNasa H, factores de replicación X, Y y Z, factores de elongación I y III y proteína ligante de DNA. (Para esta última se acaba de descubrir una mutante).

Reacciones de reconstitución con estas proteínas purificadas demuestran que la replicación de DNA requiere previamente de la síntesis de un oligonucleótido partidor (primer). Con el DNA del fago fd, esta reacción la lleva a cabo la RNA polimerasa en presencia de proteína ligante de DNA, los factores de discriminación α y β , y RNasa H. Con DNA del fago $\alpha 3$, el partidor es sintetizado por la proteína dnaG en presencia de proteína ligante de DNA. Con $\phi X 174$, además de dnaG y proteína ligante de DNA, se necesitan los productos de dnaB, dnaC (D) y los factores de replicación X, Y y Z.

Aunque existen múltiples mecanismos de iniciación, se usa un solo sistema para alargar la cadena de DNA. Este incluye la DNA polimerasa III (dnaE), dnaZ y los factores de elongación I y III.

Se discutirán las interacciones de estas proteínas entre sí, con el DNA y con los nucleótidos.

USE OF MAMMALIAN SOMATIC MUTANT IN STUDIES OF HORMONAL CONTROL OF DNA SYNTHESIS INITIATION AN CELL PROLIFERATION

HUGO A. ARMELIN & MARI C.S. ARMELIN.
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 20780. São Paulo, Brasil.

Resting (G_0 OR G_1) fibroblasts are stimulated to enter DNA synthesis by novel growth factors and classical hormones (Armelin, H.A. (1973) PNAS 70, 2702). Studies on the mechanisms of action of these factors would be facilitated by the availability of growth regulatory mutants. Recently we isolated (Armelin, M.C.S. & Armelin, H.A. (1977) Nature 265, 148) from Swiss 3T3 fibroblasts, the mutant ST1 which qualifies as a useful growth regulatory mutant.

ST1 cells are transformed fibroblasts which generate malignant invasive fibrosarcoma in nude mice. The steroid hormone hydrocortisone

induces reversible transition of these cells to a "normal" phenotype (Armelin, M.C.S. & Armelin, H.A. (1978) PNAS 75, 2805). The hormone acts at physiological concentrations and affects cell cycle traversing exclusively at the G_1 phase.

The possibility was raised that hydrocortisone changes the control of DNA synthesis initiation in ST1 cells by provoking alterations at the level of membrane, cell surface and cytoskeleton (Armelin, H.A. et al. (1979) CSH Conferences on Cell Proliferation vol. 6).

A striking alteration was observed on cell surface composition: fibronectin (LETS protein) which appears as a meshwork of fibers in the parental "normal" 3T3 line, is absent in ST1 cells. Under the action of hydrocortisone, however, fibronectin appears as fluorescent fibers distributed throughout the surface of ST1 cells. No major change was detected in the cytoskeleton: contrary to the parental line, no actin cables were found in ST1 cells, irrespective of the presence or absence of the hormone; the same being true for intermediate (100 Å) filaments. Minor alterations on microtubules arrangement were found, but their significance is still unclear. The available data indicate that hydrocortisone action on ST1 cells is restricted to a limited number of target sites. Attempts to identify the hormone's primary target sites in this system, could lead to a better understanding of the role cell surface and cytoskeleton components play in the control of cell proliferation. (Supported by FAPESP).

COLOQUIO:

Enseñanza de Postgrado en Bioquímica

ACTIVIDADES DE POSTGRADO EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR EN CHILE*

(Postgraduate Studies in Biochemistry and Molecular Biology in Chile).

JORGE BABUL**, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Existen las siguientes actividades de postgrado en Bioquímica y Biología Molecular en nuestro país:

Programa de Magister en Ciencias Biológicas con mención en áreas de la Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Programa de Magister en Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas de la Universidad de Chile.

Programa de Magister en Ciencias, mención en Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

Programa de Magister en Ciencias con mención en Bioquímica del Instituto de Ciencias Médico-Biológicas de la Universidad de Concepción.

Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Biología, Programa de Bioquímica, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Programa de Doctorado en Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas de la Universidad de Chile.

*La información que aquí aparece está basada en los documentos entregados por cada programa al Presidente del Comité Nacional del Programa Regional de Entrenamiento de Postgrado en Ciencias Biológicas Básicas, PNUD/UNESCO, RLA 78-024.

**Presidente del Comité de Estudio sobre Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular, Programa Regional de Entrenamiento de Postgrado en Ciencias Biológicas Básicas, PNUD/UNESCO, RLA 78-024 y Secretario del Comité de Bioquímica, Programa de Bioquímica, Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias y Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

I. PROGRAMAS DE MAGISTER

Objetivos

En general, el propósito fundamental de todos los Programas de Magister es el de otorgar a graduados y profesionales universitarios la oportunidad de obtener una formación a nivel avanzado en el campo de la Bioquímica y Biología Molecular. Los diferentes programas se diferencian en el nivel que se desea que el candidato logre y no está claro, en los reglamentos de algunos programas, cuál debe ser ese nivel. Así, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas el énfasis es en la "formación académica de alto nivel para un desempeño eficiente y creativo en la docencia universitaria, en la investigación científica y en las actividades prácticas y tecnológicas propias del campo de la Bioquímica". Por otro lado, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile el énfasis es en la formación de especialistas en un área determinada y no en una enseñanza global de la Bioquímica a un nivel inferior al de un Doctorado.

Mención

La mención que ofrecen los programas es en Bioquímica, salvo en el de la Universidad Austral cuya mención es en Biología Molecular y en el de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde se ofrece un Magister con o sin mención dependiendo del plan de estudios que sigue el alumno y las menciones que se otorgan definen el nivel avanzado que el graduado ha obtenido en algún campo especializado específico (cinética enzimática, recambio de enzimas, por ejemplo).

Requisitos de admisión

Todos los programas coinciden en requerir de los postulantes un título profesional o grado

universitario, aprobar un examen de evaluación y el conocimiento de uno o dos idiomas (de preferencia inglés).

Plan de estudios

El plan de estudios de los distintos programas es de muy variada naturaleza. En la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por ejemplo el plan comprende asignaturas, seminarios y trabajo de laboratorio de acuerdo con la preparación previa del alumno, sin limitar las asignaturas a las ofrecidas por la Facultad de Ciencias. Todos los programas consideran planes en los cuales el alumno debe completar un mínimo de créditos; algunos programas contienen actividades de carácter obligatorio entre las cuales figuran asignaturas de carácter general o filosófico.

Tesis

Es la actividad que todos los programas consideran como la más importante y que debe ser una investigación original e individual que esté al nivel de los trabajos publicados en revistas de circulación internacional que disponen de comité editorial. El programa de la Universidad Austral considera que el alumno debe "demostrar en su trabajo de tesis habilidad para trabajar y razonar independientemente en la percepción y solución de un problema científico".

Tiempo empleado

El tiempo empleado en la tesis debe ser, según los distintos programas, de al menos un año. Se estima que el tiempo total de cada programa es de dos o tres años.

Examen de grado o examen final

En todos los programas este examen consiste fundamentalmente en la defensa de la tesis.

Estadísticas

El programa de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile se inició en 1978 y tiene actualmente 7 alumnos; el de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas se inició en 1979 y tiene 5 alumnos; el de la Universidad

Austral se inició en 1978, tiene 7 alumnos y uno graduado y el de la Universidad de Concepción comenzó en 1978 y no tiene alumnos. Esta información se incluye en la Tabla Programas de Postgrado en Bioquímica y Biología Molecular en Chile.

II. PROGRAMAS DE DOCTORADO

A. DOCTORADO EN CIENCIAS, MENCIÓN EN BIOLOGÍA, PROGRAMA DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE CHILE

Consideraciones generales

Desde marzo de 1971 está funcionando el Programa de Bioquímica del Doctorado en Ciencias, mención Biología. Este programa se originó a través de un acuerdo entre las Facultades de Ciencias y de Medicina Norte de la Universidad de Chile. Su creación respondió a la necesidad de elevar el nivel de los profesionales en el área de la Bioquímica, capacitándolos para escoger problemas originales de investigación y diseñar la búsqueda de sus soluciones y a la posibilidad de entregar esta educación de postgrado en el marco de las instituciones del país.

El programa de Bioquímica se ajusta al Reglamento de Doctorado en Ciencias establecido por el Consejo Superior de la Universidad de Chile del 26 de marzo de 1968, Decreto N° 1.943.

Para cumplir con sus objetivos el Comité de Bioquímica del Doctorado en Ciencias cuenta con la colaboración de numerosos investigadores de otros departamentos, tanto de la Universidad de Chile como de diferentes universidades del país. Ellos participan en la enseñanza de cursos, en unidades de investigación y en la dirección de proyectos de tesis de los alumnos de la especialidad. Conscientes de la escasez de recursos humanos para enfrentar solo la tarea de ofrecer un Programa de Doctorado, desde su inicio el Comité de Bioquímica consideró la necesidad de comprometer el esfuerzo de todos los bioquímicos del país con preparación adecuada. Es con este espíritu que en las tareas preliminares de organización realizó una encuesta a los investigadores en Bioquímica y áreas afines consultándolos sobre la conveniencia de poner en marcha un Doctorado en Bioquímica y sobre cuál sería su participación en él.

Requisitos de admisión

El Comité de Bioquímica considera a la Bioquímica como una ciencia multidisciplinaria en cuanto a la naturaleza de sus problemas y a los métodos de estudio. En consecuencia, estima que puede cultivarse con enfoques diversos y por investigadores de preparación básica diferente. Es por ello que tanto las normas que guían a la selección de los postulantes, como la estructuración del plan de estudios de los alumnos admitidos, permiten suficiente flexibilidad como para que personas de formación previa diferente puedan ser orientados a profundizar conocimientos en aquellas áreas de la Bioquímica en las cuales deseen especializarse.

Los requisitos de admisión son: poseer el grado de Licenciado en Ciencias o preparación académica equivalente, evaluada en un examen de admisión calificado por el Comité de Bioquímica. En la práctica, desde 1971, los postulantes aceptados han sido: 33 Bioquímicos, 5 Químicos Farmacéuticos, 5 Licenciados en Biología, 2 Licenciados en Química y 3 Profesores de Biología y Química.

Después del examen de admisión el Comité de Bioquímica recomienda al postulante, según su profesión o grado académico, actividades para completar su formación de modo que realice con éxito su programa de doctorado. Las recomendaciones más comunes han sido: Genética, Bioquímica Avanzada, Fisicoquímica y Química Orgánica. Una vez cumplidos estos requisitos el alumno puede matricularse en el programa.

Características del programa

Desde un comienzo el alumno realiza sus actividades ciñéndose a un plan de estudios individual, propuesto por el Comité de Bioquímica a la Comisión de Postgrado de la Facultad. El plan de estudios comprende principalmente cursos, seminarios, unidades de investigación y trabajo de tesis.

Cursos. El Comité de Bioquímica recomienda a la mayoría de sus alumnos la aprobación de algunos cursos avanzados sobre materias fundamentales de la Bioquímica, como Estructura y Fisicoquímica de Macromoléculas, Enzimología Avanzada, Biología Molecular y Regulación Metabólica. Además puede recomendar un cierto número de cursos especializados en relación al área de tesis de doctorado.

Seminarios. Existen tres tipos de seminarios: bibliográficos, de investigación y de avances de tesis. Cada alumno debe participar durante su residencia, una vez que haya aprobado los cursos fundamentales, en los seminarios bibliográficos que trimestralmente organiza el Comité de Bioquímica.

Unidades de investigación. Estas unidades tienen como objetivo: 1) aprender técnicas habituales de investigación bioquímica y áreas afines y sus fundamentos teóricos, 2) tener contacto con diversos grupos de investigación del país. La unidad de investigación consiste en el trabajo del alumno durante 9 semanas en un laboratorio donde se realice investigación en Bioquímica y áreas afines bajo la tuición de un profesor guía. El Comité de Bioquímica recomienda la realización de hasta 4 unidades de investigación.

Idiomas. Se requiere la comprensión adecuada de dos idiomas extranjeros, indicados por el Comité de Bioquímica.

Examen de calificación. Como parte importante de este examen el Programa de Bioquímica exige la presentación de un proyecto de investigación (tesilla) no relacionada con la tesis. El alumno debe demostrar su capacidad para escoger problemas, diseñar la búsqueda de su solución y tener un conocimiento acabado de la literatura directamente relacionada con su proyecto, así como de los métodos que empleará en su realización. Este examen se lleva a cabo aproximadamente un año y medio después que el alumno ha sido aceptado; una vez aprobados los cursos fundamentales recomendados por el Comité de Bioquímica.

Proyecto de tesis. Una vez que el alumno aprueba el examen de calificación debe presentar un proyecto de tesis original, bajo el patrocinio de algunos de los profesores del programa. Una vez aprobado finalmente por la Comisión de Postgrado el alumno pasa a ser candidato a doctor.

Tesis de doctorado. La realización de la tesis de doctorado es la actividad fundamental del plan de doctorado, en importancia y dedicación. El trabajo de tesis se evalúa anualmente mediante los Seminarios de Avance de Tesis.

Defensa de tesis y examen de grado. La defensa de tesis consiste en la presentación oral del problema de tesis ante una comisión *ad hoc*. El examen de grado es un acto público donde el candidato a doctor da a conocer su trabajo de

tesis a la Comisión de Postgrado y a la comunidad académica.

Estadísticas

Desde 1971 han ingresado 48 alumnos al Programa de Bioquímica. De ellos, 15 se han retirado por diversos motivos, 2 fueron reprobados, 21 son actualmente alumnos y 10 se han graduado. El promedio de permanencia de los graduados es de 6 años. La causa principal del largo tiempo empleado se debe a que todos los alumnos participantes son académicos que deben cumplir con las obligaciones correspondientes a sus cargos.

Tutores y líneas de investigación

El Comité de Bioquímica considera tutores de tesis a investigadores que dirigen líneas propias de investigación y que hayan demostrado productividad reciente, avalada por publicaciones científicas en revistas de circulación internacional durante los últimos cinco años. Además, para guiar tesis doctorales, estos investigadores deben pertenecer a núcleos académicos que puedan aportar un medio rico en conocimientos teóricos y prácticos que complementen la formación que el alumno recibirá de su tutor. Este núcleo académico también debe contar con una infraestructura de equipamiento y biblioteca adecuada para las necesidades de un doctorado y con los medios económicos para la realización de la tesis.

En la actualidad hay 12 investigadores en el país que están autorizados por el Comité de Bioquímica para dirigir tesis de doctorado. Sus líneas generales de investigación se resumen en la parte III de este trabajo. Existen además, unos 35 investigadores en el país que pueden participar en cursos avanzados, seminarios y unidades de investigación.

B. PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

Este programa es de creación reciente y comenzó a funcionar el presente año. Sus objetivos, los requisitos de admisión, el trabajo de tesis y el examen de grado tienen características similares al doctorado de la Facultad de Ciencias. Su pro-

grama está organizado en un régimen de estudio semestral, con un sistema de currículo flexible. El plan de estudios comprende un conjunto de actividades curriculares regulares destinadas a proporcionar una formación sistemática de alto nivel en el área de la Bioquímica y una tesis de grado. El mínimo de actividades curriculares, incluyendo la tesis, corresponde a 255 créditos (1 crédito: trabajo del alumno en una hora semanal en un semestre de 18 semanas). Se estima que el programa puede cumplirse en al menos seis semestres. El candidato debe cursar actividades curriculares sistemáticas regulares correspondientes a 70 créditos; una de las asignaturas debe ser de formación general. El tiempo estimado para la realización del trabajo de tesis es de alrededor de cuatro semestres y está valorado en 185 créditos. El programa tiene actualmente 8 alumnos.

III. PRINCIPALES LINEAS DE INVESTIGACION DE LOS PROFESORES QUE PARTICIPAN EN LOS PROGRAMAS DE POSTGRADO

Programas de Magister y de Doctorado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile:

- Mecanismos regulatorios de la síntesis proteica
- Estructura y función de proteínas
- Mecanismos de acción hormonal
- Farmacología molecular
- Estructura y función de membranas biológicas
- Regulación metabólica a nivel enzimático
- Cinética enzimática
- Biosíntesis de terpenoides
- Replicación viral.

Programas de Magister y de Doctorado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas de la Universidad de Chile:

- Regulación metabólica.

Programa de Magister de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile:

- Regulación de la síntesis proteica
- Diferenciación celular
- Estructura y función de proteínas
- Genética molecular.

Programa de Magister del Instituto de Ciencias Médico-Biológicas de la Universidad de Concepción:

Estructura y función de enzimas

Biología molecular del desarrollo
Regulación metabólica
Enzimas proteolíticas
Estructura primaria de proteínas.

PROGRAMAS DE POSTGRADO EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR EN CHILE

UNIVERSIDAD	DOCTORADO			MAGISTER		
	AÑO iniciación	ALUMNOS actuales	ALUMNOS graduados	AÑO iniciación	ALUMNOS actuales	ALUMNOS graduados
Universidad de Chile						
<i>Facultad de Ciencias</i>	1971	21	10	1978	7	0
<i>Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas</i>	1979	8	0	1979	5	0
Universidad Austral	—	—	—	1979	7	1
Universidad de Concepción	—	—	—	1978	0	0

POSTGRADO DE BIOQUIMICA EN ARGENTINA

RICARDO N. FARIAS. (Instituto de Química Biológica, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

Las actividades de postgrado relacionadas con la Bioquímica tienen una organización distinta en las diferentes Universidades de la Argentina. La carrera de Bioquímica se desarrolla en diferentes ámbitos académicos según las universidades: Facultad de Ciencias Bioquímicas (Universidad Nacional de Rosario) o Facultad de Química (Universidad Nacional de Córdoba) o Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (Universidad Nacional de Tucumán) o Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata), etc. Si bien esto nos indica que el currículum de postgrado sea totalmente distinto en las siete universidades nacionales en las cuales se otorgan el título de Bioquímico o Licenciado en Bioquímica, muestra que la organización del sistema de postgrado es compartida por otras carreras que pueden influenciar el nivel de exigencia a que se ven sometidos los doctorados en las distintas universidades. Es

decir, que las exigencias para el doctorado en Bioquímica deben compatibilizarse en algunos casos con los doctorados en Física, Geología, etc. Como consecuencia los reglamentos para acceder al título de doctor difieren de una universidad a otra.

De los reglamentos de doctorados existentes se han seleccionado algunos que se presentarán en este coloquio en los cuales podrán apreciarse ciertas diferencias. La validez y las razones de las mismas son difíciles de apreciar, pues en definitiva la calidad y condiciones de los doctorados dependen de muchos otros factores como ser bibliografía disponible, desarrollo del centro, director de tesis, tema de trabajo, etc. Sin embargo, señalaré y tomaré para su discusión dos puntos de estos reglamentos y un tercero que, si bien no integra sus artículos, tiene su influencia en los mismos.

a) *Curso para doctorados*

Algunos reglamentos prevén cursos para doctorados, otros no. Pienso que la realización de cursos por los doctorantes deben cumplir alternativamente con dos objetivos. Uno es el de posibilitar al candidato a doctor la adquisición de

conocimientos especializados. Estos cursos generalmente se desarrollan en los grupos de trabajos con gran experiencia en el tema en cuestión. Otros tipos de cursos son aquellos que tienen en vista el hecho que un determinado tema requiera de conocimientos que no son adquiridos previamente en el currículum de pregrado. Por ejemplo la realización de un curso de pregrado de otra carrera (Genética de la Licenciatura en Biología).

b) *Designación del jurado*

En la mayoría de los reglamentos que prevé la designación del jurado que aprueba y califica el trabajo de tesis una vez escrito. Una alternativa interesante es la designación de una comisión de tesis para cada candidato, en el momento de su ingreso al doctorado. Esta comisión tiene la misión de ir discutiendo los resultados a medida que se vayan produciendo. Es decir, este tipo de organización tiende a un contacto continuado del tesista con el jurado que evita los problemas de calificación y asegura un control sobre la marcha del trabajo de tesis. El inconveniente de este sistema es quizás que no se puede aplicar en centros pocos desarrollados. Estos últimos por lo general prefieren el primer sistema con el cuidado especial de colocar en el jurado a un especialista de alto nivel en el tema de la tesis de otro centro del país.

c) *Otras actividades de postgrado*

Un problema que se presenta sobre todo en las universidades poco desarrolladas o con poca experiencia en la actividad de postgrado son los conceptos con los cuales se manejan el otorgamiento del título de Doctor en las diferentes disciplinas de una misma universidad. Para algunas disciplinas, el cumplimiento con un currículum de materias especializadas, es suficiente para acceder a dicho título, para otras es condición imprescindible la realización de un trabajo original. Estos diferentes conceptos originan un sinnúmero de trabas e inconvenientes en la reglamentación de las actividades de postgrado en una misma universidad. Paralelamente a esto, existe el celo de los colegios profesionales (Colegios de Bioquímicos) en preservar las incumbencias de los títulos profesionales. Actualmente se tiende a resolver este problema

aclarando que el título de doctor es exclusivamente académico y que el mismo no modifica las incumbencias profesionales del título predoctoral y al mismo tiempo se trata de disociar el título doctoral de los cursos de actualización que realizan periódicamente las universidades para sus egresados. En este último caso un grupo de materias suficientes en número y con especialidades afines pueden dar lugar a un certificado de especialista en algún aspecto de la Bioquímica.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INSTITUTO DE BIOFÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR

EDUARDO PENNA FRANCA. Instituto de Biofísica, Universidad Federal do Rio de Janeiro.

O Instituto de Biofísica da UFRJ é, na área de Ciências Fisiológicas o mais importante centro de investigação de pesquisadores.

Desenvolve um programa de pesquisa multidisciplinar e diversificado que extrapola dos setores tradicionais de biofísica e fisiologia estendendo-se pela bioquímica, genética, imunologia, farmacologia e ultraestrutura celular.

A partir de 1963, o Instituto de Biofísica mantém um Programa de Pós-Graduação senso estrito, concedendo graus de mestre e doutor em ciência. Como consequência de suas atividades multidisciplinares de pesquisa o Curso de Pós-Graduação foi organizado de molde a formar pesquisadores na área de ciências fisiológicas em geral, e setores afins, sendo a estrutura do curso extremamente flexível. Este Curso é apresentado como um modelo prático, de abordagem multidisciplinar, que poderia ser adotado por outras instituições que desejam iniciar um programa de pós-graduação.

O autor apresenta detalhes de estruturação do Curso, da estratégia tutorial de ensino, dados do alunado e do processo de seleção de candidatos, índices de desempenho e informações sobre o destino e atividades dos egressos do curso.

PROGRAMAS DE POSTGRADO EN BIOQUIMICA EN EL PERU

MARINO VILLAVICENCIO NÚÑEZ. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

En el Perú hay dos programas de postgrado en Bioquímica que conducen al grado de Magister: uno en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y otro en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Programa de Magister en Bioquímica en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Se inicia en 1971 gracias al apoyo financiero de la Fundación Kellogg que otorgó una subvención para equipos y becas para los estudiantes por un período de tres años. Posteriormente el programa se sigue manteniendo con los aportes de la Universidad, que subvenciona a los becarios, y de la Organización de los Estados Americanos que contribuye con fondos para equipos y profesores visitantes.

Requisitos para la admisión

Pueden ser admitidos al programa los graduados en Ciencias Biológicas, Medicina Humana, Medicina Veterinaria y Farmacia y Bioquímica. Últimamente se está dando preferencia a los egresados del Programa de Ciencias Biológicas cuyo currículum de estudios ha sido notablemente mejorado con una adecuada preparación en Ciencias Básicas.

Los postulantes son sometidos a un concurso de méritos que consiste en una evaluación de sus antecedentes, una prueba de conocimientos y una entrevista personal. Para la evaluación de los antecedentes se tiene en cuenta fundamentalmente los calificativos obtenidos en sus estudios universitarios. La prueba de conocimientos consiste en una exploración del estado y nivel de estos conocimientos en Química, Matemáticas y Ciencias Biológicas.

A los postulantes que han obtenido las mejores notas, la Universidad les otorga becas integrales consistentes en la exoneración del pago de derechos de enseñanza y una subvención mensual que inicialmente era equivalente a \$ 200. Esta suma se ha reducido posteriormente. Las becas son adjudicadas por un período de prueba. El estudiante debe obtener las más altas calificaciones para conservarla.

Estructura del programa

Los estudios duran dos años. El currículum del Primer Año depende de la preparación previa del estudiante. Generalmente se llevan los siguientes cursos:

Matemáticas Superiores I (4,5 créditos), Matemáticas Superiores II (4,5), Química I (5,0), Química II (5,0), Física (5,0), Biología Celular (5,0), Físico-Química (5,0), Análisis por Instrumentación (5,5), Estadística (4,0) e idiomas.

En el segundo año se inicia el trabajo de tesis que debe ser un tema de investigación original y se llevan Tópicos de Bioquímica y algunos de Fisiología y los Seminarios bibliográficos de Bioquímica. Los estudiantes deben completar un mínimo de 20 créditos en Tópicos y Seminarios. Los Tópicos que se ofrecen (se indica entre paréntesis el número de créditos) son los siguientes:

Físico-Química de las Proteínas (5), Biogénesis y Función de las Mitocondrias (4), Biología Molecular de las Proteínas (4), Química y Metabolismo de los Carbohidratos Complejos (3), Enzimología de la Glicólisis y Gluconeogénesis (3), Metabolismo de los Lípidos (4), Neuroquímica (3), Cinética Enzimática (5), Biología de los Iones Metálicos y Mecanismos de Transporte (4), Bioquímica, Biología y Patología de las Membranas Celulares (3), Bioquímica de la Expresión Genética (4), Regulación Metabólica (4), Aspectos Bioquímicos, Fisiológicos y Médicos de los Glóbulos Rojos (4), Tópicos en Fisiología (de 3 a 4 créditos cada uno).

Régimen de trabajo y calificaciones

El régimen de trabajo es a Tiempo Completo, para los que se proponen concluir sus estudios en dos años. Está también permitido llevar un menor número de créditos por semestre para concluir los estudios en más de dos años. Las calificaciones son de 0-20. Para graduarse de Magister el estudiante debe tener un promedio no menor de 14 en cada ciclo de estudios y hacer un trabajo de investigación original que le servirá de tesis.

Número de candidatos

Se admiten hasta 10 estudiantes cada año. En la actualidad tenemos 15 estudiantes entre el 1º y 2º año. Varios de ellos ya son docentes de

las universidades del país. Generalmente concluyen sus estudios el 50% de los que ingresan.

Fuentes de financiamiento

En la actualidad contamos con el apoyo de la Organización de los Estados Americanos para equipos y profesores visitantes. La Universidad de San Marcos contribuye manteniendo 4 becas integrales y un fondo fijo renovable para la adquisición de material de consumo, mantenimiento de equipos y animales de experimentación.

Tutores de tesis

Los tutores de tesis son profesores con el grado de Doctor o Magister con varios años de experiencia en investigaciones. En la actualidad hay 8 tutores cuyas líneas de investigación son las siguientes:

1. Regulación de la glicólisis y gluconeogénesis en camélidos sudamericanos.
2. Mecanismo de acción de las DNAsas.
3. Estructura de la cromatina en invertebrados.
4. Deficiencia de lactasa intestinal.
5. Propiedades de la fosfatasa ácida de bajo peso molecular del hígado de rumiantes.
6. Metabolismo de productos nitrogenados en el cerebro.
7. Nutrición en relación a la neuroquímica.

Número de graduados y destino ocupacional de ellos

Hasta 1978 han egresado 7 promociones con un total de 33 estudiantes de los que se han graduado de Magister 14 y la mayoría de los restantes tienen concluido el trabajo de tesis. Todos los egresados, con excepción de uno, están en la actualidad trabajando en las diferentes universidades del país. Tres de los graduados están siguiendo estudios de Doctorado en Bioquímica en los Estados Unidos de Norteamérica y otros tres están próximos a salir con idéntica finalidad.

Programa de Magister en Bioquímica en la Universidad Peruana Cayetano Heredia

Se inicia en 1970 con los auspicios de la Fundación Ford.

Requisitos de admisión

Los postulantes deben poseer grado de Bachiller en algunas de las disciplinas de las Ciencias Naturales, presentar sus certificados de estudios y someterse a una entrevista personal.

Reglamento del programa

Se requiere un mínimo de dos años. Se requieren 64 créditos. De ellos 32 créditos deben ser de cursos de nivel avanzado y 32 en trabajo de investigación.

Hay un examen de candidatura que se realiza al final del primer semestre, y consiste en la proposición de una investigación original sustentada ante un jurado de 3 profesores, uno de ellos de otro Departamento. Si el estudiante sale desaprobado se le da una segunda oportunidad. La desaprobación por segunda vez excluye al alumno del programa.

El estudiante cubre un número de créditos adicionales y un semestre de trabajo profesional supervisado, después del cual, obtiene el título de Licenciado en Biología.

En el último semestre el estudiante se dedica exclusivamente a su investigación de tesis el que ya debe iniciarse en los semestres anteriores. Al obtener el grado de Master en Bioquímica, el graduado recibe el título profesional de Licenciado.

Fuentes de financiamiento

El programa recibe apoyo económico de la Fundación Ford y de la Universidad en forma de Ayudantías de Práctica.

Tutores de tesis

Son profesores con grado de Ph. D. en Bioquímica, Doctor en Medicina o Master en Ciencias y que conducen investigaciones independientes. Hay 7 tutores cuyas líneas de investigación son las siguientes:

1. Cinética enzimática.
2. Cambios bioquímicos en las grandes alturas - Nutrición.
3. Bioenergética - glicólisis.
4. Metabolismo de drogas, sustancias extrañas.
5. Fisiología animal en las grandes alturas.
6. Biología celular de parásitos.

Número de graduados y destino ocupacional de ellos

Desde el año 1970 se han graduado de Magister en Bioquímica, 11. Han recibido el título de Licenciado en Biología, 12.

De los 11 graduados de Magister, 3 están en la actualidad siguiendo estudios para graduarse en Ph. D. en Bioquímica en universidades de los Estados Unidos de Norteamérica y Alemania; los restantes están trabajando en universidades del extranjero (4), en universidades nacionales (2) y en el ejercicio libre (2).

De los 12 que no se graduaron, pero recibieron su licenciatura en Biología, 6 siguen estudios para Ph. D. en universidades de Estados Unidos, Bélgica y España y los restantes trabajan en universidades y centros de investigación del país.

Cursos ofrecidos

El programa tiene un currículum flexible, los cursos que toman los estudiantes para completar los créditos exigidos depende de la línea de investigación escogida. Los cursos que ofrece el programa (los números entre paréntesis indican el número de créditos) y que pueden elegir los estudiantes son los siguientes:

Algebra Lineal (5); Análisis Numérico (6),

Programación Científica (4), Tópicos en matemáticas aplicadas (4), Elementos de Análisis Funcional (5), Mecánica Cuántica I (6), Mecánica Estadística (6), Tratamiento Matemática de Datos Experimentales (4), Seminario Avanzado I en Química (2 a 4), Tópicos Especiales en Físico-Química (hasta 7), Tópicos en Química Analítica (Análisis por Instrumentación) (hasta 7), Estadística II (3), Teoría de la Probabilidad II (5), Estadística Matemática I (5), Estadística Matemática II (5), Teoría del Muestreo I (4), Investigación en Zoología (hasta 15), Micología (5), Tópicos Selectos en Microbiología (5), Tópicos Selectos en Parasitología (5), Tópicos Selectos en Histología (hasta 8), Embriología Experimental (hasta 10), Técnicas de Laboratorio en Bioquímica (de 5 a 10), Técnicas de Laboratorio en Biofísica (de 1 a 5), Técnicas de Laboratorio en Fisiología (de 4 a 5), Metabolismo Intermedio (5), Tópicos Selectos en Bioquímica: a) Cinética Enzimática (5), b) Bioenergética (5), c) Estructura y Función de Macromoléculas (5), d) Nutrición (5), e) otros (5). Tópicos Selectos en Fisiología (5), Tópicos Selectos en Farmacología (5), Tópicos Selectos en Biofísica (5), Investigación en Bioquímica (hasta 16), Investigación en Fisiología (hasta 16), Investigación en Farmacología (hasta 16), Investigación en Biofísica (hasta 16).

INFLUENCIA DE LA α -MELANOTROFINA (α -MSH) SOBRE LA LIBERACION DE LH EN LA RATA. (Influence of α -melanotropin (α -MSH) on LH release in the rat). Alde, S. y Celis, M.E. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. Casilla de Correo 389, Córdoba, Argentina.

Se estudió el efecto que poseen las melanotrofinas (MSHs) sobre la ovulación y sobre la liberación de la hormona luteotrófica (LH) inducida por LH-RH. En ratas cuya ovulación fue inhibida por una dosis de progesterona (Pg) en D₁ la administración de Pg en D₃ y solución salina indujo ovulación al día siguiente en un 10% de los casos. La inyección i.p. de 30 ug de α -MSH en reemplazo de la solución salina incrementó el porcentaje de ovulación a un 90%. Ratas inyectadas con β -MSH mostraron una respuesta ovulatoria similar al grupo que recibió solución salina, indicando una posible acción específica de α -MSH. El reemplazo de la segunda inyección de Pg por α -MSH no modificó el porcentaje de los animales que ovularon con respecto a los inyectados con solución salina, por lo que se propone la posibilidad de que α -MSH actúe sinergizando la acción de Pg. El LH es una hormona efectiva en inducir ovulación en ratas en las que la ovulación espontánea fue bloqueada por la inyección de Pg en D₁. La inyección i.p. de 30 ug de α -MSH disminuyó la dosis de LH necesaria para inducir ovulación. Ratas que han recibido una inyección de 30 ug de α -MSH previa a una inyección e.v. de LH-RH mostraron un incremento significativo en los niveles plasmáticos de LH cuando se compararon con ratas en las que se reemplazó la inyección de α -MSH por solución salina. Los resultados presentados permitirían proponer que la liberación de MSH en la mañana del proestro podría actuar como un gatillo fisiológico en la liberación del LH de la tarde del proestro.

ESTUDIOS CINÉTICOS CON AMINOPEPTIDASA DE ORINA HUMANA (Kinetic studies with human urinary aminopeptidase). Alves, K.B.* , Brandi, C.M.W. and Guimarães, J.A.*- Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brasil.

Catalytic efficiencies (K_{cat}/K_m) of a human urinary aminopeptidase which hydrolyses L-amino acyl- β -naphthylamides, L-Leu-p-nitroanilide, exhibiting also a kinin-converting activity, were measured on the two first substrates mentioned. Results for the naphthylamides were: 1.4(Lys), 3.0(Arg), 3.5(Leu), 5.4(Met), 6.8(Ala) $\times 10^5 \text{ sec}^{-1}$; for the p-nitroanilide, $7.6 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$.

K_i values were determined; kinetic studies revealed a competitive type of inhibition or no inhibition with some amino acids, mono and diamines. p-Hydroxymercuribenzoate produced a maximal non-competitive inhibition when the $[I]/[E]$ ratio reached the value 10^6 .

These results suggest: 1) the hydrophobic chain is important for binding and catalysis 2) only one -NH₂ suffices for the amine inhibition but a minimal distance between charged groups is required for the diamines 3) enzyme-free -SH groups are not essential for catalysis.

Work supported by FINEP (Rio de Janeiro). (*) are CNPq (Brasilia) Fellowships holders.

CLONAMIENTO MOLECULAR Y ANALISIS PRELIMINAR DEL GENOMA DEL FAGO PM2. (Molecular cloning and preliminary analysis of bacteriophage PM2 genome). A. Alonso, M. D. Eberhard, J. R. Vicuña, A. Venegas, P. Valenzuela y A. Yudelevich.- Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Biología Celular, Univ. Católica de Chile.-

El bacteriofago PM2 que crece en la bacteria marina *Pseudomonas* BAL-31, posee un DNA de doble hélice circular con un peso molecular de 6×10^6 d., por lo que aparece como un sistema apropiado para estudios de replicación. Para llevar a cabo estos estudios, es necesario caracterizar genéticamente los cromosomas del fago y de la bacteria. Para este objeto, hemos iniciado un estudio del genoma del fago PM2 a fin de obtener un mapa físico detallado mediante el uso de enzimas de restricción.

Para obtener cantidades suficientes de DNA de PM2 hemos clonado este DNA usando como vehículo el plasmidio pBR-322. Ambos DNAs fueron linearizados con las enzimas de restricción Pst I o Hpa II, y luego unidos entre sí mediante la adición de extremos dG y dC con transferasa terminal. Las moléculas recombinantes fueron luego introducidas por transformación en *E.coli*. Luego de analizar las colonias obtenidas, se detectaron 3 de ellas con un plasmidio híbrido formado por pBR-322 y PM2. Estos plasmidios son estables y se replican en forma normal en *E.coli*. Además, hemos clonado en forma similar los 7 fragmentos obtenidos por digestión de DNA de PM2 con Hind III. Un mapa físico detallado de PM2 está en progreso usando estos clones.

Financiado por DIUC.-

INTERACCION DE LA KINASA PIRUVICA DE MUSCULO DE CONEJO Y AZUL DE CIBACRON F3GA. (Interaction of rabbit muscle pyruvate kinase and Cibacron blue F3GA). Aranda, E., Bazaes, S. y Eyzaguirre, J.- Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile, Santiago.-

El colorante azul de Cibacron F3GA interactúa con deshidrogenasas y kinasas y se ha propuesto que esto ocurre en el sitio de unión de nucleótidos. Recientemente, Weber y cols. han demostrado que las preparaciones del colorante son heterogéneas y que el mayor efecto inactivador se debe a una impureza. Esto ha llevado a una revisión de los resultados utilizando un colorante purificado.

Se purificó el azul de Cibacron por el método de Weber y cols. comprobándose su pureza mediante cromatografía en capa fina. Kinasa pirúvica de músculo de conejo se preparó mediante el método de Tietz y Ochoa.

La enzima es inactivada por acción del colorante en función del tiempo, y el grado de inactivación depende de la concentración de éste. La cinética de inhibición es competitiva con respecto a ADP y no competitiva con respecto a PEP. La titulación de la enzima por el colorante mediante espectrofotometría diferencial a 660 nm muestra una saturación. Por su parte, una impureza del colorante produce una inactivación muy superior a igual concentración.

Los resultados indican que el azul de Cibacron interactúa con la kinasa pirúvica de músculo, y que esta interacción se lleva a cabo probablemente a nivel del sitio de unión del ADP.

Financiado en parte por DIUC proyecto 46/79.-

PROPIEDADES CATALÍTICAS DE DOS CALICREÍNAS GLANDULARES (Catalytic properties of two glandular kallikreins) Araujo-Viel, M.S. and Prado, E.S. Depto. de Bioquímica. Escola Paulista de Medicina - SP - BRASIL.

Glandular kallikreins possess the unusual specificity of splitting a Met-Lys and a Arg-Ser bond in kininogens.

We demonstrated that horse urinary and porcine pancreatic kallikreins split only the Met-Lys bond of the synthetic tridecapeptide Gly-Leu-Met-Lys-Bradykinin. When the enzymes were acylated by PFSF or alkylated by Ala-Leu-Lys-Cl₂Cl no hydrolysis occurred. Oxidation of the substrate methionine residue to sulfoxide also blocked its hydrolysis by both enzymes. Substitution of the methionine by norleucine residue in a new synthetic tridecapeptide resulted in Nle-Lys bond cleavage.

These results indicate that the Ser and His active site residues in these kallikreins participate in the catalytic process of Met-Lys and Arg-Ser bonds hydrolyses; they also suggest that glandular kallikreins, besides the anionic site for binding of the arginine residue involved in the susceptible bonds, possess also a hydrophobic site for binding the methionyl group of the Met-Lys bond.

Work supported by CNPq (Brasília) and FINEP (Rio de Janeiro).

TUBULINA AMINOACILADA, NO-AMINOACILADA Y TOTAL EN CEREBRO DE RATA DURANTE EL DESARROLLO. (Aminoacilated, non-aminoacilated and total tubulin in rat brain during development) Barra, H.S. y Arce, C.A. - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

El terminal COOH de la cadena α de tubulina puede sufrir una modificación post-translacional mediante la incorporación de tirosina, fenilalanina o dopa catalizada por la tubulina: tirosina ligasa.

En extractos solubles de cerebro se cuantificó las especies de tubulina aminoacilada y no-aminoacilada mediante la incorporación máxima de tirosina-¹⁴C en muestras preincubadas en presencia y ausencia de carboxipeptidasa A la cual elimina el aminoácido incorporado in vivo.

La relación tubulina no-aminoacilada/aminoacilada se incrementó desde 1,61 en ratas de 4 días a 2,11 en ratas de 120 días. La suma de estas dos especies de tubulina (tubulina "aminoacilable") fue, a cada edad analizada, menor que la cantidad de tubulina total determinada mediante un método basado en la purificación de tubulina marcada previamente con tirosina-¹⁴C. La fracción de tubulina no-aminoacilable fue aproximadamente el 15% de la tubulina total en animales de 4 días y alcanzó el 50% en animales de 120 días.

ASOCIACION MOLECULAR DE LA HEXOQUINASA DE CEREBRO A LA MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL. [Molecular Association of Brain Hexokinase to the Outer Mitochondrial Membrane]. Arrese, M. y Bustamante, E. Dpto. de Ciencias Fisiológicas, Universidad Cayetano Heredia, Apartado 5045, Lima 100, Perú.

La hexoquinasa (EC 2.7.1.1) es una enzima que se encuentra asociada a las fracciones mitocondrial y citosólica de células de varios tejidos. En el cerebro, hasta un 80% de la hexoquinasa está unida a la membrana externa mitocondrial.

La forma mitocondrial de la enzima puede dissociarse de la mitocondria via la participación de agentes "solubilizantes" (e.g. ATP y glucosa-6-P). Por tanto, una tercera forma de hexoquinasa [hexoquinasa mitocondrial solubilizada] puede definirse como operacionalmente distinta de aquella actividad siempre asociada a la fracción citosólica.

El propósito de este trabajo fue examinar el tipo de interacción existente entre la hexoquinasa mitocondrial y la membrana externa mitocondrial. Para esto, se investigó la dependencia de las actividades de las tres formas de hexoquinasa con respecto a pH, fuerza iónica, y temperatura (gráficas de Arrhenius), así como la dependencia del proceso de solubilización de la forma mitocondrial con respecto a temperatura (gráficas de Van't Hoff).

Los resultados sugieren que las regiones de la enzima responsables de tanto la actividad catalítica como de la unión a la membrana, interactúan con la membrana mediante fuerzas no hidrofóbicas.

[financiado parcialmente por grant PNUD RLA 78/024]

DESARROLLO PERINATAL DEL LISOSOMA HEPATICO DEL RATON. Bertini, F. Laboratorio de Fisiología Celular, Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.C.

El aparato lisosomal hepático interviene en importantes pasos catabólicos y es indispensable en la defensa del organismo contra la invasión de microorganismos.

Se midieron actividades de enzimas lisosomales hepáticas (fosfatasa ácida, beta-glucuronidasa, arilsulfatasa, desoxiboribonucleasa, catepsina D, lipasa, esterasa. Con excepción de la catepsina D las actividades enzimáticas aumentaron entre 50 y 400% en los primeros días de vida. Al mismo tiempo 131 I albúmina, inyectada I.P. a los fetos y recién nacidos incrementó su captación, internalización, y digestión intracelular en el hígado. Por otra parte alrededor del 5° día después del nacimiento las células de Kupffer se tiñen intensamente por inyección I.P. de tinta china. Los niveles de actividad enzimática en el hígado materno siguen un curso totalmente distinto del de hígado fetal o del recién nacido.

Se desprende que el aparato lisosomal existe en el hígado fetal pero recibiría notable impulso en los primeros días después del parto, y alcanzaría su estado de madurez en los primeros 15 días de vida.

A THEORY ON THE SIGNIFICANCE OF GRANA FORMATION IN CHLOROPLASTS: PRODUCT AND/OR MEANS OF ADAPTATION.

Berzborn, R. J.-Abt. Biology, Ruhr-Universität Bochum W. Germany.

Determination of the content of chloroplasts thylakoid membranes in photosynthetic ATP-Synthetase (CF_1) and analysis: of the morphology of the thylakoid system have been carried out. Both measurements were done on chloroplasts from spinach plants grown under high or low light intensities. A correlation was found of CF_1 content and proportion of exposed membrane areas. This observation strengthens the hypothesis that CF_1 is restricted to exposed areas, and leads to a theory on the physiological significance of formation of "grana" in chloroplasts.

Synthesis and metabolism of plasma kallikrein by perfused rat liver. *Borges, D.R., Webster, M.B.**, *Gutmarães, J.A.** and *Prado, J.L.**-Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP., Brasil.

Little evidence exists regarding the suspected hepatic origin of plasma kallikrein. When the liver from normal rats was perfused in situ with Tyrode's fluid containing 40 mg/ml of bovine serum albumin, a kinin-liberating activity accumulated in the perfusate. Measured on incubation with human HMW kininogen and on N-benzoyl-L-Pro-L-Phe-L-Arg-p-nitroanilide, which are typical plasma kallikrein substrates, the activities run parallel courses for 2 hours of perfusion, corresponding respectively to 4.7 nmoles of bradykinin and 3.3 mU/g liver/hour of perfusion. The perfusate esterolytic activity on TAME was partially inhibited by SBTI, suggesting enzyme binding to α_2 -macroglobulin.

Both kallikrein and albumin liver syntheses were inhibited by previous cycloheximide treatment of the rats. A purified rat plasma kallikrein preparation was perfused through liver and a progressive fall of its esterase and amidolytic activities, to around 30% of the initial values, occurred within 2 hours.

Rat liver synthesizes and seems to play a role on plasma kallikrein metabolism *in vivo*.

* We acknowledge FINEP (Rio) and FAPESP (S.P.) Grants and CNPq (Rio) Fellowships

CARACTERIZACION DE LA UNION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA A LOS RECEPTORES LACTOGENICOS SOLUBILIZADOS DE HIGADO DE RATA. (Characterization of human growth hormone binding to the solubilized lactogenic receptors from rat liver). *Bonifacino, J.S., Sánchez, S.H. y Paladini, A.L.* Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Se ha detectado la existencia de receptores específicos para hormonas lactogénicas en microsomas hepáticos de rata. Estos receptores han podido ser solubilizados con el detergente no iónico Tritón X-100 1%(P/V). En estado solubilizado, retienen la capacidad de unir hormonas lactogénicas en forma específica. La unión de (125 I)hormona de crecimiento humana a estos receptores es dependiente del tiempo y de la temperatura de incubación, así como de las concentraciones de proteínas solubilizadas y de hormona en el medio. El análisis de los datos de interacción de la hormona con el receptor revela la existencia de un solo grupo de sitios de unión con una constante de disociación de $2,3 \cdot 10^{-10}$ M y una capacidad 2400 fmoles por miligramo de proteínas. La afinidad de la hormona por el receptor solubilizado no es muy distinta que la que presenta por el receptor particulado; en cambio la capacidad es mayor, sugiriendo que la solubilización da lugar a la aparición de receptores ocultos.

Los resultados sugieren que la solubilización no afecta de manera fundamental las propiedades del receptor.

ACTIVIDADES DE ENZIMAS EN HIGADOS DE RATONES ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON UREA* (Effects of adding urea to protein diet and non-protein diet upon enzymes in rats). *Brenner, L. R.* Departamento de Ciências dos Alimentos, ICTA, UFRGS, BRASIL.

Los resultados sobre el efecto de fuentes de nitrógeno no específico en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea y enzimas relacionadas al metabolismo de los grupos amínicos, son contradictorios.

Se investigaron las alteraciones que ocurren en la actividad de las enzimas del ciclo de la urea, transaminasas (GPT y GOT) y GDH, en hígados de ratones Wistar, en crecimiento, cuando adicionamos urea a dietas de caseína (9% y 18%) y a dieta sin nitrógeno.

Después de 14 días, la actividad de las enzimas fué determinada.

La actividad de la CPS tuvo un aumento significativo cuando la caseína a 9% contenía urea, en relación a la sin urea. La actividad de la GOT y de la GPT fué disminuída cuando los animales recibieron la dieta sin nitrógeno con urea.

Se supone un efecto de la ingestión de la urea sobre las actividades de estas enzimas.

*Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica, ICB, UFRCS.

DOSAJE DE RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDES EN CELULAS LEUCEMICAS DE SEZARY. Brentani, M.M.; Honda, M.H. y Pozzi, D.H. Laboratorio de oncología experimental y Departamento de Reumatología da FMUSP. C. P. 8100-Sao Paulo- Brasil.

Usando un ensayo competitivo determinamos receptores citoplasmáticos de glicocorticoides en células leucémicas, de dos pacientes con la rara síndrome Sezary diagnosticada clínica y citológicamente. Estos dos pacientes no recibieron tratamiento. Células mononucleares aptas fueron separadas en gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque. Suspensiones celulares en Eagle, conteniendo en mínimo 10^6 células por ml, fueron incubadas con múltiples concentraciones de Dexametasona (0,5-10 nm) conteniendo una concentración 100 veces mayor de Dexametasona no radiactiva. El número de sitios específicos de ligación citoplasmática por células y la constante disociación (KD) fueron obtenidos a través de un análisis Scatchard. Sangre normal fue usado como control negativo; y timo de camundongo como control positivo. El 1er paciente (45 años) tenía 11.600 leucocitos por mm^3 con 31% de linfocitos y de éstos 67,7% de células de Sezary. El KD obtenido fue de 3×10^{-9} M/L y el número de sitios de ligación fue de 3150 sitios por células. El paciente n°2 (54 años) tenía 25.000 leucocitos por mm^3 de los cuales 80% eran mononucleares y de éstos 78,7% eran células de Sezary. El KD obtenido fue 4×10^{-9} M/L y el n° de sitios 3 mil por células. Los datos demuestran que estos dos pacientes contienen cantidades significativas de receptores de glicocorticoides citoplasmáticos y ambos están respondiendo a la terapia con Prednisona.

SEPARACION DE FAD-FLAVOPROTEINAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD DE LAS APOENZIMAS EN SEPHAROSE-FAD. (Separation of FAD-Flavoproteins by apoenzyme affinity chromatography on FAD-Sepharose). Bronfman, M., Inestrosa, N.C., y Morales, M.N.- Laboratorio Citología Bioquímica, Departamento Biología Celular, Universidad Católica de Chile.

FMN y riboflavina covalentemente unidos a celulosa, poliacrilamida o agarosa, han sido utilizados para la purificación de flavoproteínas por cromatografía de afinidad. No hemos encontrado, sin embargo, ejemplos en la literatura de utilización de FAD inmovilizado para la purificación de apoenzimas de FAD-flavoproteínas.

En esta comunicación se presenta un método para la unión covalente de FAD a Sepharosa 4B, consistente en la reacción de p-amidobenzamidoheptil-Sepharosa 4B diazotizada, con FAD en tampón acetato 0,2M, pH 5,5. El gel resultante, de color anaranjado-rojizo, tiene un máximo de absorción a 320-330 nm (pH 8,0). En un medio 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (tampón de unión) el gel es capaz de unir las apoenzimas de D-amino ácido oxidasa y de la oxidasa peroxisomal de ácidos grasos. En ambos casos las apoenzimas no son eluidas del gel por tampón de unión 100 o 500 mM en KCl, siendo eluidas completamente por 15 mM FAD en el mismo tampón. Estos resultados sugieren que el derivado preparado podría ser de validez general en la purificación de otras flavoproteínas. (Financiado por proyecto DIUC 17/77).

ESTRUCTURA CUATERNARIA Y SITIO ACTIVO DE LA RNA POLIMERASA I DE LEVADURA. (Quaternary structure and active site of yeast RNA polymerase I).- Bull, P. Valenzuela, P.- Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Biología Celular, Universidad Católica de Chile

La RNA polimerasa I de levadura está compuesta por 12 polipéptidos con pesos moleculares entre 10.000 y 185.000. Se estudió la función de algunos de ellos, así como algunos residuos aminoácidos importantes en la actividad enzimática.

Con modificadores selectivos de grupos SH se determinó el número de SH que posee la enzima y cuántos reaccionan en condiciones no desnaturantes. Dos de ellos son esenciales para la actividad enzimática y están localizados posiblemente en el sitio activo de la enzima. En ausencia de 2-mercaptoetanol, se produce entrecruzamiento de algunas subunidades.

Se observó que dos subunidades son lábiles en ciertas condiciones de elución de columnas de azul dextrano sefarosa y de fosfocelulosa, así como al ultracentrifugación en gradiente de sacarosa corrida a 15°C.

Por unión a concanavalina A- 125 I se determinó que aparentemente 3 péptidos son glicoproteínas.

Se estudió la estabilidad de la enzima a diferentes pH. A pH ácido (4) se inactiva irreversiblemente. En estas condiciones, el complejo proteico pierde, aparte de las subunidades anteriores otras dos más.

Los resultados presentados se complementan con visualización al microscopio electrónico de la enzima sometida a los diferentes tratamientos.

ESTUDIOS ESTRUCTURALES EN β -LACTAMASA DE STREPTOMICIS UCSM-104. (Structural studies in β -lactamase from Streptomyces UCSM-104).

Campos, M., Garcés, E., Montecinos, M., Ruiz, J., Ward, P.- Instituto de Química, Departamento de Polímeros, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Departamento de Bioquímica y Fisiología, Universidad de Concepción.

β -Lactamasas (i.e. β -lactama hidrolasa, E.C.3.5.2.6) actúan hidrolizando el anillo β -lactámico de penicilina y cefalosporinas, originando productos biológicamente inactivos que generan el problema de resistencia a antibióticos.

β -Lactamasa de Streptomyces UCSM-104 se purificó a un alto grado de pureza, de acuerdo a criterio de electroforesis en gel de poliacrilamida y análisis de aminoácidos; mostrando una actividad específica de 5514 U/mg.

En cromatografía de DEAE-celulosa a pH 7,6 y en electroforesis en gel de poliacrilamida, pH 8,3, presentó un carácter aniónico, implicando un pI < 7,6 que concordaría con su alta movilidad absoluta ($4,6 \times 10^{-9}$ m 2 s $^{-1}$ V $^{-1}$) y con su composición aminoacídica.

El peso molecular obtenido a partir de análisis de aminoácidos es de 15340, el cual está en el rango al determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida en la presencia de dodecilsulfato (14290) y el obtenido por filtración en gel (14800 \pm 1500).

Se trata de una proteína globular constituida por una sola cadena polipeptídica de 141 residuos aminoacídicos. Carece de cisteína y contiene un 56% de aminoácido hidrofílico de acuerdo a análisis de aminoácidos.

PROCESAMIENTO DEL RNA NEURONAL (Processing of neuronal RNA) Capasso, J. Lacoste, C. Buegauer S., Azcurra J. y Carrasco A.E. Cat. de Biología Celular FCEN y Lab. de Neurobiología II Cat. de Histología. Fac. Medicina UNBA.

Mediante métodos ya descritos fue obtenido RNA de núcleos altamente purificados de fracciones de neuronas aisladas de corteza cerebral de rata de 10 días de edad. En experimentos con RNA marcado con uridina H^3 y C^{14} usando cromatografía de afinidad y gel electroforesis cuantitativa se estudió el procesamiento del HnRNA con distintos pulsos de marcación in vivo. El HnRNA poli A(+) representa cerca del 25% del RNA nuclear total predominando las especies mayores de 30s. La mayor parte del poli A(+) originado en los precursores pesados (70s o más) se procesa rápidamente a su tamaño final y deja el núcleo sin un retardo apreciable. Las fracciones livianas (menores de 18s) presentes no están significativamente marcadas en los diferentes tiempos de incorporación ensayados. La fracción HnRNA poli A(-) se comporta como la poli A(+) pero componentes pequeños llegan a marcarse a tiempos más largos de marcación (4 a 5 hs.). Estos hallazgos sugieren que estos componentes nucleares representan precursores citoplasmáticos u otros tipos de RNA con una función en el propio núcleo. Nuestros resultados además sugieren un retardo en la salida del rRNA o una retención de formas maduras del rRNA en el núcleo neuronal.

APRENDIZAJE Y AUMENTO DE SÍNTESIS PROTEICA CEREBRAL. (Learning and brain protein synthesis increase). Carrasco, M.A., Souza, D.O., Dias, R.D., Elisabetsky, E., Izquierdo, I. - Depto. Bioquímica, UFRGS, 90000 Porto Alegre, Brasil

Se admite que el aprendizaje causa aumento de síntesis proteica (SP) cerebral, que desempeñaría un papel en la memoria. Con todo, nunca se han hecho mediciones apropiadas de este fenómeno (distintos tiempos, varias estructuras, controles adecuados, etc.).

Hemos medido incorporación de ^{14}C -leu a proteínas (dpm/mg prot./dpm homogenato total) en homogenatos de hipocampo, caudado, resto de cerebro e hígado, en ratas sometidas a 25 min de: 1) pseudocondicionamiento (tonos de 5 seg y choques de 1 mA al azar); 2) condicionamiento clásico (tonos y choques contiguos); 3) condicionamiento instrumental con intervalo tono-choque variable; 4) id. con tonos y choques contiguos; 5) tonos solos; 6) choques solos; 7) controles intactos. Los animales eran decapitados 0, 1, 2, 3, 4, 6 u 8 hs después de terminada la sesión correspondiente.

Hubo aumento de SP a las 3-4 hs en caudado, cerebro e hígado en todos los grupos, y en hipocampo en los grupos 1, 5 y 6 (o sea, aquellos que no aprendieron). Los tres grupos sometidos a aprendizaje verdadero (2, 3, 4) no mostraron el aumento de SP en hipocampo. Por lo tanto, el único fenómeno específicamente relacionable con aprendizaje, fue justamente el no aumento de SP en hipocampo.

(Apoyado por PROPESP-UFRGS y FAPERGS, Brasil)

DESHIDROGENASA DE D-ARABINOSA DE NEUROSPORA (Arabinose dehydrogenase from Neurospora). Carrasco, A., Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En este trabajo se presentan resultados de los estudios genéticos y bioquímicos realizados para caracterizar diferencias de niveles de D-arabinosa-deshidrogenasa en las cepas 74-A, col-15a y col-16a de *Neurospora crassa*.

Se purificó la enzima a homogeneidad. La caracterización se realizó por medición de algunos parámetros cinéticos y físicoquímicos. Los parámetros son similares en las tres cepas. El punto isoeléctrico de $6,23 \pm 0,017$, indica que se trata de una proteína ácida y el comportamiento electroforético frente a agentes desnaturalizantes indica que la enzima nativa es un monómero de peso molecular 52.000 ± 2.000 . Los estudios inmunológicos realizados con preparaciones enzimáticas de las tres cepas demostraron identidad antigénica, sugiriendo que probablemente se trata de la misma enzima. La cuantificación de la enzima en los extractos crudos, mostró que las cepas coloniales col-15a y col-16a tienen el doble de enzima que la cepa silvestre 74-A.

La caracterización genética realizada mediante el análisis de productos meióticos, heterocariosis y reversiones indicó que la diferencia de actividad Ara-DH detectada entre las cepas 74-A, col-15a y col-16a está determinada probablemente por un solo gen. El control genético, estructural o regulatorio, de la enzima es diferente al de los genes que determinan las alteraciones morfológicas exhibidas por col-15a ó col-16a.

EFFECTOS HORMONALES EN LA CAPTACION Y UTILIZACION DE GLUCOSA EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Hormonal effects on the uptake and utilization of glucose by Xenopus laevis oocytes) Carvallo, P., Connelly, C.C., Attende, J.E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La hormona gonadotropina coriónica humana causa la maduración meiótica de los oocitos de anfibio y un aumento de la captación de aminoácidos exógenos por estas células. (Dev. Biol. 63, 213-223, 1978). Se estudió el efecto de estas y otras gonadotropinas sobre la captación de glucosa. La captación de glucosa se midió incubando grupos de 5 oocitos en triplicado con C^{14} -glucosa (0,1-10mM) en solución salina para anfibios, durante 30-60 min. a 22°. Las células se lavaron exhaustivamente con la misma solución salina y se aplastaron en filtros de fibra de vidrio, los que se secaron y contaron. Las gonadotropinas hCG y LH producen un claro estímulo de la captación de C^{14} -glucosa y C^{14} -3-O-metil glucosa en un amplio rango de concentración de estos azúcares. FSH, de composición análoga y progesterona, que produce maduración, no estimulan la captación de C^{14} -glucosa. Se ha observado que la captación de los azúcares disminuye drásticamente después de 6-8 horas de tratar los oocitos con hCG o progesterona. Este cambio sólo se detecta en oocitos de tamaño intermedio (estados 3,4 y 5 según DUMONT) a pesar de que no inducen maduración. La captación de C^{14} -glucosa basal y estimulada por hCG es inhibida por flordizina y por 3-O-metilglucosa. Mas del 90% de la C^{14} -glucosa que entra en oocitos estimulados y no estimulados por hCG se incorpora a glicógeno.

Auspiciadores: F. Ford, PNUD/UNESCO. OEA y U. de Chile

PROTEASAS ACIDICAS DE PROSTATA HUMANA: ¿SECRETABLES? (Acidic Proteases from Human Prostate Secretables?). Chiang, L., Chiang, J., Contreras L. y Ward, P.H. Departamento de Fisiología Instituto de Ciencias Médico Biológicas. Universidad de Concepción.

El líquido seminal humano (LSH) contiene una proteasa ácida cuyo origen y función se desconoce. Se ha abordado el estudio del origen eligiéndose la próstata como posible órgano productor y secretor de ella.

Un homogeneizado de próstata se sometió a fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio y de afinidad.

Se obtuvo dos proteasas ácidas: A y B. La A no es retenida por las columnas de intercambio, es inestable a pH 2.0 y estable a pH 8.0. La B es retenida, es estable a pH 1.0 y es inactivada a pH 7.5. Ambas son proteasas carboxílicas inhibibles por pepstatin. Sus pI's óptimos son 3.5 y 3.0 respectivamente. Sus pesos moleculares, determinados por filtración en gel, son muy semejantes. Por estimulación de la secreción prostática de perro se obtiene una proteasa semejante a la B y a la de LS H. La A presenta todas las características de catepsina D. La B presenta las propiedades de la proteasa seminal.

Se plantea la hipótesis de que la próstata es el órgano productor y secretor de la proteasa ácida presente en el líquido seminal humano.

RETENTION OF Ca^{2+} BY RAT LIVER AND RAT HEART MITOCHONDRIA. EFFECT OF PHOSPHATE, Mg^{2+} AND NAD(P) REDOX STATE. Coelho, J.L.C. and Vercesi, A. - Depto Bioquím. - IB UNICAMP - BRAZIL.

Parallel measurements of Ca^{2+} uptake, oxygen consumption, endogenous Mg^{2+} efflux and swelling in rotenone poisoned rat liver and rat heart mitochondria showed that heart mitochondria is much more resistant to uncoupling by Ca^{2+} in the presence of phosphate than rat liver mitochondria. The extents of Mg^{2+} efflux and swelling induced by Ca^{2+} accumulation are also much less pronounced in heart mitochondria. Uncoupling and swelling in liver mitochondria seems to be a result of the loss of membrane bound Mg^{2+} as a consequence of Ca^{2+} recycling across the membrane induced by phosphate. Exogenous Mg^{2+} protects liver mitochondria against the deleterious effects of Ca^{2+} by inhibiting a ruthenium red-insensitive Ca^{2+} efflux induced by phosphate. Phosphate does not induce recycling of Ca^{2+} in heart mitochondria. On the other hand, when respiring on NAD-linked substrates or with succinate in the absence of rotenone, heart mitochondria behave like liver mitochondria with respect to the alterations caused by Ca^{2+} movements. In this case the recycling of Ca^{2+} is a consequence of the more oxidized state of mitochondrial Pyridine Nucleotides.

This work was supported by the financial contribution of the CNPq and FAPESP.

LIPIDOS INTERMEDIARIOS EN LA SINTESIS DE EXOPOLISACARIDOS: INCORPORACION DE RAMNOSA A UN PRENOL DI FOSFATO-HEXASACARIDO. (Lipid-intermediates in exopolysaccharide biosynthesis: rhamnose incorporation into a prenol-diphosphate-hexasaccharide). Couso, R., Ielpi, L. y Dankert, M. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Acetobacter xylinum se caracteriza por sintetizar grandes cantidades de celulosa. En nuestro laboratorio se ha encontrado que forma también por lo menos otro exopolisacárido de composición muy compleja. Se ha podido aislar y purificar este polisacárido y por diversos criterios se ha determinado que contiene glucosa, manosa, ácido glucurónico, ramnosa y ácido galacturónico. Se investigó también la participación de lípidos intermediarios en su biosíntesis. Se han aislado y caracterizado ya a varios prenol-difosfato-azúcares. En esta comunicación se describe la síntesis y estructura de uno de ellos, que contiene ramnosa.

El nucleótido azúcar dador es el TDP-ramnosa y la incorporación es máxima en presencia de UDPG, GDP-man y UDP-glucurónico. El nuevo compuesto se puede marcar, en ciertas condiciones, con cualquiera de estos azúcares. Por análisis de los productos de degradación parcial (hidrólisis, acetólisis) se pudo identificar ramnosil-genclobiosa. Para el nuevo compuesto se propone la siguiente estructura:

ramnosa (glucosa- β -1,6-glucosa)-glucurónico- β -1,6-manosa- β -1,3-glucosa- β -1,4-glucosa-P-P-prenol. Su participación en la síntesis del exopolisacárido está en estudio.

SUSTANCIAS QUE DISMINUYEN EL POTENCIAL DE INTERFASES LIPIDICAS MODIFICAN EL MOVIMIENTO DE DOPAMINA EN SINAPTOSOMAS. (Substances that decrease the interfacial potential modify dopamina movements in synaptosomes). Cumar, F.A. y Maggino, B. - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000, Córdoba, Argentina.

Compuestos capaces de inducir fusión de membranas como polisialogangliósidos, sulfátidos, glicerilmonooleato, ácidos grasos insaturados, proteína básica de mielina y sacarosa inhiben la captación Na-dependiente e inducen liberación Ca^{++} -dependiente de 3H -dopamina en terminales nerviosos. Sustancias químicamente similares a las anteriores como monosialogangliósidos, glicosfingolípidos neutros, glicerilmonoesteerato, ácidos grasos saturados y albúmina no mostraron dichos efectos.

La inhibición de la captación por efecto de la sacarosa es reversible. Experimentos con ouabaina indican que esta reversión estaría mediada por la reconstitución del gradiente de Na^+ , necesario para el co-transporte de dopamina.

Los efectos de los compuestos enumerados se correlacionan con su capacidad de modificar la diferencia de potencial y el empaquetamiento molecular e interfases con fosfolípidos lo cual puede resultar en cambios de permeabilidad a iones y en movimientos concomitantes de neurotransmisor.

UN METODO SIMPLE Y RAPIDO PARA EL ENSAYO CUANTITATIVO DE ENZIMAS PROTEOLITICAS. (A rapid and simple method for the quantitative assay of proteolytic enzymes). Curotto, E., O'Reilly, S., y González, G. Instituto de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Universidad Católica de Valparaíso.

Los ensayos de actividad proteolítica se basan en medir la proteína digerida en un cierto tiempo determinando la cantidad de péptidos liberados a la solución. Estos métodos no son apropiados para medir proteínas en extractos crudos, pues poseen actividades bajas y valores altos en los blancos. Esto se evita con la determinación de colorante liberado a la solución por la proteólisis de proteínas insolubles coloreadas. En este estudio se investiga el uso de azocoll, colágeno insoluble asociado con un colorante tipo azo, como sustrato para el ensayo de proteinasas.

Se utilizaron enzimas como pronasa, pancreatina, pepsina, quimotripsina y otras: se estudiaron variables como concentración de enzima, de sustrato y tiempo de reacción. Un ensayo involucra mezclas de azocoll, la enzima en buffer e incubación a 37°; la reacción se termina diluyendo y filtrando; el filtrado se lee a 520nm.

Se observa que utilizando 10 mg de azocoll en un volumen final de 0.5 ml la aparición de color es directamente proporcional con la concentración de enzima. El tiempo de reacción más apropiado resultó ser 10 minutos. La reacción es también proporcional a la concentración de sustrato. La aparición de color muestra una relación directa con la liberación de material peptídico del sustrato. El azocoll puede ser sustrato para determinar proteinasas en forma rápida y simple, y en rangos de concentración particular para cada enzima.

TRANSLATION OF RNA TRANSCRIBED FROM THE DNA PUFFS FROM RHYNCHOSCIARA AMERICANA SALIVARY GLAND CHROMOSOME. De Toledo, S.M., Santelli, R.V., and Lara, F.J.S. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas e Universidade de Sao Paulo, Brasil.

It was reported that the B-2 DNA puff in the B-chromosomes of cells of the proximal section of *R. americana* codes for a 14S poly(A)+ RNA, and coincident with its formation there is the appearance of a specific 2.1×10^4 daltons peptide. (Bonaldo et al. (1979) Cell "in press"; Winter et al. (1977) Chromosoma 61, 193).

We have isolated poly(A)+ RNA from proximal sections of *R. americana* salivary glands obtained from larvae at the developmental stage, in which the B-2 puff is fully open, and translated it in the mRNA dependent reticulocyte cell free system in the presence of L-³H-leu. Analysis of the radioactivity incorporated as TCA insoluble material by electrophoresis and subsequent fluorography, revealed the presence of the 2.1×10^4 daltons peptide.

Similar experiments carried out with poly(A)+ RNA preparations from the middle and distal sections of the glands, revealed that the 2.9×10^4 daltons peptide, which had been assigned to the C-3 DNA puff, is also translated from a poly(A)+RNA.

Control experiments carried out with poly(A)+RNA from glands, where there are no DNA puffs, revealed that these peptides are not found among the translation products.

This work was supported by FAPESP, CNPq and Stiftung Volkswagenwerk.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN RECEPTOR PARA L-T₃ PRESENTE EN MEMBRANAS DE ESCHERICHIA COLI (Isolation and characterization of a L-T₃ receptor from Escherichia coli membranes). De Mendoza, D., Fernández, F.M. y Farias, R.N. Instituto de Química Biológica, Universidad Nacional de Tucumán - Chacabuco 461 y Fundación Miguel Lillo - Miguel Lillo 255, 4000 - Tucumán - ARGENTINA.

En una comunicación previa de nuestro laboratorio (de Mendoza y col., 1979; Fed.Proc. 38, 634) había sido descrito que L-T₃ (L-triiodotironina) era capaz de unirse específicamente a membranas de E.coli y que esta unión se correlacionaba con cambios en la cooperatividad de la (Ca²⁺) ATPasa producidos por la hormona.

La actividad de unión de L-T₃ se recupera en el sobrenadante de 100,000 xg de una preparación de membranas solubilizadas con dodecil sulfato de sodio al 0,05%. El receptor así solubilizado es estable por calentamiento a 100°C durante 10 min; precipita con sulfato de amonio al 50%, con acetona o por tratamiento con HCl 80 mM. No es inactivado por fosfolipasa A o C, pero sí es sensible al tratamiento con tripsina.

El receptor puede ser obtenido en la fase orgánica cuando se realiza una extracción con cloroformo/metanol 2:1 de las membranas.

Cuando se realizan electroforesis en poliacrilamida del solubilizado marcado con L-T₃¹²⁵I se observa que la hormona migra unida a una banda proteica.

Estos resultados son interpretados como que en la membrana de E.coli está presente una proteína de carácter hidrofóbico que es capaz de unirse específicamente a L-T₃.

The amino acid sequence of the cyanogen bromide Peptides α (III)CB 1,8,10,2 and α (III)CB9A of calf skin type III collagen. DEWES, H. and FIETZKE, I.P. - Depto. Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil and Dep. Biochemistry, Rutgers Medical School, Piscataway, New Jersey, USA.

The cyanogen bromide cleavage of calf skin type III collagen results in ten peptides. Their amino acid sequence was completely elucidated. Here we report on the elucidation of 2 of them. The peptide α (III)CB 1,8,10,2 is 180 amino acid residues long and occupies position 223-402 along the α (III) chain. In order to elucidate its amino acid sequence the peptide was fragmented with hydroxylamine, protease from *S.aureus* V8 and trypsin. Peptides necessary for sequence analysis with the automated Edman degradation were separated using molecular and ion exchange chromatography. Edman degradation of the hydroxylamine derived fragments resulted in the elucidation of 80% of the entire sequence. The rest was established by analysis of some protease V8 and trypsin derived peptides. The peptide α (III)CB 9A is 139 amino acid residues long and occupies positions 789-927 along the α (III) chain. Peptides necessary for the sequence analysis were obtained after fragmentations of α (III)CB 9A with trypsin, protease from *S.aureus* V8, hydroxylamine and chymotrypsin. They were separated mainly by chromatography on Sephadex G 50 and phosphocellulose and sequenced by automated Edman procedure.

EFEECTO DE ADENINA-NUCLEÓTIDOS SOBRE LA KETOGENESIS EN LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE HIGADO DE RATO. (The effect of adenine nucleotides upon the ketogenesis by the mitochondrial fraction of rat liver). Dick, T. y Sarlis, J.C. Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociencias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

In situation of ketogenesis, the excess of acetyl-CoA which is not used by the Krebs cycle, goes mainly to the synthesis of ketone bodies. It is usually accepted that the control of ketogenesis is related to the production of acetyl-CoA and its transformation by other nonketogenic pathways. The possibility of a direct control mechanism upon the ketogenic pathways remains open.

We examined in this connection a number of metabolites as possible effectors, of which, among others, adenine nucleotides showed a pronounced inhibition upon the overall synthesis of ketone bodies by the soluble mitochondrial fraction of albino rat liver, starting with acetyl-CoA as a substrate. The ketone bodies formed were measured by the method of Walker. The results were expressed as percentage of the decrease in specific activity of the whole ketogenic enzymatic system. AMP had no effect up to 2,0 mM. ADP showed the following decrease: 15% at 0,5 mM, 19% at 1,0 mM and 42% at 2,0 mM. With ATP: no variation at 0,5 mM, 14% at 1,0 mM and 27% at 2,0 mM.

As the combined concentration of ADP and ATP in the mitochondrion sums up to approximately 12 mM, the above described effect has to be taken in account in the interrelation of the control of ketogenesis in vivo.

COMPOSICIÓN LIPÍDICA CEREBRAL DE POLLOS NACIDOS DE HUEVOS FÉRTILES DE GALLINA TRATADOS EXTERNAMENTE CON FENOXIHIERBICIDAS (Lipidic cerebral composition of chickens hatched from hens' eggs applied with fenoxiherbicides) Duffard R.O. Mori G. y Evangelista de Duffard A.M. Fac. de Cs. Exac. Un. Nac. de Río Cuarto, Argentina.

El 2-4D (2-4 dicloro Fenoxiacético) es un fenoxiherbicida ampliamente utilizado en la agricultura. Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio, demostraron que la aplicación externa de 2-4D a altas concentraciones, sobre huevos fértiles, produce efectos teratológicos y embriotóxicos.

Se utilizaron concentraciones de 2-4D que no impiden la eclosión del huevo. Los cerebros de los animales nacidos son extraídos a las 24 hs, pesados, congelados y procesados, determinándose peso seco, agua, DNA, RNA, proteínas y lípidos totales.

Se observó aumento de DNA y RNA en cerebros tratados con respecto a controles, mientras que proteínas y lípidos totales disminuyeron proporcionalmente al aumentar las concentraciones del herbicida. Los fosfolípidos no mostraron variaciones en su concentración, mientras que colesterol, sulfátidos, cerebrósidos y gangliósidos presentan claras variaciones que dependen de la concentración del 2-4D aplicado.

Si consideramos estable el contenido de DNA por célula, estos resultados indicarían una alteración en el número de células nerviosas, y un retraso o detención en el proceso de diferenciación celular, como son la sinaptogénesis y mielinización.

MODULACIÓN ALOSTÉRICA DE LAS ISOENZIMAS DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA DE *E. coli* ESTUDIADA POR EL ABORDAJE "in situ". (Allosteric modulation of the isozymes of phosphofructokinase studied by the "in situ" approach).

Domenech, C. y Sols, A.- Instituto de Enzimología y Patología Molecular del CSIC., Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma. Madrid. España.

Dos isoenzimas de la fosfofructoquinasa (PFK) denominadas PFK₁ y PFK₂ han sido identificadas en *E. coli* (Fraenkel y col. JBC 248:4665, 1973). La primera de ellas es una enzima alostérica con respecto a F6P, PEP, ADP y quizá ATP, mientras que la PFK₂ ha sido considerada como no alostérica.

Ambas PFK se están estudiando en condiciones fisiológicas por el abordaje "in situ" (Reeves y Sols, BBRC 50:459, 1973). Para ello se están utilizando dos cepas de *E. coli*, DF 536 y DF 533 (Robinson y Fraenkel, BBRC, 31:358, 1978), las cuales contienen sólo PFK₁ y PFK₂ respectivamente.

Resultados preliminares indican que la PFK₂ es inhibida por ATP dentro del rango fisiológico, cuando se utilizan bajas concentraciones de F6P, lo cual da lugar a una cinética sigmoide con respecto a este sustrato. En contraste la PFK₁ no es inhibida por ATP. El amonio puede activar a la PFK₁ antagonizando la inhibición por PEP.

Se pretende completar la caracterización comparada de las posibilidades de modulación fisiológica de ambas enzimas y su significación "in vivo".

FOTOBIOQUÍMICA: ESTUDIOS MECANÍSTICOS DE "TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS BIOENERGIZADOS A t-RNA (Photobiochemistry: Mechanistic Studies of energy transfer from bioenergized carbonyl compounds to t-RNA) Durán, N., De Mello, M.P., De Toledo, S.M., Haun, M., Faljoni, A. y Cilento, G. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas y Universidade de São Paulo, Brasil.

Durante la oxidación aeróbica del 2-metilpropanal catalizada por peroxidasa en presencia de ácidos nucleicos, algunos enlaces se tornan sensibles a un medio alcalino. La especie responsable por estas modificaciones es el carbonilo excitado en su estado triplete.

t-RNA fue utilizado para los estudios de mecanismo de transferencia porque posee bases modificadas capaces de emitir, siendo para *E. coli* la 4-tiouridina y para levadura la base Y.

El mecanismo probable para esta transferencia sería:



fundamentado en los resultados comparativos cuando D no posee carácter n, π (acetona triplete) o carácter, π, π (indol-3-carboxaldehído)

Valores de K_{SV}^{indol} y K_{ET}^{indol} serán discutidos.

Financiamiento de FINEP, FAPESP, CNPq (Brasil).

INFLUENCIA DE BENZODIAZEPINAS EN LA ACTIVIDAD DE UDP GLUCURONILTRANSFERASA. (Influence of benzodiazepines on UDP-glucuronyltransferase activity). Echeverría, F. García, O., del Villar, E., Letelier, M. y Sánchez, E. Departamentos de Bioquímica y Farmacología, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

La cromatografía en DEAE-celulosa de microsomas hepáticos solubilizados revela distintas UDP-glucuroniltransferasas (UDPGT) para la formación de morfina (M) y p-nitrofenilglucuronidos (PNP) (del Villar, E., Sánchez, E., Autor, A., Tephly, T. Mol. Pharmacol. 11:236, 1975).

En microsomas hepáticos y en experimentos *in vivo* se estudió el efecto de 2 compuestos no sustratos de UDPGT, Diazepam, (D) y N-desmetil diazepam (N) que difieren en la presencia de un grupo N-CH₃, en la glucuronización de morfina y p-nitrofenol y en los niveles hepáticos de citocromo P-450 y RNA total en ratas.

En cinética de doble sustrato, D inhibió competitivamente la formación de morfina glucuronido *in vitro* con una Ki de 0,25 mM, mientras que N no tuvo efecto. Estas sustancias no inhibieron la glucuronización de PNP ni de testosterona *in vitro*. *In vivo*, solamente D inhibió la formación de morfina glucuronato en forma dependiente de la dosis. D ni N alteraron los niveles de citocromo P-450 ni de RNA total en el hígado de ratas.

Los resultados confirman la presencia de distintas UDPGTs hepáticas y muestran el grupo N-CH₃ es responsable de la interacción de fármacos con la UDPGT de morfina y opioides, posiblemente por su mayor afinidad por un sitio activo de la enzima, el cual no está presente en la UDPGT para p-nitrofenol o de otros sustratos.

ESTUDIOS SOBRE UN INHIBIDOR DE LA ELONGACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS PRESENTE EN OOCITOS DE X. LAEVIS (Studies on a protein synthesis inhibitor from X. laevis oocytes) Errázuriz, R. y Allende, J. E.; Dpto. Bioquímica, Fac. de Medicina (Norte) Universidad de Chile.

Los estudios realizados por varios laboratorios en oocitos de erizos de mar y de anfibios han demostrado que la síntesis de proteínas en estas células está bajo un control post-transcripcional. Estudiando este fenómeno se ha logrado detectar la existencia de un poderoso inhibidor de la elongación de la síntesis proteica en la fracción sobrenadante de extractos de ovario de Xenopus laevis. Los estudios se han realizado utilizando un sistema que sintetiza (¹⁴C)polifenilalanina a partir de (¹⁴C)phe-tRNA dirigido por poli U empleando ribosomas de oocitos de X. laevis y fracción sobrenadante de germen de trigo. Los resultados obtenidos indican que el inhibidor de elongación (IE) se encuentra, además de en el sobrenadante de 150000 xg en el lavado de ribosomas extraídos con 0,5 M NH₄Cl. IE es una proteína termolábil sensible a proteasas y a N-etilmaleimida y con un peso molecular aproximado de 380.000. La inhibición causada por IE es muy sensible al pH del medio disminuyendo drásticamente a pHs sobre 7,5. Ensayos de varias etapas parciales de la elongación indican que IE actuaría a nivel de la peptidil transferasa que se encuentra formando parte del ribosoma. Coincidente con esta observación se ha determinado que la inhibición causada por IE puede ser totalmente revertida al agregar un exceso de ribosomas. IE inhibe la elongación en un sistema de síntesis de proteínas de polisomas aislados de hígado de rata y a sistemas de germen de trigo y E. coli. Otros tejidos de la rana como ser corazón, hígado o músculo esquelético no contienen IE. Auspicio: OEA, U. de Chile, PNUD/Unesco, RLA 78/024 y Fund. Ford.

ESTUDIOS SOBRE LAS FOSFODIESTERASAS DE NUCLEOTIDOS CICLICOS DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Studies on cyclic nucleotide phosphodiesterases on X. laevis oocytes) Echeverría, M., Orellana, O., Plaza, M., Connelly, C., & Allende, J. E. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina (Norte) y Dpto. Biología, Fac. de Ciencias, Universidad de Chile. Evidencias obtenidas en varios laboratorios sugieren que los niveles intracelulares de los nucleótidos cíclicos estarían involucrados en la maduración meiótica de oocitos de anfibios inducida por hormonas. Es de interés por lo tanto estudiar las fosfodiesterasas de cAMP y cGMP durante este proceso. Las enzimas fueron ensayadas por el método de Thompson et al. utilizando (³H)cAMP y (³H)cGMP. Cromatografía en columnas de DEAE-celulosa de un sobrenadante de 20000 x g de extractos de oocitos resuelve las actividades hidrolíticas en varias fracciones. La fosfodiesterasa de cAMP presenta dos fracciones mayoritarias que se diferencian en su respuesta a la calmodulina. La fracción que eluye a menor fuerza iónica es activada por esta proteína mientras que el segundo pico de actividad no es afectado. Las dos fracciones mayoritarias de la fosfodiesterasa de cGMP son activadas entre 8 y 10 veces por la calmodulina. Experimentos realizados *in vivo* con la fosfodiesterasa de cAMP indican que esta enzima presenta la misma actividad total y constante cinética que la enzima ensayada *in vitro*. No se han detectado cambios significativos en la fosfodiesterasa de cAMP después de tratamiento hormonal. En cambio con la fosfodiesterasa de cGMP, la actividad *in vivo* es mucho menor que la determinada *in vitro* y existen indicaciones preliminares de un aumento de la actividad de esta enzima después del tratamiento hormonal de los oocitos. Auspiciado por: U. de Chile, O.E.A., PNUD/Unesco proyecto RLA 78/024 y Fundación Ford.

SINTESIS DE ACTINA EN EMBRIONES PREIMPLANTACIONALES DE RATON. = Actin synthesis in preimplantational mouse embryo. - Escobedo J., González R. - Laboratorio de Biología Celular. Instituto de Biología. Universidad Católica de Valparaíso. -

La diferenciación celular origina tipos celulares diferentes. Los mecanismos moleculares que median este fenómeno se desconocen y un análisis de la transcripción y traducción es básico para comprender como ocurre. Sin embargo debido a la diversidad de proteínas sintetizadas resulta difícil estudiar a cada una de ellas en detalle.

Hemos escogido a la actina ya que es particularmente abundante en muchos tipos celulares y participa en fenómenos de generación de fuerza y mantenimiento de la forma celular.

Para caracterizarla hemos adoptado los siguientes criterios: 1.- Interacción con meromiosina pesada. 2.- Afinidad cromatográfica en columnas sefarsosa 4B-DNasa I. 3.- Inhibición de la actividad de la DNasa I. 4.- Caracterización electroforética en geles de poliacrilamida. Además hemos diseñado un sistema que permite medir niveles de síntesis de proteínas utilizando un reducido número de embriones.

Nuestros resultados muestran filamentos de actina bajo la membrana plasmática. También hemos inhibido la actividad de la DNasa I en presencia de un extracto de blastocistos.

La cantidad de actina sintetizada por óvulos es de 10.7 pgr/ovo/hr.; estado de 2-células 39.2 pg/emb/h y para blastocisto 111.9 pgr/emb/hr. La tasa relativa de síntesis de actina es del 6.5% y se mantiene constante durante todos los estados estudiados.

EL GLUTATION HEPATICO EN LA INTOXICACION AGUDA POR ETANOL. (Liver glutathione in acute ethanol intoxication).

Faccin, A., Donoso, E., Videla, L., Fernández, V. y Sapag-Hagar, M. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas y Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile.

El glutathion reducido hepático (GSH) disminuye en ratas intoxicadas con alcohol. Anteriormente habíamos descrito un fenómeno similar, junto con un aumento de la cisteína, al administrar glucagón o AMP cíclico. Hemos estudiado la posible relación entre ambas observaciones.

Ratas machos, ayunadas por 15 horas, fueron intubadas con 1-5 g de etanol/kg de peso y luego sacrificadas a las 2, 4 y 6 horas. Los controles se realizaron intubando con una cantidad isocalórica de glucosa o con NaCl al 0,9%. El GSH se determinó con reactivo de Ellman, la cisteína con reactivo ácido de ninhidrina, el AMP cíclico por desplazamiento radioisotópico, la γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) con L- γ -glutamyl-p-nitroanilida y la glutathion reductasa (GR) con NADPH a 340 nm.

Los resultados muestran que la disminución del GSH es máxima a las 6 hrs. y dependiente de la dosis de etanol. Este cambio no va acompañado de variaciones en la cisteína ni del AMP Cíclico, así como tampoco en la GGT y GR.

Esto sugiere que el descenso del GSH en la intoxicación alcohólica aguda es independiente del observado con glucagón y AMP cíclico.

INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACION DE ADP Y DEL TRANSPORTE DE Ca^{+2} POR BENZOTIADIAZOLES EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATA (Inhibition of ADP phosphorylation and Ca^{+2} transport by benzothiadiazoles in rat liver mitochondria). Ferreira, J. y Gil, D.L. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La fosforilación de ADP a ATP va acompañada por un aumento en el consumo de oxígeno y en la captación de H^+ del medio. Ambos procesos fueron inhibidos por diferentes benzotiadiazoles cuando los sustratos oxidados fueron glutamato y malato piruvato pero no fueron afectados durante la oxidación de succinato. Las mitocondrias acumulan Ca^{+2} del medio en un proceso dependiente de Energía, que ocurre con un aumento en el consumo de oxígeno y en la liberación de H^+ . Ambos procesos fueron inhibidos por benzotiadiazoles cuando la energía fue proporcionada por la oxidación de sustratos que entran a nivel de NAD y fueron muy poco afectados durante la oxidación de succinato. Diversas evidencias sugieren que los benzotiadiazoles actúan inhibiendo el transporte de electrones a nivel del sitio I en el lado del oxígeno de la NADH deshidrogenasa. Estudios de estructura actividad por el método de Free y Wilson para la inhibición duroquinona reductasa por 26 derivados del benzotiadiazol indican que la mayor contribución a la actividad inhibitoria está dada por la presencia de grupos nitro y bromo en posición, nitro y amino en posición 6 y cloro y amino en posición 7.

Financiado por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional. Proyecto N°B 535-791

AI SLACION Y FOTO-OXIDACION DE PEPTIDOS DE LISOZIMA. (Isolation and photo-oxidation of lysozyme fragments). Ferrer, J. y Silva, E. Dpto. Macromoléculas, Instituto de Ciencias Químicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Se plantea una estrategia para obtener péptidos a partir de lisozima, y de esta manera poder aclarar más adelante el lugar de unión fotoinducida de riboflavina a lisozima. La reducción de los cuatro puentes disulfuro y posterior carboximetilación seguida de la acción con BrCN, trae consigo la obtención de los péptidos L-I (aa 1-12) y L-II-III (aa 13-129). En cambio cuando se procede primeramente a la ruptura de la cadena polipeptídica mediante la acción del BrCN y posteriormente se liberan los péptidos formados mediante la reducción de los puentes -S-S- seguida de una carboximetilación, se obtienen tres péptidos correspondientes a L-I (aa 1-12), L-II (aa 13-105) y L-III (aa 106-129). Los péptidos L-II-III, L-II y L-III fueron sometidos en forma separada a foto-oxidación en presencia de riboflavina, en buffer fosfato 0.05M, pH 7.0. El péptido L-II-III muestra foto-oxidación a nivel de His, pero en una extensión menor a la que se produce en la proteína nativa. Además de His, los tres residuos de Tyr presentes en L-II-III sufren una fuerte foto-oxidación. En el caso del péptido L-II, este no muestra foto-oxidación de His, pero sí una marcada destrucción de los residuos de Tyr a medida que aumenta el tiempo de irradiación. Los resultados obtenidos estarían indicando que existe una relación entre la extensión y tipo del residuo foto-oxidable con la ubicación del aminoácido en la configuración espacial.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF *Pipa pipae* HAEMOGLOBINS. Focesi, A.Jr., Meirelles, N.C., Vieira, M.L.C., Vieira, H.F. - Dep'to Bioquim., IB, UNICAMP and UFC. - Brazil.

Pipa pipae an amphibian that lives in north of Brazil has aquatic habitat even after metamorphosis. The similarity between *P. pipae* and *Pipa carvalhoi* is interesting in standpoint of the habitat and led us to study the functional properties of the its hemoglobins to compare with those of *P. carvalhoi* described.

P. pipae hemoglobins after stripped off the ions and organic phosphate were separated in four components by chromatography CM-cellulose, where the major component eluted at pH 7.2 when analysed by electrophoresis revealed the presence of three bands benzidine sensitive. The equilibrium curves of *P. pipae* hemoglobin as a function of pH shows a Bohr effect near zero in absence of ATP. The degree of cooperativity was $n = 1.5$ and remains the same at different pH. The affinity constant to oxygen, at pH 7.2 was $\log P_{50} = -0.34$ in absence of ATP, and in its presence -0.94 , showing a pronounced effect of the effector.

The data suggest a similarity between these findings and those of *P. carvalhoi* hemoglobins and reinforce the idea that the aquatic habitat of those amphibians responsible for the larval properties of its hemoglobins.

Supported by FAPESP, CAPES.

RELACION ENTRE ANGIOTENSINA II y POTASIO EN LA BIOSINTESIS DE ALDOSTERONA. (Interaction of potassium ions and AII on aldosterone biosynthesis). Foster, R., M.V.Lobo y E.T.Marusic. Depto. Fisiología. Univ. de Chile.

Diversos autores postulan la participación del ion potasio en la acción esteroidogénica de la angiotensina II(AII) en la glándula adrenal. En el presente trabajo se estudió la posibilidad de que la AII estimule el influjo de K. Los estudios fueron realizados en cortes de glomerulosa de adrenal de perro. Se midió en forma paralela la producción de aldosterona y el transporte activo y neto de K bajo la acción de la AII. Se midió la actividad de la Na,K-ATPasa en ambas condiciones. Una concentración de AII capaz de producir un significativo aumento en la esteroidogenesis (Cont.=100±12 y AII=250±16 ng/100mg/tej./hr) no produjo cambios significativos en el transporte activo de ^{86}Rb : Cont.=4.9±.3nmol Rb/mg tej./min(NS). Tampoco se observaron cambios en el K intracelular bajo la acción de AII. Estos resultados fueron confirmados al medir la Na,K-ATPasa; Cont.=5.9±.41, AII=5.2±.54umol Pi/mg/h. Sin embargo, 10^{-4}M de ouabaina bloquea totalmente el estímulo de AII. También fue inhibido el estímulo de dBcAMP sugiriendo un efecto inespecífico. Estos resultados descartan la posibilidad de que el mecanismo de acción de la AII estaría relacionado con el influjo de K en la célula de glomerulosa. (Grants UNDP/UNESCO N°16/79 y Univ. Chile N°B161-794.

REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE cAMP FOSFODIESTERASA DE HJGOR ROUKII POR FOSFORILACION Y DESFOSFORILACION. (Regulation of cAMP phosphodiesterase activity from *Hjgor roukii* by phosphorylation and dephosphorylation) Galvagno, L.A., Moreno, S. y Passeron, S. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Las variaciones de los niveles de cAMP son muy importantes en la determinación de la morfología del hongo. La cAMP fosfodiesterasa (PDE) es una de las enzimas que controlan dichos niveles; por ello se estudiaron los posibles modos de regulación de la enzima.

Se trabajó con la fracción de sulfato de amonio que precipita entre 0-55%, obtenida de un extracto soluble de la forma miceliana. La actividad de PDE se midió por la producción de adenosina ^3H .

Se observa que la enzima se activa de 1.5 a 2 veces por incubación con ATP, Mg^{2+} y cAMP, en una reacción dependiente del tiempo y la temperatura. La PDE permanece activada luego de filtración por Sephadex G-25 y cromatografía en columna de DEAE-celulosa. La desactivación de la enzima se logra por incubación de la fracción enzimática a 30° en presencia de Mg^{2+} 5mM. La enzima desactivada se reactiva sometiendo la preparación enzimática a condiciones fosforilantes.

Estos resultados son consistentes con un esquema de regulación de la actividad de cAMP fosfodiesterasa por un mecanismo de fosforilación-desfosforilación.

ACTIVACION DE RIBONUCLEASA EN CORTES DE TUBERCULO DE PAPA. (Activation of Ribonuclease in potato tuber slices). Franzoni, L., e Isola, M.C. Departamento de Biología Molecular. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Rep. Argentina.

Los tejidos de órganos vegetales de reserva en reposo, pueden ser activados cortándolos en discos delgados e incubando estos fragmentos en atmósfera húmeda por distintos períodos. El corte produce activación de varios caminos metabólicos. Es nuestro propósito estudiar el comportamiento de las enzimas que degradan ácidos nucleicos en el sistema descrito. Cortes de tubérculo de papa muestran un gran aumento en la actividad de ribonucleasa, con un máximo en alrededor de 16 horas de incubación. Con el propósito de separar e identificar la enzima (o enzimas) responsable, se someten los extractos a electroforesis en gel de poliacrilamida aniónica. Se detectan varias bandas de actividad, de las cuales sólo una muestra gran cambio por incubación de los cortes. La enzima correspondiente, parcialmente purificada, es una ribonucleasa aparentemente soluble, con un pH óptimo cercano a 5. Los discos poseen además, actividad de DNAasa y fosfodiesterasa. Estas actividades, que sufren poco cambio durante la incubación de los cortes, también son localizadas en el gel.

GROWTH FACTORS IN MAMMALIAN CELL CULTURES. Gambarini, A.G. and Armelin, H.A. Departamento de Bioquímica, Universidade de Sao Paulo, Brasil.

Pituitary is probably involved in the production of a fibroblast growth factor (Armelin, H.A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:2702, 1973). FGF, a basic polypeptide has been purified to homogeneity from bovine pituitaries and is mitogenic for different cell lines (Gospodarowicz D.-J. Biol. Chem. 250:2515, 1975). Other active polypeptides seem to be present in the pituitary extracts (Armelin, M.C.S.; Gambarini, A.G. and Armelin, H.A.-J. Cell Physiol. 93:1, 1977). We describe here the partial characterization of these factors. Partial purification involved bovine pituitaries homogenization in ammonium sulphate; separation of acidic and basic components in a CM-Sephadex column and isoelectric focusing. Activity was measured by ^3H -thymidine uptake into DNA of 3T3 fibroblasts and AR-1 adrenal cells. Proteins of different pIs were fractionated. They showed similar stimulatory activity for both 3T3 and AR-1. An acidic fraction (pI 4.9-5.1) is active at 10 ng/ml, which showed a major component of 13,500 MW. A basic fraction (pI 8.3) showed two major components of 15,500 and 18,000 MW. This basic fraction induces cell rounding up 24 hours after its addition, while the acidic fraction does not. These observations suggest different mechanisms of action for the two groups of factors.

Supported by FAPESP.

ROL DEL FOSFORIBOSILPIROFOSFATO EN LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS HUMANOS (Role of phosphoribosylpyrophosphate in the activation of human lymphocytes). García, R.C., Leoni, P. y Allison, A.C. Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Buenos Aires, Argentina.

El fosforibosilpirofosfato (PRibPP) es un precursor común de nucleótidos purínicos y pirimidínicos cuya concentración es de importancia en la regulación de su biosíntesis de novo y en el camino alternativo de utilización de las bases.

Se encaró el estudio de la formación de PRibPP a partir de ATP y Ribosa 5-P, utilizando preparaciones enzimáticas de células estimuladas por fitohemoaglutinina. El dosaje de la enzima se realiza a través de un acoplamiento: el PRibPP formado reacciona con ^{14}C -Hipoxantina para dar ^{14}C -IMP, que se aísla por electroforesis de alto voltaje.

La actividad específica de la PRibPP sintetasa aumenta con el tiempo de cultivo a partir recién del comienzo de la síntesis de DNA. La enzima parcialmente purificada es inhibida por AMP y ADP y activada por P_i , IMP y GMP. No se detectó efecto de Adenosina, Inosina, cAMP ni cGMP. El Ca^{++} activó la sintetasa, lo que permite relacionar activación y formación de PRibPP, ya que se sabe que los mitógenos producen un incremento en el influjo de Ca^{++} . La inhibición por AMP y ADP proveería un medio de disminuir la síntesis de novo y la activación por IMP podría servir como mecanismo de amplificación.

ESTRUCTURA Y BIOGENESIS DE LA CITOCROMO c OXIDASA DE LEVADURA. (Structure and biogenesis of yeast cytochrome c oxidase). Carlos G. Nascimento y Robert O. Poyton. Dep. of Microbiology University of Connecticut-Farmington, Connecticut 06032, U.S.A.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que las cuatro subunidades (IV-VII) de origen citoplasmático de la citocromo c oxidasa de levadura son sintetizadas como un solo péptido (P.M. 55.000) que es procesado por enzima(s) proteolíticas después de haber formado parte integral de la membrana mitocondrial. Estos experimentos sugieren que este precursor es transportado desde el citoplasma a la mitocondria una vez completada su traducción total en los ribosomas citoplasmáticos. Se ha determinado que este péptido precursor de las subunidades IV-VII es capaz de estimular la síntesis de los tres (I,II,III) polipeptidos sintetizados en ribosomas mitocondriales. Estas observaciones proporcionan los elementos para establecer un modelo de trabajo donde se puede estudiar la interacción de los sistemas genéticos nucleares y mitocondriales en la formación de uno de los complejos respiratorios de la membrana interior de la mitocondria.

SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS SECRETORAS DE HCl. Proteínas del citoesqueleto. González Plaza R., Escobedo J., Garrido J., Vial J. Departamento de Biología Celular. Universidad Católica de Santiago. Chile.

La secreción de HCl implica cambios de forma celular de gran magnitud. Esto significa la reorganización del polo secretor. Se ha demostrado la asociación de actina con la membrana plásmática del polo secretor lo cual puede indicar la participación de otras proteínas del citoesqueleto en este fenómeno. Por esta razón estamos analizando la situación de algunas proteínas del citoesqueleto en células secretoras de HCl. Hemos marcado con aminoácidos radioactivos las proteínas sintetizadas por células aisladas mantenidas en medio de cultivo.

$1.8 \cdot 10^7$ células; $6.0 \cdot 10^5$ células por cc., fueron incubadas con 321 microcuries de metionina ^{35}S 1200 Curies por mmol. Luego de cuatro horas, las células fueron recogidas y se fraccionaron en 200 microlitros de TRIS 0.025 M, pH 6.8, y PMSF 1 mM. El sobrenadante obtenido fue tratado con anticuerpos anti-tubulina, anti-miosina y anti alfa actinina. Los inmunoprecipitados fueron recogidos con ayuda de una preparación de *Staphylococcus aureus* Cowen I. El ensayo de la radioactividad asociada con el complejo indica que proteínas similares a la miosina, tubulina y alfa actinina existen en estas células.

PURIFICACION DE NUCLEOSOMAS DE ESPERMATOZOIDES DEL ERIZO DE MAR *Tetrapygus niger*. (Isolation of nucleosomes from sea urchin *Tetrapygus niger* sperm). Guevara, L., Lizárraga, B. y Melgar, E. Centro de Investigación Instituto de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

Se ha logrado purificar nucleosomas de espermatozoides del erizo *T. niger*, desprovistos de histona H1 y que aparecen como una banda única de DNA, de aproximadamente 140 a 150 pares de bases, en electroforesis en gel de poliacrilamida.

El procedimiento empleado es una modificación del descrito por Lutter (J.Mol.Biol. 124, 391 (1978)) y se ha obtenido un rendimiento de 35-44% de cromatina soluble, por tratamiento in situ de las cabezas de espermatozoide con nucleasa micrococcal. Por filtración en Sepharosa 4B en presencia de NaCl 0.8 M se aisló una cromatina soluble de alto peso molecular libre de histona H1. Esta cromatina, al ser nuevamente hidrolizada con nucleasa de micrococcus, resulta en una preparación que contiene aproximadamente el 20% de la absorción a 260 nm como nucleosomas. Los nucleosomas así obtenidos presentaron en gel de poliacrilamida las bandas características de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.

(Trabajo realizado con fondos de la OEA).

INIBICION DE TROMBINA POR SULFATO DE DEXTRANA. (Inhibition of thrombin by Dextran Sulfate). Guimaraes, J.A.* and Carlini Celia R.**- Dept. Biochemistry, Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo, S.P., Brasil.

Dextran sulfate (DS) added to normal human plasma elicited three typical effects: a) activation of plasma kallikrein (HPK) at $3 \times 10^{-9} M$, b) clot formation at $1.5 \times 10^{-5} M$ and c) anticoagulant activity at $2 \times 10^{-9} M$. In all cases, the efficiency of DS was related to its molecular weight; the above data were obtained with a 500,000 Mr species but smaller polymers were also active. In comparison, heparin, another sulfated carbohydrate polymer, did not induce clot formation and was 10- and 10,000-fold less efficient as anticoagulant and as HPK activator, respectively. In presence of plasma DS inhibited both the coagulant and amidolytic action of thrombin on N-benzoyl-LPhe-L-Val-L-Arg-p-nitroanilide. Contrariwise, the thrombin activity on plasma without antithrombin-III (AT-III) was not inhibited either by DS or heparin, suggesting that their anticlotting action might be through mediation of AT-III activity. These results suggest that 1) degree of sulfation and critical size of the polymers are essential for discrimination of their effects and 2) DS inhibits thrombin through mediation of AT-III activity. Work subsidized by FINEP and CNPq; Research Fellowships from CNPq (*) and FAPESP (**).

INACTIVACION DE GLUCOQUINASA POR 5,5'-DITIOBIS (2-NITROBENZOATO). DISOCIACION ENTRE ACTIVIDAD CATALITICA Y SUSCEPTIBILIDAD AL REACTIVO. (Inactivation of glucokinase with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). Dissociation between enzyme activity and susceptibility to the reagent. Heberlein, U., Monasterio, O. y Niemeyer, H. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La glucoquinasa (GK) es estabilizada por DTT y se inactiva con modificadores de tioles. Se estudió el papel de los grupos SH en la actividad de la GK de hígado de rata a través del tratamiento con 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato) (DTNB), a concentración $2 \times 10^{-3} mM$, pH 8, 30°C.

La cinética de inactivación fue multifásica y cada fase de pseudoprimer orden. Los sustratos glucosa (100 mM) y Mg-ATP (5 mM) y el producto Mg-ADP (5 mM) protegieron de la inactivación en 96, 22 y 68%, respectivamente; glucosa-6-fosfato 100 mM no tuvo efecto.

La susceptibilidad de la GK al DTNB se perdió durante el almacenamiento y precedió por varias semanas a la inactivación de la enzima. Ambas propiedades se recuperaron parcialmente y en forma lenta (100 min) con DTT 10 mM.

Se presentará un modelo basado en cambios conformacionales de la GK que explica los resultados obtenidos.

AISLACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENO DE PIEL DE SERPIENTE. (Isolation and characterization of snake skin collagen). Guma, F.C. R. y Dick, Y.P. - Deptos. de Bioquímica y de Físico-Química, UFRGS, P. Alegre, Brasil.

Native adult snake skin collagen ("Boa Constrictor constrictor") was extracted by limited pepsin digestion, at 18°C, pH 2 and purified by repeated precipitation with 3 M KCl-0,1M Na₂HPO₄. The pure protein, kept at 0°C in 0,1M² acetic acid, was identified as type I collagen by SDS-polyacrylamide electrophoresis, amino acid analysis and observation at the electron microscope of fibrils and SLS aggregates. A large content of polymeric molecules was detected, what is unusual among reptile collagens.

Fragments from BrCN cleavage of α -chains were compared with those of other vertebrate collagens.

Separation of α , β and γ components was achieved by Agarose-5m column chromatography. Complete isolation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ -chains was attained by CM-cellulose chromatography of α -components previously fractionated by Agarose chromatography. A proportion of 2:1 between the amounts of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains confirmed the presence of only type I collagen in the skins investigated.

ESTUDIO DE LA INACTIVACION DE LA CALICREINA PLASMÁTICA HUMANA. Henriques, O. B.- Departamento de Bioquímica Inmunología, Universidade Federal de Minas Gerais.

En trabajo anterior se ha observado que cuando la calicreína humana es activada en el plasma por adsorción en superficie electronegativa y en seguida es mantenida en contacto con el plasma sobrenadante bajo ligera agitación, la calicreína pierde 90% de su actividad cininogénica. Esto nos llevó a aislar del plasma sobrenadante, la sustancia responsable por esta inactivación. Se purificó la sustancia por cromatografía en DEAE-celulosa y filtración en gel. Su actividad se determinó incubándola con calicreína plasmática purificada y midiendo la capacidad de esta última de liberar cinina de su sustrato plasmático. Se procuró diferenciar esta sustancia de los inhibidores plasmáticos de la calicreína ya conocidos, como la $\alpha 2$ -macroglobulina y el inhibidor de C₂-esterase y la $\alpha 2$ -antitripsina.

En comparación con el inhibidor de C₁-esterase observamos que mientras que este inhibidor inactiva igualmente las actividades esterásica y cininogénica de la calicreína plasmática, nuestra sustancia no logra inhibir más que 50% de la actividad de la calicreína, inhibiendo completamente su actividad cininogénica. Tampoco se puede tratar de la $\alpha 2$ -macroglobulina pues nuestro inactivador no tiene el comportamiento electroforético correspondiente al de aquella globulina.

En condiciones idénticas de incubación, en comparación con la inhibición de la calicreína plasmática, el inactivador se mostró 10 veces menos activo sobre la calicreína salival e inactivo sobre la tripsina, cuando se medían sus actividades cininogénicas. Esta última observación lo diferencia también de la $\alpha 2$ -antitripsina pues este inhibidor reacciona rápidamente con la tripsina.

SISTEMA ACELULAR DE INICIACION DE SINTESIS DE PROTEINAS EN LEVADURA (Cell free system that initiate yeast protein synthesis).
 Herrera de Sánchez, F.- Departamento de Ciencias Funcionales, Universidad de Carabobo, Núcleo Aragua, Maracay, Venezuela.

Se desarrolló un sistema acelular de levadura que es capaz de iniciar síntesis de proteínas. Las levaduras se crecen aeróbicamente a 20°C hasta una densidad de 1.0-1.2 unidades a 660 nm. Después de tratarlas con glucosilasa se obtienen esferoplastos que posteriormente se lisan. Seguidamente se obtiene un sobrenadante libre de polisomas, el cual representa una preparación modificada de S-100, se pasa por una columna de Sephadex G-25 y se colectan las fracciones que absorben a 260 nm, congelándolas luego en nitrógeno líquido.

El ensayo para la determinación de la síntesis de proteínas consta de dos partes: La primera sirve para eliminar el mensajero endógeno con la nucleasa *Micrococcal* la cual necesita Ca^{++} para su activación; la segunda mide la incorporación de amino ácidos en proteínas en la presencia de mensajero exógeno.

El sistema es inhibido por 7 Metil GMP y edeina, inhibidores específicos de la iniciación, siendo la inhibición a nivel del complejo de iniciación.

AI SLAMI EN TO Y CARACTERIZACION DEL SITIO DE UNION DE AMP EN FRUCTOSA 1,6 BIFOSFATASA. (Isolation and characterization of fructose 1,6 - biphosphatase AMP binding site). Hubert, E., Maccioni, R. y Slebe, J.C.- Instituto de Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

En un intento por estudiar la interacción entre fructosa 1,6 bifosfatasa (FDPasa) y su inhibidor alostérico AMP, comunicamos que era posible introducir en forma selectiva y covalente el 2',3' dialdehído AMP tritiado (AMP_{ox}) en el sitio regulatorio de la enzima. En estas condiciones se incorporan 2 moles de AMP_{ox}/mol de enzima. El derivado enzima-AMP_{ox} presentó una disminución en su afinidad por AMP y en la interacción entre las subunidades.

Estos resultados nos han permitido utilizar AMP_{ox} como marcador de afinidad para localizar el sitio alostérico de la enzima. Con este objeto, el derivado FDPasa-AMP_{ox} es hidrolizado por tripsina y los péptidos obtenidos se separan en Sephadex G-25. La fracción que contiene la radioactividad se analiza en geles de poli-acrilamida-urea-SDS y muestra la presencia de 3 péptidos, 2 de los cuales presentan radioactividad. Se logra una completa separación de los péptidos mediante una cromatografía en SP-Sephadex. Un análisis en geles de poli-acrilamida revela una sola banda para cada una de las fracciones que contienen los péptidos radioactivos. Se están realizando estudios para una mayor caracterización de estos péptidos.

(Financiado por Dirección de Investigación, U. Austral de Chile. Proyecto S-79-9).

CARACTERIZACION DE LA OXIDASA PEROXISOMAL DE ACIDOS GRASOS (OAG). (Characterization of Peroxisomal Fatty Acid Oxidase (FAO)). Inestrosa, N.C. y Leighton, F. Laboratorio de Citología Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile.

Los peroxisomas de hígado de rata 8-oxidán ácidos grasos, en un proceso caracterizado por la generación de H₂O₂. La enzima responsable de esta generación, parece ser clave para entender el control del Sistema Peroxisomal de Oxidación de Ácidos Grasos (SPOAG), y de ello, el rol de peroxisomas en el metabolismo de ácidos grasos.

OAG se detectó midiendo consumo de O₂ polarográficamente, o titulando el H₂O₂ generado mediante peroxidación de metanol.

Los resultados obtenidos indican que: OAG es reactivada por FAD, pero no por FMN ni riboflavina. OAG purificada (600 veces) de hígado de rata presenta, después de la última etapa de purificación (Sephacrose-FAO) 3 bandas en electroforesis en geles de poli-acrilamida-SDS-mercaptoetanol. Los parámetros físicos de OAG indican que se trata de una proteína globular (f/fo=1,1), con un peso molecular de 136.000. OAG cataliza la oxidación de ácidos grasos de cadena media y larga. Su actividad es similar a SPOAG, sugiriendo que OAG es la enzima limitante del sistema. La actividad hepática de OAG depende de la presencia y tipo de los lípidos de la dieta y de la presencia de riboflavina. Además, es inducida por drogas hipolipidémicas.

Financiado por proyectos DIUC 50/79 y 308/79.

FORMACION DE MICELAS DE ACILCARNITINAS EN GLICEROL. (Formation of Micelles of Acylcarnitines in Glycerol). Ionescu, L. G.- Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, S. C. 88000 BRASIL

Como parte de nuestro estudio de procesos de micelización, hemos determinado por medio de tensiometría que los cloruros de acilcarnitinas forman micelas en agua y en solventes poliprotónicos como glicerol, etilenglicol; 1,3-propanodiol y 1,4-butanodiol. El efecto del aumento de grupos metilénicos en la cadena alquílica sobre la formación de micelas en glicerol fue estudiado desde 2 hasta 16 átomos de carbono, midiendo la concentración micelar crítica (CMC) por espectroscopía diferencial usando fenol como indicador de la formación de micelas. Los cloruros de acilcarnitinas con cadenas menores que ocho átomos de carbono no forman micelas en glicerol. La CMC varía de 0,060 M para el cloruro de n-octilcarnitina hasta 0,011 M para el cloruro de n-palmitilcarnitina. La energía libre de micelización, ΔG_{mic} , varía linealmente en el rango de -1,66 kcal/mol (8C) hasta -2,67 kcal/mol (16 C). El efecto "hidrofóbico" o "solvofóbico" para un grupo metilénico es de 0,18 kcal/mol en glicerol en comparación con 0,69 kcal/mol en agua y 0,17 kcal/mol en etilenglicol. La formación de micelas de acilcarnitinas en glicerol es muy importante de el punto de vista del metabolismo de los ácidos grasos y su transporte a través de membranas.

SITIOS DE REGULACION EN LA BIOSINTESIS DE COLESTEROL.
(Regulatory sites in the biosynthesis of cholesterol).
Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. Departamento Medicina Experimental, Fac. Med. Oriente, y Unidad de Bioquímica, Fac. Med. Occidente, Universidad de Chile.

La regulación de la biosíntesis de colesterol se realiza principalmente en la 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa. Se han postulado sitios secundarios de regulación, uno de ellos en la descarboxilasa pirofosfomevalónica. Hemos estudiado esta enzima en hígado de rata en diversas condiciones.

Se alimentaron ratas machos adultas por 6 días con dieta conteniendo 2% colesterol o 3% colestiramina. Se comparó la actividad de la descarboxilasa con un grupo control. Se determinó también la actividad enzimática a distintas horas del día. El ensayo consistió en medir incorporación de radioactividad de $[2-^{14}C]$ - pirofosfo mevalonato en $[2-^{14}C]$ - isopentenil pirofosfato.

Se encontró que en condiciones de activa colesterogénesis hepática la enzima sube en 2,7 veces su actividad, en tanto que ésta baja 3,9 veces en la situación inversa (PCO, O02). No se detectó ritmo circadiano en hígado o riñón.

Se concluye que la descarboxilasa se comporta en forma similar a otras enzimas de la vía, lo que sugiere que la regulación secundaria de la biosíntesis de colesterol se realiza por variaciones concertadas de grupos de enzimas de la ruta.

Financiado por subvención B402 791 U. de Chile.

CARACTERISTICAS DE LA ADENIL CICLASA DE OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS. (Characteristics of Adenyl Cyclase from *X. laevis* oocytes) Jordana, X., Otero, C., Allende, J.E. Flawiá, M., Kornblihtt, A., Torres, H.N., Dpto. Bioquímica, Fac. Medicina, U. de Chile y Fund. Campomar, Bs. As. Argentina
El proceso de maduración meiótica de oocitos de *Xenopus laevis* inducido por hormonas involucra cambios en la concentración de cAMP. Este hecho le confiere importancia al estudio en estas células de la enzima responsable de la síntesis de cAMP, la adenil ciclasa. La actividad de la enzima se midió usando $\alpha(32P)$ ATP como sustrato y purificando el producto de la reacción, $(32P)$ cAMP, por cromatografía en Dowex 50 y en alumina. Se logró detectar actividad de adenil ciclasa principalmente en la fracción particulada (pellet de 105000xg de un homogeneizado de ovario de *X. laevis*). También se encontró actividad en extractos de oocitos aislados manualmente del ovario. La actividad de la enzima es estimulada por fluoruro más de 20 veces. La actividad basal presenta una cinética bifásica, con un primer componente rápido (2-4 min) y un segundo componente más lento y lineal hasta los 20 min. La actividad estimulada por fluoruro es lineal durante los primeros 20 min. La enzima requiere Mn^{2+} o Mg^{2+} para su actividad, pero tanto la actividad basal como la estimulada por fluoruro son 6 a 8 veces más altas con Mn^{2+} que con Mg^{2+} . La actividad de adenil ciclasa medida en oocitos en diferentes estados de la oogenesis demuestra que la enzima aumenta con el crecimiento del oocito manteniendo una relación constante de actividad por superficie de las células. En experimentos preliminares no se han detectado efectos de progesterona y hCG o de GTP y GMP(NH)P sobre la actividad de la enzima *in vitro*. Auspiciado por: U. de Chile, OEA, PNUD/Unesco programa RLA/78/024 y Fundación Ford.

MECANISMOS DE REGULACION IN VIVO DE LA 3-HIDROXI-3-METILGLUTARIL COENZIMA A REDUCTASA DE HIGADO DE RATA
(In vivo mechanisms regulating 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase). Jabalquinto, A.M. y Porter, J.W. Departamento de medicina Experimental, Facultad de medicina Oriente, Universidad de Chile y Departamento de Química Fisiológica, Universidad de Wisconsin, U.S.A.

La etapa limitante de velocidad en la biosíntesis de colesterol en hígado es la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-Co A) a mevalonato, reacción catalizada por la HMG-Co A reductasa. Esta enzima está controlada por una variedad de estímulos fisiológicos como factores hormonales y nutricionales. Hasta ahora no se conocen los mecanismos de regulación de esta enzima.

Con el objeto de obtener mayor información sobre estos mecanismos se llevaron a cabo inmunotitulaciones de la enzima extractada de hígado de ratas sometidas a diferentes condiciones fisiológicas. Estas inmunotitulaciones fueron diseñadas para establecer si cambios en la actividad enzimática resultan de cambios en la cantidad de enzima o se deben a activación o inactivación de enzima preexistente.

Nuestros resultados indican que cambios *in vivo* de la actividad enzimática se deben a cambios en la cantidad de enzima.

ACTIVIDADES DE QUINASA DE PROTEINAS EN NEUROSPORA CRASSA. REGULACION POR FACTORES CITOSOLICOS.
(Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. Regulation by cytosolic factors).

Judewicz, N.D., Glikin, G.C. and Torres, H.N. Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar - Obligado 2490 - 1428 Buenos Aires - Argentina.

Se ha encontrado actividad de quinasa de proteínas en distintas fracciones solubles y particuladas en *Neurospora crassa*. El fraccionamiento en columna de DEAE celulosa de extractos citosólicos ha permitido identificar actividades quínicas con distinta especificidad por el sustrato proteico. No se ha encontrado dependencia de nucleótidos cíclicos en estas actividades. Sin embargo se ha podido hallar actividad de "binding" de $(3H)$ cAMP en algunas fracciones de la columna. Por otro lado se detectó la presencia de un activador de las fracciones fosforilantes de fosvitina y un inhibidor que actúa especialmente sobre la quinasa de histonas. Se ha establecido que el inhibidor disminuye la afinidad de la enzima por el ATP y que ambos factores no modifican su efecto por preincubaciones con la enzima. Sin embargo se ha observado que la quinasa de fosvitina es auto-activada por preincubación a 30° C.

RESIDUOS DE AMINOACIDOS INVOLUCRADOS EN LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE APTIRASA. (Amino acid residues involved in the enzymatic activities of apyrase). Kottlun, A.M., Uribe, L., Valenzuela, M.A. y Traverso, A. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química Biológica, Universidad de Chile.

La modificación de aminoácidos de apirasa de dos variedades de *S. tuberosum*: enzima de var. Pimpernel y Desireé con cociente ATPasa de 1^o y 1 respectivamente nos permite concluir:

1) Que los residuos de triptofano acoplado con el reactivo de Koshland son aparentemente esenciales para las actividades enzimáticas de las dos apirases.

2) En la enzima Desireé el decaimiento más rápido de la ATPasa podría deberse a un diferente compromiso de las argininas.

3) Habría una distinta participación de los residuos carboxílicos en las dos enzimas deducido de las diferencias tanto en la cinética de inactivación como por la protección por sustratos frente a carbodiimida soluble.

4) La aparición de nitrotirosina y la protección por sustratos apovan la presencia de tirosinas en el sitio activo de ambas enzimas. El cociente ATPasa/ADPasa de 10 en la enzima Pimpernel se podría explicar por una participación diferente de tirosinas en ambas actividades enzimáticas. Las actividades ATPasa y ADPasa de la enzima Desireé de cociente 1 son inhibidas en la misma magnitud por TBT lo que sugiere que las tirosinas serían compartidas en la misma forma por ambas actividades.

INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO (The initiation of glycogen biosynthesis). Krisman C.R. y Whelan W.J. - Instituto de Investigaciones Bioquímicas Buenos Aires, Argentina y Department of Biochemistry, University of Miami, School of Medicine, Miami, Florida, U.S.A.

Las enzimas que sintetizan glucógeno, solo funcionan en presencia de un "primer" que puede ser glucógeno u oligosacáridos. El mecanismo por el cual dicho "primer" se sintetiza es desconocido.

Utilizando extractos de hígado de rata, hemos demostrado la formación de un glucano a 1-4 covalentemente unido a una proteína a través de una unión ácido labil.

Nos interesó el estudio y la caracterización de este intermediario en la biosíntesis del glucógeno. Para su obtención, se incubaron preparaciones enzimáticas de hígado de rata con UDPglucosa (¹⁴C) en presencia de alta concentración de sales. Los residuos glucosos son transferidos a una proteína endógena. Este proteoglucano se puede aislar por precipitación con ácido tricloroacético o en el volumen de exclusión de una columna de Sephadex-G-75 o Biogel-A-50m. El tratamiento con este compuesto con ácido diluido libera un producto neutro. En cambio el tratamiento con enzimas proteolíticas y posterior electroforesis en papel reveló la presencia de varios glicopéptidos.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA ACTIVIDAD ADENILATO CICLASA ASOCIADA A TUBOS SEMINIFEROS DE RATA (Purification and properties of adenyl cyclase associated to rat seminiferous tubules) Kornblihtt, A.R., Flawiá, M.M. y Torres, H.N. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires-Obligado 2490, Buenos Aires (1428)-Argentina.

Se realizaron estudios destinados a purificar la actividad adenilato ciclasa asociada a la fracción citosólica de tubos seminíferos de rata. Fracciones parcialmente purificadas han sido sometidas a cromatografía de afinidad en columnas de triiodotironina-Sepharosa y enfoque isoeléctrico en columnas estabilizadas por un gradiente de sacarosa. Las fracciones obtenidas por este método poseen un alto grado de pureza cuando se las analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Utilizando estas fracciones se obtuvieron anticuerpos anti-adenilato ciclasa en conejos y se estudió el efecto de los mismos sobre la actividad enzimática.

Por otro lado se estudiaron las propiedades moleculares y cinéticas de la adenilato ciclasa asociada a espermatozoides maduros, comparándoselas con las correspondientes a la enzima citosólica. Como las evidencias indicaron similitudes importantes entre ambas enzimas, se han estudiado algunos factores que determinan la inserción de la enzima citosólica a las membranas de las células germinales.

HEXOQUINASAS DEL HIGADO DE EMBRION DE POLLO (Liver hexokinases of the chick embryo)

Lagos, R. y Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

En el hígado de rata existen cuatro hexoquinasas (HK) llamadas A, B, C y D que aparecen secuencialmente durante el desarrollo. En gallo adulto sólo se han encontrado dos HK que en DEAE-celulosa eluyen como HK-B y HK-C. Se estudió la posibilidad de que en esta especie las HK A y D sólo se expresen en el período embrionario.

Se usaron huevos embrionados Leghorn. La fosforilación de glucosa en extractos crudos se midió con un sistema acoplado a NADP. Para eluyentes se empleó un radioensayo. Las HK se separaron en columnas de DEAE-celulosa.

Durante la incubación de los huevos los niveles totales de HK son constantes desde el día 10 hasta los días 20 y 21 en que aumentan al doble para disminuir abruptamente en el recién nacido. El glicógeno aumenta paulatinamente desde el día 16, alcanza su máximo el día 19 y disminuye notablemente en las horas previas al nacimiento. En esta días tempranos (días 11 a 15) pueden separarse cuatro HK, dos de las cuales están ausentes en el adulto, y cuyas movilidads cromatográficas son similares a las de HK-A y HK-D de rata. La isoenzima que eluye a 34 mM KCl sólo está presente en los días 11 a 15 y su K_m es 0,12 mM glucosa. La HK que eluye como HK-D está presente durante todo el desarrollo y desaparece después del nacimiento. Difiere de HK-D por su $K_m = 0,10$ mM glucosa y su peso molecular de 100.000.

Conclusión: El hígado de pollo posee cuatro HK, dos de las cuales sólo se expresan en el embrión. Una es similar pero no idéntica, a HK-A de rata. Las propiedades de la cuarta isoenzima no corresponden a las de la clásica HK-D de alta K_m del hígado de rata.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PIRUVATO QUINASA DE CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS. ALGUNAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA INMOVILIZADA. (Purification and characterization of Pyruvate kinase of Concholepas concholepas. Some properties of the immobilized enzyme). León, O., González, R., Muñoz, S. y Morán, A. Departamento de Bioquímica ICMB. Universidad de Concepción.

La purificación de Piruvato Quinasa de Concholepas concholepas presenta a diferencia de otras especies varias dificultades. En este trabajo, se describe un método rápido de purificación con buenos resultados y en él se incluye una cromatografía en Sefarosa azul Dextrano con elución por fructosa difosfato. La enzima resultante posee una actividad específica de 76 U/mg de proteína con un rendimiento final de 30%.

A la enzima purificada se le determinó el peso molecular por filtración en Sefadex G-200 y por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, correspondiendo a 234.000 y 59.000 D respectivamente. Con esto se demuestra que la enzima está constituida por cuatro subunidades idénticas.

La Piruvato Quinasa fue inmovilizada a Sefarosa-*adipoil*-hidrazida por medio de la reacción de Curtius conservándose la respuesta de la enzima a efectores como fenilalanina y fructosa difosfato.

Estudios de disociación con urea indican que la piruvato quinasa inmovilizada puede ser convertida a la forma dimerica y monomérica a concentraciones de 1,5 y 3,5 M de urea. Ambas formas presentan actividad en contraste con lo observado con la enzima soluble.

Síntesis Proteica en Período G1 de Parótidas de Ratón. (Protein synthesis during G1 period in mouse parotid glands). López-Solís, R.O. y Alliende, C. Lab. Bioquímica, Dpto. Biología Celular y Genética, Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

Isoproterenol induce síntesis de DNA en glándulas parótidas de ratón después de un período lag de 20 horas. Cicloheximida administrada junto con isoproterenol elimina la posterior síntesis de DNA a diferencia de inhibidores de la síntesis de RNA que no producen efecto alguno. Por ello se estudió el efecto in vivo, de isoproterenol, cicloheximida y de ambos simultáneos sobre la síntesis proteica en estas glándulas.

Ratones C3B10F1 Snell se inyectaron con las diversas drogas y las glándulas parótidas se extrajeron 45 minutos después de inyectar L-(4,5-³H)leucina. El DNA se extrajo a partir de dos glándulas y la incorporación de ³H-leucina medida en la fracción proteica remanente.

El isoproterenol disminuye la síntesis proteica en un 50% durante período G1 temprano, sin cambio alguno en los pools de aminoácidos. Cicloheximida produce una mayor inhibición aún en glándulas estimuladas por isoproterenol, diferencia que explicaría la inhibición de la síntesis de DNA. La cinética de recuperación de la síntesis proteica de ratones inyectados con cicloheximida e isoproterenol es diferente a la de aquellos inyectados sólo con cicloheximida. Este hecho podría estar asociado a la translocación de ribosomas asociados a membranas a un sistema libre, efecto también producido por el isoproterenol.

This work was supported by Grant B403791 del SDCACI Universidad de Chile.

EFFECTO DEL POTASIO EN LA REGULACION DE LA ALDOSTERONA: POSIBLE PARTICIPACION DEL Ca COMO SEGUNDO MENSAJERO HORMONAL. (Calcium ion as mediator of potassium stimulus on aldosterone production). Lobo M.V., R. Foster y E.T. Marusic Depto. Fisiología. Univ. de Chile.

En la corteza adrenal además de factores humorales, el ion potasio es un potente estímulo de aldosterona. El mecanismo es desconocido. En el presente trabajo se estudió la participación del Ca en la biosíntesis de aldosterona inducida por K. Los estudios se realizaron en células de glomerulosa obtenidas por dispersión con colagenasa de cortes de adrenal de buey o perro. Los resultados indican que el Ca extracelular "per se" tiene un efecto discreto en la esteroidogénesis basal; sin embargo al modificar el Ca externo en presencia de K como estímulo se observó una alta dependencia: en ausencia de Ca se suprime el estímulo de K, alcanzándose un efecto máximo con 1.25mM Ca. Mayor información de la participación del Ca en la acción de K se obtuvo al estudiar el efecto en la esteroidogénesis de A23187 y D600. El ionoforo A23187 estimula la aldosterona sin alcanzar el efecto máximo de K. El D600, una droga que inhibe el flujo de Ca bloquea el efecto de K. Estos resultados nos llevan a postular que el mecanismo de acción de K en la producción de aldosterona estaría relacionado con cambios en el Ca intracelular. Trabajo apoyado por los grants UNDP/UNESCO N°16/79 y Univ. Chile N°B161-794.

EFFECTOS REGULADORES DEL GLUTATION (Regulatory effects of glutathione).

Lupu, M., Puente, J. y Sapaq-Haqar, M. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. Universidad de Chile.

Entre las múltiples funciones intracelulares de la razón GSH/GSSG está la regulación de algunos procesos metabólicos tales como el ciclo del γ -glutamilo y la vía de las pentosas. Hemos estudiado el efecto del GSH sobre algunas enzimas de este ciclo en glándula mamaria de ratas en preñez y lactancia y el del GSSG sobre la inhibición de la glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PD) por concentraciones fisiológicas de NADPH, tanto en eritrocitos permeabilizados como hemolizados.

La γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) se determinó con L- γ -glutamyl-p-nitroanilida y la γ -glutamyl-cisteína sintetasa (GCS) utilizando ³H-glutamato y precipitando el producto como mercáptido de cadmio. Los eritrocitos se trataron con un reactivo bifuncional (dimetilsulberimidato) y luego se permeabilizaron con digitonina.

La GCS no varía en el ciclo lactogénico y no es inhibida por GSH; su actividad es muy baja con respecto a la GGT por lo que el ciclo del γ -glutamilo no sería importante en la glándula mamaria.

La inhibición de la G6PD a concentraciones fisiológicas de NADPH (50 μ M) es parcialmente revertida por GSSG (20-40 μ M) con un efecto rápido que se observa en hemolizados como en eritrocitos intactos permeabilizados. Esto apoya la idea de que la vía de las pentosas es regulada por GSSG.

(Proyecto N° B059-794, Universidad de Chile).

GANGLIOSIDOS Y GLICOPROTEINAS DEL SISTEMA OPTICO DE POLLOS EN LUZ Y OSCURIDAD. (Gangliosides and glycoproteins of the optic systems of chickens in light and dark). Maccioni, A.H.R. y Caputto, B.L. - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000, Córdoba, Argentina.

Se ha estudiado el efecto de la estimulación luminosa sobre la marcación de los gangliosidos y glicoproteínas que han sido transportados por flujo axonal desde la retina hasta el tectum óptico.

Pollos expuestos a luz durante 5 h después de una inyección intraocular de N-³H-acetilmanosamina tienen una marcación significativamente mayor en los gangliosidos (+28%; p<0,01) y glicoproteínas (+20%; p<0,001) del tectum contralateral al ojo inyectado que la de sus controles que fueron mantenidos en oscuridad. El fraccionamiento subcelular del tectum mostró que los incrementos en la marcación de gangliosidos y glicoproteínas observada en animales expuestos a luz se distribuyen en todas las membranas subsinaptosomales. Los tectos ópticos ipsilaterales mostraron una marcación mucho menor y no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos de animales.

Las diferencias observadas en la marcación de los gangliosidos y glicoproteínas del tectum pueden deberse a cambios en la marcación de dichos compuestos en retina o a diferencias en su transporte axonal.

ESPECIFICIDAD DE LAS HEXOKINASAS RESPECTO A ALGUNOS SUBSTRATOS E INHIBIDORES POCO COMUNES. Machado de Domenech E. E. y Sols A. Instituto de Enzimología y Patología Molecular del CSIC. Facultad de Medicina Universidad Autónoma. Madrid 34. España.

La 5-tioglucosa y otros 8 análogos de la glucosa poco comunes han sido estudiados como sustratos o inhibidores competitivos de las hexokinases de levadura (isozimas II,I) y, en los casos mas interesantes, de la hexokinasa de cerebro. La 5-tioglucosa tiene relativamente buena afinidad por ambos enzimas y es lentamente fosforilable por ellos. La 2-deoxi-2-fluoroglucosa y la manosamina son buenos sustratos para ambos enzimas. La 3-deoxi-3-aminoglucosa y la 1-tioglucosa son sólo sustratos marginales. El 1,5-anhidroglucitol es un mal sustrato de la hexokinasa de levadura. La N-acetilmanosamina, la 6-deoxiglucosa y la 6-deoxi-6-aminoglucosa no son fosforilables por hexokinasa.

El 5-tioglucosa-6-P es un buen inhibidor alostérico de la hexokinasa animal como análogo del G6P. El 2-deoxi-2-fluoroglucosa-6-P no es inhibidor.

Se discutirán diversas implicaciones teóricas y prácticas de estas observaciones sobre la especificidad de las hexokinases, animal y de levadura.

INTERACCION DE AZUL DE CIBACRON F3GA CON LA RNA POLIMERASA I DE LEVADURA (Interaction of Cibacron blue F3GA with yeast RNA polimerase I). Macdonald, H., Bull, P., Valenzuela, P. - Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile.

La RNA polimerasa I de levadura cataliza la síntesis de RNA utilizando como sustratos nucleosidos trifosfatos. En el presente trabajo se estudió el efecto de azul de Cibacron sobre la enzima.

Se purificó el azul de Cibacron. Se estudió el efecto de la concentración del colorante sobre la actividad de la enzima por incubación a 30°C. La interacción entre el colorante y la RNA polimerasa se determinó por espectros de diferencia entre 500 y 750 nm. La distribución de subunidades de la enzima eluida de columnas de azul dextrano-Sefarosa se determinó en gels de poli(acrilamida)-SDS.

Los resultados indican que el colorante inhibe la enzima. Se logra un 100% de inhibición a una concentración de azul de Cibacron de 2×10^{-5} M. DNA protege parcialmente. Hay interacción de la RNA polimerasa con el colorante, la que es disminuida por NaCl 0,3 M. El complejo enzima-azul de Cibacron es reversible. La enzima se retiene en columnas de azul dextrano-Sefarosa y se eluye con NaCl 0,4 M ó NaCl 0,3 M y ATP 5 mM. Bajo ciertas condiciones de elución, la enzima pierde dos subunidades.

CONTROLE DA GERMINAÇÃO EM *B. EMERSONII* POR AMP CÍCLICO E SUA CORRELAÇÃO COM A MOBILIZAÇÃO DO CÁLCIO CELULAR. (Control of germination in *B. emersonii* by cyclic AMP correlated to cellular calcium mobilization). Maia, J.C.C., Gomes, S. L. e Mennucci, L. - Depto. Bioquímica, Inst. Química, Univ. São Paulo, C.P.20780, S. Paulo 05508, S.P., Brasil.

A germinação do zoósporo de *B. emersonii* - uma transição morfogênica independente de expressão gênica concomitante - é induzida tanto por AMP cíclico como por inibidores competitivos da enzima fosfodiesterase de AMP cíclico. Este processo é acompanhado por um rápido e extenso efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Estudos com inibidores tanto de germinação como do movimento de cálcio, indicam que a liberação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ é o resultado de dois efluxos de cálcio, distinguíveis tanto no tempo como no estágio de desenvolvimento. O efluxo precoce é observado durante o período de latência e antes da retração do flagelo do zoósporo, um dos primeiros eventos morfológicos da germinação. O efluxo tardio parece refletir a transição esferocitogênica. A inibição do fluxo inicial de cálcio por lantânio resulta na inibição da germinação enquanto que o ionóforo de cálcio, A23187, produz efluxo de cálcio sem induzir morfogênese. O fato de que uma combinação de concentrações não-efetivas de AMP cíclico e A23187 induz germinação completa e semi-sincrônica sugere que a germinação de *B. emersonii* é dependente da mobilização de cálcio celular e de AMP cíclico.

PHOTOBIOCHEMISTRY: PHOTOHEMOLYSIS OF RED CELLS SENSITIZED BY CHLORPROMAZINE - BIOENERGIZED TRIPLET ACETONE SYSTEM. (Fotohemólisis de eritrocitos sensibilizada por el sistema Clorpromazina-Acetona triplete Bioenergizada). Makita, Y., Durán, N., Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

Chlorpromazine is decomposed when it is treated with bioenergized triplet acetone from the 2-methylpropanal/red/cells/ O_2 system, forming chlorpromazine-5-oxide which has a concomitant hemolytic effect observed by a spectrophotometric method.

Experiments with external superoxide dismutase, catalase, benzoate and bicarbonate indicate the observe of $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , and OH^{\cdot} species as the precursor of the hemolytic effect. Riboflavin accelerates the initial rate of hemolysis.

Xanthene dyes partially protect the hemolytic effect by an energy transfer process, indicating that it is a photohemolysis in the dark. Comparison between 2-methylpropanal/peroxidase/ O_2 and 2-methylpropanal/red cells/ O_2 systems in the presence of chlorpromazine indicates that essentially the same of mechanism occur in both cases.

This results could explain the *in vivo* hemolytic and toxic effect of chlorpromazine in the dark.

Research supported by CNPq, FINEP, FAPESP (Brasil).

SINTESE DE N-ALQUIL-DERIVADOS DO TRH (The Synthesis of N-alkyl-derivatives of TRH). Martínez C.A.*; Seidel, W.F.*; Muradian, J.*; Boschov, P.*# e Tomimaga, M.*

* INSTITUTO DE QUÍMICA - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

** Escola Paulista de Medicina.

Entre dezenas de análogos e homólogos sintéticos do TRH o que despertou maior interesse foi o peptídeo N_{1m}^T -metil His² TRH, sintetizado por Vale e cols. que apresentou actividade biológica oito vezes maior em relação ao peptídeo natural. Grant e cols. propuseram uma ponte de hidrogenio entre N^{π} e N^{α} do residuo histidil, usando titulacao electrométrica. Esta proposicao nao foi conformada por estudo de ressonancia magnética nuclear e por determinacao de parametros termodinamicos de ionizacao de histidina e do peptídeo. A maior actividade do N_{1m}^T metil His² TRH talvez esteja relacionada com o aumento de hidrofobicidade ao redor do anel imidazólico, favorecendo a interacao do mesmo com o receptor. Com o objetivo de estudar a relação entre a estrutura e grande aumento de actividade biológica de N_{1m}^T -metil His² TRH, realizamos as sínteses dos seguintes análogos do TRH: N_{1m}^{π} -etil His² TRH, N_{1m}^T -etil His² TRH, N_{1m}^T -dietil-His² TRH e N_{1m}^T -butil-His² TRH. Os monoalquil derivados do TRH foram titulados electrometricamente em varias temperaturas para determinar os pKa e as constantes termodinamicas ΔG , ΔH e ΔS .

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA PIRUVATO CARBOXILASA DE HIGADO DE ALPACA (Purification and properties of Pyruvate Carboxylase from Alpaca liver). Marcelo, A.J. y Villavicencio M. Instituto de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Perú.

Se ha hecho la extracción y purificación de la piruvato carboxilasa de mitocondrias de hígado de alpaca usando el procedimiento de Scrutton et al (Arch. Biochem. Biophys., 150, 636, 1972). La enzima purificada mostraba una sola banda en electroforesis de SDS-poliacrilamida. El pH óptimo en tampones diferentes es tuvo entre 7.5-8.3. El Km para el ATP y el bicarbonato fueron parecidos a los reportados para hígado de rata. El Km para el Mg^{++} fue 10 veces mayor que el de la rata pero el Km para piruvato fue menor que en cualquier otra especie lo que podría implicar una facilitación de la gluconeogenesis. La enzima es fuertemente activada por Acetil-CoA, en ausencia de él, el Km para piruvato fue 70 veces mayor. Las constantes de activación (Ka) para acetil-CoA (n=4.2), propionil-CoA, butiril-CoA y CoA-SH fueron: 0.04mM, 0.152mM, 0.77mM, y 1.06mM, respectivamente. Las velocidades máximas con CoA-SH y butiril-CoA fueron el 50% de las alcanzadas con Acetil-CoA y propionil-CoA. La avidina inhibe específicamente a la enzima.

(Trabajo apoyado en parte por la OEA)

PROTEINAS CROMOSOMALES NO HISTONICAS DE ALTA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GAMETOS DE "TETRAPYGUS NIGER" (High mobility group non-histone chromatin proteins, from gametes of "Tetrapygus niger"). Massone, R., Puchi, M., Gamboa, S., Imschenetzky, M. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico Biológicas, Universidad de Concepción.

Un nuevo grupo de proteínas cromosomales no histónicas de alta movilidad electroforética (HMG) han sido recientemente aisladas de diversas células eucarióticas. La amplia distribución y relativa poca variabilidad de estas proteínas, sugiere un posible rol en la estructura de cromatina. En el presente trabajo se describe la identificación de estas proteínas en gametos masculinos y femeninos de "Tetrapygus niger" (erizo de mar).

Cromatina purificada es extraída con NaCl 0.35M. Este procedimiento disocia un grupo de proteínas no histónicas, tanto de baja (LMG) como de alta (HMG) movilidad electroforética. Estas son a continuación separadas por precipitación selectiva con ácido tricloroacético y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida urea ácido acético.

Los resultados obtenidos indican la presencia de cuatro componentes mayores de HMG, tanto en espermios como en ovas. Su movilidad electroforética y su proporción en cromatina es diferente a histonas. La comparación de los patterns electroforéticos de histonas y HMG sugiere una posible coextracción de estas proteínas en el caso de ovas, no así en espermios. Se discuten estos resultados en función de una organización diferente de la cromatina en gametos de "Tetrapygus niger".

SINTESIS IN VITRO DE PEPTIDOS DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA DE TORPEDO CALIFORNICA (Cell-free synthesis of acetylcholine receptor peptides of *T. californica*). Méndez, B., Valenzuela, P., Martial, J. y Baxter, J. - Depto. Biología Celular, U. Católica de Chile y Endocrine Research Division, U. de California, San Francisco.

El receptor de acetilcolina (RACH) de *Torpedo californica* está constituido por 4 subunidades de 65.000, 60.000, 50.000 y 40.000 daltons. Para estudiar la síntesis de este receptor, hemos aislado de órgano eléctrico de *T. californica*, una preparación de RNA mensajero (RNAM) capaz de dirigir la síntesis de péptidos del RACH *in vitro*.

Para obtener RNA total de *T. californica*, se homogenizaron órganos eléctricos en tiocianato de guanidina. RNAM se aisló por cromatografía en oligo(dT) celulosa y se ensayó en un lisado de reticulocitos usando metionina- 35 S como precursor. Los péptidos sintetizados se analizaron por inmunoprecipitación con suero anti-RACH y por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Nuestros resultados muestran que: (a) cinco péptidos son inmunoprecipitados específicamente por el suero anti-RACH; (b) los pesos moleculares de estos péptidos (60.000; 51.000; 49.000; 41.000 y 35.000) son similares a los de las subunidades del RACH y, (c) los cinco péptidos compiten con RACH puro en el ensayo inmunológico. Estos resultados indican que el RNAM está dirigiendo la síntesis de péptidos del RACH en lisado de reticulocitos.

FORMACAO DE LACUNAS OPOSTAS A DIMEROS DE PIRIMIDINA DURANTE REPLICACAO DE DNA EM CELULAS DE MAMIFEROS IRRADIADAS COM LUZ ULTRA-VIOLETA: Me neghini, R., Schumacher, R. I. e Cordeiro-Stone M. - Departamento de Bioquímica da Universidade de Sao Paulo.

Recentemente tem aumentado as evidencias de que a replicacao de DNA em "template" contendo lesoes leva a formacao de mutacoes. A compreensao dos mecanismos de mutacao requer o conhecimento dos eventos de replicacao em DNA lesado. Em publicacao recente (Biophysical J. 27, agosto de 1979) mostramos que lacunas aparecem efetivamente em DNA recém-replicado de células humanas XP12RO, em cultura, um ponto que ainda permanecia obscuro. Para isto se empregou a nuclease S1 que atacou as regioes de lacunas gerando quebras em DNA "duplex". Estas observacoes foram agora estendidas a células 3T3 de camundongo, com as seguintes conclusoes: 1-Nestas células as lacunas desaparecem em cerca de 6 horas, mas se acumulam na presenca de cafeína 3 mM, que age como um eficiente inibidor do processo de preenchimento das mesmas; 2-Na presenca de cafeína apenas metade do DNA recém-sintetizado em células irradiadas e convertido em moléculas de baixo peso molecular, por acao da nuclease S1. Estes resultado fortalecem ainda mais a nossa proposicao de que lacunas sao formadas durante a replicacao apenas na cadeia "leading" mas nao na cadeia lagging".

Trabalho executado com auxilio de Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo.

CONSEQUENCIAS DE ALTERACOES ESTRUTURAIS NAS SUBUNIDADES DE CROTOXINA (Results of structural changes in the subunits of crotoxin). Nakazone, A.K., Goncalves, J.M. Area de Radiobiología, C.A.B.R.R., Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Sao Paulo-Brasil.

Crotoxina é composta de duas subunidades proteicas: fosfolipase A e crotapotín. Alteracoes estruturais foram efetuadas por modificacoes dos a.a. arginina, lisina e tirosina.

Bloqueio de grupo guanidino das argininas com fenilglicoxal foi acompanhado com reacao de Sakaguchi. Carbamilacao do epsilon amino das lisinas foi feita usando KCN0, a pH 7,9, e lisinas nao carbamiladas foram determinadas no autoanalisador de a.a.. Iodacao de crotoxina com 131 I na e posterior separacao em fosfolipase A 131 I e crotapotín 131 I, por cromatografia em DEAE Sephadex A25, serviu para estudo das tirosinas. Nas proteínas modificadas foram ensaiadas atividade imunológica com soros específicos contra as subunidades, e, atividade de fosfolipásica com glóbulos vermelhos. Interacoes crotapotín-fosfolipase foram acompanhadas no U. V. distante.

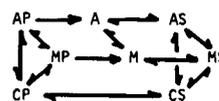
Fenilglicoxal inativa a fosfolipase e reduz sua atividade antigenica. Argininas de crotapotín nao sao determinantes antigenicos. Carbamilacao de uma lisina da crotapotín resulta na queda da atividade imunológica e o bloqueio de duas lisinas de fosfolipase nao altera a atividade enzimática nem imunológica. A eficiencia de "marcacao" das tirosinas de fosfolipase A é 2,5 vezes maior do que a das tirosinas de crotapotín. Na interacao das subunidades aparece um pico em 210 nm.

Os resultados obtidos mostram a participacao de certos aminoácidos em atividades biológicas específicas.

UN MODELO GENERAL DE ENZIMAS "HISTERETICAS" Olavarría, J.M. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

El comportamiento de enzimas monoméricas que evidencian cooperatividad positiva para el sustrato es fácilmente explicable suponiendo dos estados conformacionales y hay varios modelos publicados. En cambio la cooperatividad negativa no ha tenido tan detallada explicación y parece difícil realizarla a través de un modelo que incluya solo dos estados.

Dentro de un modelo general de enzimas cuyo ciclo catalítico depende de fluctuaciones conformacionales se propone el caso particular de enzimas con histéresis. El modelo supone que la molécula enzimática en la forma A



(abierto) es capaz de asociar sustrato, pero este complejo no es catalíticamente activo salvo que ocurra una transición conformacional a estado C (cerrado), a su vez el complejo CP no es disociable y para que el ciclo se complete debe pasar a alguna forma abierta. Si este cambio no es brusco, sino a través de etapas intermedias M, las que también pueden asociar y disociar sustratos y productos con diferente eficiencia, se puede obtener tanto comportamientos cooperativos positivos como negativos, dependiendo de las afinidades de las formas A y M para los sustratos, y de la vida media de la forma M. Se han desarrollado las ecuaciones matemáticas para dos simplificaciones del modelo descrito y se han analizado los posibles comportamientos.

INIBIDORES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (Inhibitors of the Renin-Angiotensin System). Paiva, A.C.M., Sabia, E.B., Nouailhetas, V.L. A. e Paiva, T.B. Departamento de Biofísica, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, S.P., Brasil.

Visando obter inibidores persistentes do sistema hipertensor renal, sintetizamos análogos de peptídeos inibidores da enzima conversora (E.C.), bem como derivados lipofílicos da [Leu⁸]-angiotensina II.

O estudo da relação entre a estrutura de peptídeos potenciadores de bradicinina de venenos de serpentes e a sua atividade inibitória da E.C. mostrou que a presença de um resíduo básico (Arg ou Lys) nas posições 4 e/ou 6 do nonapeptídeo BPP9a confere-lhe maior persistência de ação "in vitro". Dos análogos estudados o mais ativo e persistente foi a [Lys⁶]-BPP9.

Procurando maior persistência da inibição também ao nível do receptor da angiotensina II (AII), sintetizamos derivados da [Leu⁸]-AII contendo resíduos de ácidos acoplados à extremidade N-terminal da molécula. Apesar de que estes compostos não tenham tido maior duração de ação "in vitro", a octanoil-[Leu⁸]-AII e a oleil-[Leu⁸]-AII mostraram-se úteis para obter inibição prolongada "in vivo" por administração sub-cutânea ou intramuscular em ratos.

Trabalho realizado com auxílios da FINEP, CNPq e FAPESP.

BIOsíNTESIS DE GANGLIOSIDOS DURANTE LA ONTOGENESIS DE LA RETINA DE POLLO. (Biosynthesis of gangliosides during the ontogenesis of chicken retina). Panzetta, P. y Maccioni, H.J.F. - Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. 5000 Córdoba, Argentina.

En retinas de embriones de diferentes edades cultivadas en presencia de glucosamina-6-³H, la incorporación de radiactividad en gangliosidos incrementó desde el 6° al 9° día, decayó desde el 10° al 12° día y luego se mantuvo estable hasta el nacimiento. El análisis de la incorporación en gangliosidos individuales mostró que en retinas de 8 días fue principalmente en gangliosidos de cadena oligosacárida simple (60% de la radiactividad en el disialogangliosido GD3), mientras que en retinas de 13 y 18 días fue principalmente en gangliosidos de cadenas oligosacáridas más complejas (50% de la radiactividad en el disialogangliosido GD1a y 25% en el trisialogangliosido GT1). Los cambios observados se correlacionaron con el incremento, al 13° día, de las actividades de las enzimas UDP-Gal:GM2 galactosil-transferasas responsables de la elongación del oligosacárido desde GM3 hasta GD1a. Estos cambios ocurrieron en un período caracterizado ontogénicamente por una activa arborización celular, ya que desde el 13° día hasta el nacimiento la cantidad de gangliosidos y proteínas incrementó al menos dos veces, mientras que el número de células lo hizo en sólo un 15%. A diferencia con las dos glicosiltransferasas mencionadas, las gangliosido sialosil-transferasas variaron menos marcadamente durante el desarrollo.

UNA NUEVA RELACION ENTRE SÍNTESIS DE TREALOSA Y UTILIZACIÓN DE MALTOSA. (A New Relationship between Trehalose synthesis and maltose utilization). Panek, A.D., Oliveira, D.E. & Mattoon, J.R. - Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro & Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, U.S.A.

Different strains of *Saccharomyces* exhibit two different patterns of trehalose accumulation during logarithmic growth on glucose medium. The active trehalose accumulation phenotype seems to be always associated with the maltose fermentation ability controlled by a constitutive MAL gene. The pattern of trehalose accumulation and the levels of constitutive alpha-glucosidase show similar sensitivity to catabolite repression in the majority of the strains tested.

A specific, unique relationship between maltose utilization and trehalose accumulation exists. When maltose is used as a carbon source active trehalose accumulation always occurs and is not detectably diminished even in the presence of genes which prevent trehalose accumulation in a glucose medium.

EFFECTOS HORMONALES SOBRE LA MADURACION Y SÍNTESIS PROTEICA EN OOCITOS DE ANFIBIO. (Hormonal effects on maturation and protein synthesis in amphibian oocytes) Paz, B., Bornaz, G., Rivera, A., Segarra, F. y Rodríguez, C. Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad Sn. Agustín, Arequipa-Perú.

Los oocitos de anfibio constituyen sistemas muy adecuados para investigar los mecanismos moleculares de la acción hormonal. Hemos estudiado el efecto de gonadotropina coriónica humana (hCG), progesterona y testosterona sobre la maduración y síntesis proteica en los oocitos de *Telmatobius arequipensis*.

Folículos de *T. arequipensis* se incubaron por 24 hrs. en hCG (25 U/ml), progesterona (1 uM) y testosterona (1 uM) y se midió la maduración de los oocitos por la ruptura de la vesícula germinativa; bajo las mismas condiciones se analizaron las proteínas de los oocitos mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La síntesis proteica se determinó por la radioactividad ácido precipitable de oocitos incubados con aminoácido marcado.

Hemos encontrado que progesterona y testosterona - estimulan la maduración de los oocitos; en cambio hCG fue incapaz de hacerlo. El empleo de concentraciones mayores de gonadotropina, no modificó estos resultados. Se demostró la ausencia de por lo menos una proteína - en los oocitos que maduraron, en comparación con los control y con los tratados con hCG. Progesterona, testosterona y hCG estimularon la síntesis proteica.

Se concluye que progesterona, testosterona y hCG estimular la síntesis proteica pero, sólo las dos primeras inducen maduración, alterando el patrón proteico.

ACTIVACION BIFASICA DE MgATPasa POR ATP Y Mg. (Biphasic activation of MgATPase by ATP and Mg). Pedemonte C., Domenech C. y Bolegno H. Depto. Biología Molecular. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Rio Cuarto. Córdoba. Argentina.

Membranas de eritrocitos de rata obtenidos en un medio 30 mosmolar de fuerza iónica en presencia de 1mM de EGTA a pH 8 ("membranas standard") mostraron una activación bifásica de MgATPasa por ATP y Mg con dos Kms y dos Vms. Esta activación bifásica de MgATPasa por Mg también fue medida en membranas preparadas en distintos medios: ausencia y presencia de agentes quelantes; de cationes mono y divalentes; de muy baja fuerza iónica; y en membranas congeladas y descongeladas antes de medir la actividad enzimática. Las "membranas standard" calentadas a 50°C por distintos tiempos, también mostraron la activación bifásica. Todos los tratamientos disminuyeron la Vm sin cambios significativos en los Kms. La activación por Mg en presencia de 0.1mM de ATP o la activación por ATP en presencia de 0.2mM de Mg mostró sólo el componente de bajo Km. Membranas tratadas con Deoxicalato de Sodio o con N-Etil Maleimide, mostraron sólo el componente de mayor Km por activación con Mg. Serían necesarios mayores estudios para determinar si se trata de dos enzimas o de un sólo sistema con dos sitios funcionales.

TOLERANCIA FUNCIONAL A BARBITURICOS EN LA ALTURA

F. Pedraza, S. Montestruque y J. Alvarez Bioquímica, U. Cayetano Heredia, A. 5045, Lima, Perú Hemos encontrado que el efecto hipnótico de los barbitúricos está marcadamente disminuido en cobayos de gran altura. Además, estos animales despiertan con concentraciones de hexobarbital en cerebro, hígado y sangre 50% más altas. Las velocidades *in vitro* de o-demetilación de p-nitroanisol en fracción hepática de 15,000xg e hidroxilación de hexobarbital-2C¹⁴ en microsomas aislados son también idénticos. Las velocidades de disposición *in vivo* de hexobarbital-2C¹⁴ del cerebro, hígado y sangre son también idénticas en altura y nivel del mar. Más aún, la velocidad de acumulación de β -OH-hexobarbital (metabolito fundamental) en orina sigue curvas lineales idénticas en ambos grupos. Estos datos sugieren que no existen diferencias en el metabolismo y excreción de este barbitúrico entre ambos grupos de cobayos y por lo tanto, la menor respuesta hipnótica en altura no puede explicarse en términos de mayor excreción o metabolismo de la droga. Se ha encontrado que los umbrales de concentración de hexobarbital para despertar son diferentes, así los animales de altura muestran un umbral 50% más alto. Este hallazgo sugiere que estos cobayos presentan una "tolerancia funcional" a los barbitúricos, posiblemente relacionada a cambios en el sistema adrenérgico a nivel de SNC. Finalmente, encontramos también que el hexobarbital se asocia preferencialmente con la fracción mitocondrial del cerebro de cobayo. Este hallazgo favorecería la antigua hipótesis que los barbitúricos actúan a nivel mitocondrial y que en el cobayo de altura existen cambios que determinan una mayor resistencia mitocondrial al barbitúrico.

VARIACIONES EN LA COMPOSICION DE LAS ESPECIES DE CITOCROMO P-450 Y EN LAS ACTIVIDADES CATALITICAS DE DIFERENTES MONOOXIGENASAS EN RATAS SOMETIDAS A DESNUTRICION CALORICO-PROTEICA AGUDA (Alterations in cytochrome P-450 species and in the catalytic activities of several monooxygenases in rat with protein calorie malnutrition) Pedemonte J., Cervantes, P., Salazar, I. y Gil, D.L. Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las actividades *in vitro* de las monooxigenasas que hidroxilan naftaleno, anilina y benzopireno han sido estudiadas en microsomas de hígado de rata sometidas a desnutrición calórico-proteica. Dependiendo de la forma de expresión de los resultados estas son mayores o menores que las actividades de ratas normales. Electroforesis de microsomas de ratas desnutridas en geles de poliacrilamida muestran la desaparición de bandas en la región de PM 50.000-58.000 y la presencia de una banda predominante de PM 53.000. El espectro de máxima absorción de CO con citocromo P-450 reducido se desplazó a 452 m μ . La razón de los picos de máxima absorción para la unión de etiliscianuro a pH 7.7 fue 0.66 para microsomas de ratas desnutridas y 1.0 para microsomas de ratas normales. Estas y otras evidencias demuestran alteraciones en la composición de las especies de citocromo P-450 que podrían explicar la mayor eficiencia catalítica de algunas monooxigenasas durante la desnutrición calórico-proteica aguda.

Financiado por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional, Proyecto N° 8 535-791.

PRENILSINTETASAS DE FLAVEDO DE NARANJAS

(Prenylsynthetases from orange flavedo). Pérez, L.H., Chavet, L., Hashagen, U., Fernández, L.A. y Cori, O. Laboratorio de Bioquímica General. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. Universidad de Chile.

Las prenilsintetasas de flavedo de naranjas condensan isopentenilpirofosfato (IPP) con pirofosfatos alílicos de conformación E de 5 y 10 átomos de carbono, dando origen a mono- y sesquiterpenos tanto de conformación E como Z: Geranilpirofosfato (C₁₀ - E), Nerilpirofosfato (C₁₀ - Z), 2,6 - di E- Farnesilpirofosfato (C₁₅) y 2-Z-6-E- Farnesilpirofosfato (C₁₅).

La formación de los compuestos E y Z de 15 átomos de carbono, depende del metal bivalente presente en el medio de incubación. En presencia de Hg⁺² y Mn⁺² el cociente de productos E/Z es de 4, mientras que en presencia de Co⁺², el cociente aumenta a 9. En presencia de Ni⁺² se forma solamente el compuesto E. La enzima no es activa con Ca⁺².

La enzima se protege de la inactivación a 54° solamente por el complejo sustrato- o producto-metal. Este efecto de protección es semejante al observado en presencia de 5,5'-ditiobisnitrobenzoato.

CONTROL HORMONAL DE LA ACTIVIDAD DE RNA POLIMERASAS EN MEDULA OSEA DE RATA. (Hormonal control of RNA polymerases activity in rat bone marrow). Perretta, M., Garrido, F., Garrido, A., Ronco, A.M. y Johnson, C. INTA. Universidad de Chile.

La expresión génica puede ser regulada por hormonas en eucariotes, siendo la transcripción el nivel molecular más controlado.

En médula ósea de rata, tejido de rápida proliferación celular y de gran especialización, se demuestra que la eritropoyetina (EP) y testosterona (T) pueden controlar la actividad de RNA polimerasas, mientras la EP parece actuar preferentemente sobre la RNA Pol II la T lo hace sobre la I. En animales normales, anémicos, policitémicos y castrados se determina el efecto de ambas hormonas sobre la actividad de las RNA polimerasas, observándose la acción diferencial de ambas hormonas, lo que caracteriza un efecto sinérgico en el control de la síntesis de las globinas. Se presenta un modelo más completo de uno ya postulado. (Financiado en parte por proyecto B 311-792 del Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional. Universidad de Chile).

DNasa C: PURIFICACION Y EFECTO DE IONES METALICOS DIVALENTES. (DNase C: Purification and the effect of divalent metal ions). Picón-Nilla, E., Gil, A. y Melgar, E.-Centro de Investigación Instituto de Bioquímica y Nutrición, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

La DNasa C es una de las formas moleculares presentes en la DNasa pancreática (DNasa I), y difiere de la DNasa A en la sustitución de la histidina de posición 118 por una prolina. Constituye aproximadamente el 20% de la actividad total presente en la DNasa I y ha sido purificada por cromatografía en fosfocelulosa. La enzima obtenida mostró homogeneidad por electroforesis en acetato de celulosa.

La actividad de la DNasa C se ha estudiado a pH 5.6, 7.5 y 9.0, utilizándose diversos iones metálicos como activadores. Las mayores actividades específicas se observaron a pH 7.5 con Mn^{++} , Mg^{++} y Co^{++} . El Ca^{++} , Ba^{++} y Zn^{++} son activadores débiles de la enzima, sin embargo a pH 7.5 y 9.0 el Ca^{++} y el Ba^{++} producen un efecto sinérgico cuando se añaden a la reacción activada por Mg^{++} . A pH 5.6 el sinérgismo no es apreciable. Sinérgismo entre Ca^{++} y Co^{++} se observó a pH 7.5.

(Trabajo realizado con fondos de la OEA y un donativo del Programa RLA 75/047 PNUD/UNESCO).

INTERACCION DE LA LECTINA DE POROTO DE SOJA CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULA PANCREÁTICA DE RATA. (Interaction of Soybean Lectin with Rat Pancreatic Cell Plasma Membrane). PES SOA, R. B., HAMPE, M. M. V. - Instituto de Biociencias, Departamento de Bioquímica, UFRGS, BRASIL.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen vegetal o animal, capaces de ligarse a azúcares específicos de la superficie de las células haciendo que ellas se aglutinen.

Lectina de poroto de soja (Glycina max) obtenida por precipitación fraccionada con sulfato de amonio, fué purificada por cromatografía de afinidad con Sepharose N-caproil galactosamina. La pureza del material fué comprobada por electroforesis en gel de poliacrilamida y por inmunoelectroforesis.

La ligación de las proteínas purificadas a la superficie de las células pancreáticas aisladas y obtenidas por digestión enzimática fué demostrada através de técnicas de fluorescencia e inmunofluorescencia.

Las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de ligación de la proteína a la membrana celular, fueron establecidas con lectina marcada con I^{125} e incubadas con las células aisladas.

Por los resultados obtenidos se verificó que la ligación específica de la lectina a la membrana plasmática ocurre en los cinco primeros minutos de incubación a una temperatura de 30°C.

EFECTOS BIOQUIMICOS DE LA INSULINA SOBRE FRACCIONES SUBCELULARES DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA. (Biochemical effects of insulin on subcellular fractions from rat adipose tissue). Pimentel, E., González, C.A. y González-Mujica, F. Inst. Med. Exp., Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 50587, Caracas 105, Venezuela.

Los efectos de la insulina sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en tejido adiposo son poco conocidos. Se incubó tejido adiposo epididimario de rata en condiciones adecuadas a 37° durante varios tiempos. El tejido se fracciona, obteniéndose núcleos, mitocondrias y microsomas. La pureza relativa de cada fracción fué comprobada mediante microscopía de luz y electrónica y con enzimas marcadoras.

Se observa que la insulina: a) aumenta la actividad específica del RNA total y RNA nuclear, con orótico- C^{14} o fosfato- P^{32} , b) provoca cambios cuantitativos en las diferentes fracciones de RNA nuclear; c) aumenta la incorporación de glucosa- C^{14} y leucina- C^{14} a las proteínas totales de la célula; d) estimula la incorporación de glicina- C^{14} y fosfato- P^{32} a las fracciones mitocondrial y microsómicas después de 4 h y e) en ausencia de glucosa en el medio de incubación, aumenta la incorporación de precursores al RNA total y RNA nuclear.

"RESISTENCIA DE LOS COMPLEJOS ESTRADIOL-RECEPTORES UTERINOS A LA INACTIVACION "in vitro" POR LISOSOMAS". (Resistance of uterine receptor-estradiol complexes to "in vitro" lysosomal inactivation). Pino, A.M., Troncoso, R. y Sierralta, W. Lab. Bioquímica. INTA. Universidad de Chile.

En el análisis de la regulación de los niveles de receptores de estradiol en útero se ha estudiado exhaustivamente la génesis de dichos receptores en tanto que su degradación casi no ha sido considerada. Resultados preliminares nos indujeron a considerar que los procesos degradativos son importantes en la modulación de la actividad receptora y a asumir que los lisosomas uterinos participan en la acción degradativa.

Se obtuvo citosol y fracciones particuladas subcelulares de útero de ratas ovariectomizadas. Se determinó niveles de receptores de estradiol en cada fracción mediante la técnica de electroforesis en geles de agar. Para estudiar la inactivación de receptores de citosol y de núcleos se incubaron las fracciones correspondientes con lisosomas. Se observó que estos son capaces de inactivar receptores citosólicos y nucleares y que la presencia de estradiol en las mezclas de incubación limita el grado de inactivación. La acción "in vitro" de lisosomas sobre los receptores uterinos implica alteraciones estructurales.

CARBOCICLASAS EN LA BIOSINTESIS DE HIDROCARBUROS MONOTERPENICOS. (Carbocyclases in the biosynthesis of monoterpene hydrocarbons). Portilla, G. (Fac. de Ciencias, U. de Chile). Sánchez, G., M.V. Vial., Chavet, L., Rojas, C. Cori, O. (Fac. de Ciencias Químicas, U. de Chile).

En un extracto acuoso de flavedo de Citrus limonum las carbociclasas en presencia de Mn^{++} realizan la ciclación de los sustratos de cadena abierta 1-³H Nerilpirofosfato (NPP) o 1-³H geranilpirofosfato (GPP). Los productos son los hidrocarburos α pineno, β pineno, limoneno y γ terpineno, que varían en proporción en el curso de la purificación de la enzima. La enzima de DEAE-Sephadex guardada un año conserva un 5% de la actividad de NPP y 100% la de GPP, y no forma α pineno. Algunas preparaciones forman sabineno. La biosíntesis de γ terpineno no ocurre en presencia de $MPP-Co^{++}$. Se concluye que la actividad carbociclasica se debe a varias enzimas. Linalilpirofosfato podría constituir un intermediario común de estos sustratos. Resultados preliminares indican que no es sustrato γ , linalilmonofosfato presenta mayor IS_0/K_m que geranil y nerilmonofosfato. El análogo saturado del sustrato, citronelilpirofosfato es el mejor inhibidor.

El metal es importante: En ausencia de enzima GPP y NPP en presencia de Mn^{++} , Ca^{++} o Zn^{++} son transformados en alcoholes e hidrocarburos Ca^{++} y Mg^{++} son menos efectivos.

BIOSINTESIS DE POLIPRENIL-AZUCARES EN Artemia. (Biosynthesis of polyprenyl derivatives in Artemia. Luis A. Quesada Allue. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" Obligado 2490-Buenos Aires, Argentina.

La formación de doliquil-fosfato-azúcares ha sido detectada anteriormente en varios estadios del ciclo de vida de diferentes insectos. Por ello se quiso estudiar la aparición de similares actividades enzimáticas en crustáceos.

Se cultivaron quistes criptobióticos de Artemia salina en NaCl al 4% y se prepararon extractos parcialmente purificados que se incubaron con UDP(¹⁴C)Glc o GDP(¹⁴C)Man. El análisis de los productos radiomarcados se realizó mediante los métodos habituales para otros sistemas eucarióticos.

Se obtuvo así la biosíntesis de poliprenil-azúcares, por primera vez en Crustáceos. Se estudió su formación a los 0,30,80 minutos y 2,5, 8 y 16 horas de activar las gástrulas por hidratación. A los 80 min. ya aparecen poliprenil-azúcares radiomarcados. Este evento precedió la marcación de glicoproteínas, detectable a las 5 hs., en concordancia con otros autores que detectaron el ensamblaje de polisomas recién a las 4 hs. de inmersión. Como las células del quiste no se duplican ni crecen pero sí se diferencian, parece lícito suponer que las transferasas estudiadas estarían involucradas en procesos de morfogénesis.

MICRO-RADIOENSAYES DE ENZIMAS ACOPLABLES A HEXOQUINASA: GLICERALDEHIDO-3-P DESHIDROGENASA Y ENOLASA
Hexokinase-coupled enzyme micro-radioassays:
Glyceraldehyde 3-P dehydrogenase and enolase

Radojković, J. y Ureta, T. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Para medir enzimas aisladas de cantidades pequeñas de tejidos hemos buscado métodos con sustratos marcados por la alta sensibilidad de su medición. Sin embargo no siempre se dispone de sustratos radiactivos, o son caros, o la separación de producto y sustrato es engorrosa. Estos problemas pueden ser subsanados acoplando la enzima (directa o indirectamente) con hexoquinasa (HK) y glucosa marcada que se separa de glucosa-6-P en Dowex-1 (Radojković et al. Arch Biol Med Exper 11, 73, 1978). Preller y Ureta (Anal Biochem 76, 416, 1976) aplicaron el método a piruvato quinasa (PK). Se mostrará ahora el caso de gliceraldehido 3-P deshidrogenasa (GAPDH) y enolasa (ENO).

La reacción GAPDH (gliceraldehido-3-P + NAD + 1,3-diP-glicerato + NADH) se acopló a P-gliceratoquinasa + ADP. La reacción ENO (2-P-glicerato + P-enolpiruvato) se acopló a PK + ADP. En ambos casos el ATP formado se hizo reaccionar continuamente con ¹⁴C-glucosa + HK de levaduras produciendo ¹⁴C-glucosa-6-P que se aisló y cuantificó. Se lograron condiciones que permiten velocidades lineales y proporcionales a la cantidad de GAPDH y ENO usadas y capaces de detectar 0,1 mU de enzima. Los ensayos propuestos se ilustrarán por medición de dos isoenzimas de GAPDH y una forma de ENO separadas en CM-celulosa usando un único oocito de rana chilena. Se mostrará la posibilidad de utilizar el método para varias otras enzimas. (Financiado por PNUD/UNESCO, Servicio de Desarrollo Científico, U. de Chile y Organización de Estados Americanos).

REGULATION OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE FROM AMARANTHUS VIRIDIS, A C₄ PLANT: INHIBITION BY PYROPHOSPHATE AND ROLE OF -SH GROUPS. Raghavendra, A.S. y Vallejos, R.H.- Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

Phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase was purified from the leaves of *Amaranthus viridis*.

PEP carboxylase was activated by incubation with dithioerythritol and was inhibited by *o*-iodosobenzoate. The inhibition by *o*-iodosobenzoate was time- and concentration-dependent and followed apparent first order kinetics. The inhibition by *o*-iodosobenzoate was partially reversible by dithioerythritol. These results indicate the involvement of vicinal dithiols essential for PEP carboxylase activity.

Pyrophosphate inhibited PEP carboxylase. The inhibition could be noticed at a concentration as low as 0.1 mM and exhibited two trends: a) Primarily PPI competed with PEP; b) 1 mM or higher PPI chelated Mg²⁺. The Km (PEP) of the enzyme was increased both at 0.5 or 2.0 mM PPI while Km (Mg²⁺) was not affected at 0.5 mM PPI. The Ki of PPI increased from 0.45 mM at 2 mM MgCl₂ to 1.2 mM at 8 mM MgCl₂. PPI exhibited noncompetitive kinetics with bicarbonate. Glucose-6-phosphate activated the native enzyme but could not protect the enzyme from inhibition. Our data suggest that PPI can be a powerful inhibitor of PEP carboxylase *in vivo*. The relative levels of PPI/Mg in the cell may regulate the rate of enzyme reaction.

SEPARACION RAPIDA Y CUANTITATIVA DE LAS SUB-UNIDADES DE LA cAMP-PROTEINA QUINASA PRESENTE EN EXTRACTOS TISULARES (Rapid and quantitative resolution of cAMP-Protein Kinase subunits of tissue extracts). Rangel-Aldao, R.; Departamento de Ciencias Funcionales, Universidad de Carabobo, Núcleo Arauca, Maracay, Venezuela.

En eucariotes, el cAMP ejerce su acción reguladora activando la cAMP-proteína quinasa. La unión del cAMP con la holoenzima inactiva libera la unidad catalítica cuya actividad fosfo-transferásica es eventualmente la responsable de la acción de varias hormonas a nivel molecular. Como paso previo al estudio *in vivo* de estos procesos se desarrolló un método cuantitativo para separar las subunidades de la proteína quinasa.

La técnica consiste en la cromatografía de extractos crudos en minicolumnas (5x50mm) de Sephadex G25F (40mm) con una capa superior de Sephadex CMC50, equilibrados con buffer Mes a pH 6,2 y a 4°C. Bajo estas condiciones se separa casi instantáneamente la unidad catalítica de la holoenzima y la unidad reguladora (R). Luego de la elución, también se separa el cAMP libre del ligado a R. La proteína quinasa se ensaya en condiciones altamente selectivas que permiten distinguir esa actividad de otras fosfotransferasas presentes.

En experimentos en los que se simuló la acción hormonal añadiendo (3H)cAMP a extractos crudos de tejidos o de células en cultivo se comprobó la validez y versatilidad del método.

CULTIVO CONTINUO DE BACTERIAS LACTICAS. (Continuous culture of lactic bacteria). Raouf, A., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. y Suárez, E. -Centro de Referencia para Lactobacilos (CFRELA)-Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI). San Miguel de Tucumán, Argentina.

La finalidad de este estudio consiste en la determinación de las condiciones óptimas de trabajo, para obtener una concentración elevada de microorganismos, destinados a la elaboración de starters de yoghurt. Para realizar los ensayos se emplea *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842. Se cultiva a 45°C en un quimiostato cuyo volumen se fija en 500 ml, manteniendo microaerofilia, por pasaje de N₂ estéril.

Se usa un medio que contiene triptona, peptona, extracto de levadura y glucosa (LAPTe), con cantidades variables de esta última. Se encontró que para una concentración superior a 20 mM del azúcar, se producen oscilaciones en el crecimiento de los microorganismos, sin lograr alcanzar el estado estacionario. Por este motivo se utiliza concentraciones del sustrato límite, inferiores a la citada. Los criterios para establecer el estado estacionario son valores constantes de D₀ 560, peso seco de microorganismos y consumo total del sustrato.

Se comprobó que la hexosa suministrada se fermenta estequiométricamente a ácido láctico; se determinó glucosa enzimáticamente. La producción de ácido láctico L(+) y D(-) se investigó con enzimas específicas. Se ensayaron distintas velocidades de dilución (V), determinándose la V crítica y por lo tanto, la V específica de crecimiento máximo. Trabajando en el rango de V de dilución crítica se obtiene la mayor productividad de lactobacilos (biomasa/hora).

RECEPTORES DE DOPAMINA EN CEREBRO DE RATA (Dopamine receptors in rat brain) Piveros, N., Poat, J., Depto. de Fisiología y Farmacología, Universidad de Southampton, Inglaterra.

La actividad antipsicótica de los neurolepticos se atribuye al bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el sistema mesolímbico. La acción de estas drogas sobre receptores en el cuerpo estriado produce efectos secundarios importantes. En el presente trabajo se estudian los receptores en ambos sistemas ya que el conocimiento cabal de ellos permitiría el desarrollo de una droga de acción selectiva sobre los receptores mesolímbicos. La adición de dopamina a homogenizados de *n. accumbens* y cuerpo estriado produce un aumento del nivel de cAMP. A fin de caracterizar farmacológicamente los receptores y determinar los requerimientos estructurales para la acción de la droga, se investigó el efecto de análogos de dopamina sobre los niveles de cAMP en ambos núcleos. Los únicos derivados activos son aquellos que poseen grupos hidroxilos libres o monosustituidos. El protámero de estructura rígida ADTN es tan activo como la dopamina. Al determinar las características de la unión de 3H-ADTN a sinaptosomas se demostró la presencia, en ambos núcleos, de dos sitios de unión saturables. El efecto de diversas drogas sobre la unión de 3H-ADTN al sitio de alta afinidad puede correlacionarse con las variaciones que ellas producen en el nivel de cAMP y con su acción farmacológica. El sitio de baja afinidad no presenta las características de receptor. Los resultados sugieren que los receptores serían similares en ambas regiones del cerebro.

EFFECTOS COMPARATIVOS DE ALGUNOS PESTICIDAS SOBRE LOS LIPIDOS DE *Escherichia coli*. (Comparative effects of some pesticides upon *Escherichia coli* lipids). R. Rosas S.B., Secco M.C., Ghittoni N.E. - Depto. Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto 5800 Río Cuarto, Córdoba, ARGENTINA.

Si bien no se han dilucidado mecanismos de acción de pesticidas y sus productos de degradación sobre el metabolismo intermedio de los microrrganismos del suelo, la idea general es que deben afectar en primer lugar a los componentes de sus membranas. Nosotros cultivamos células de *Escherichia coli* en presencia de diversos pesticidas y observamos las variaciones en ácidos grasos y fosfolípidos empleando las técnicas clásicas de extracción de lípidos, cromatografía gaseosa y en capa delgada. Todos los pesticidas ensayados aumentaron la relación entre ácidos grasos saturados y no saturados. También todos ellos elevaron la concentración total de fósforo lipídico, pero mientras DDT disminuyó la relación entre fosfolípidos neutros y ácidos, Dieldrin tuvo efecto opuesto y Parathion no afectó dicha relación. Estos hallazgos indican que según el pesticida presente en el medio, se ven alteradas distintas etapas en el metabolismo de los fosfolípidos de *E. coli*. El resultado de la alteración sería importante para fluidez, permeabilidad y actividades enzimáticas de la membrana.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE CROMATINA DE HUEVO NO FECUNDADO DE ERIZO DE MAR. (Chromatin protease activity from unfertilized sea urchin eggs). Sánchez, L.; Ponce, O.; Raddatz, C. y Merino, V. Depto. de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Ha sido reportado que cromatina de varias células somáticas contienen actividades proteolíticas que degradan proteínas cromatínicas. No se conoce la existencia de estas enzimas en células altamente diferenciadas como huevo y espermio. Por ello, se ha investigado y caracterizado parcialmente esta enzima en huevos de erizo no fecundado en un intento de investigar su rol en fertilización y en estado precoz de desarrollo embrionario. La fracción nuclear obtenida por un tratamiento combinado con Triton X-100 y centrifugación diferencial en un gradiente discontinuo de sacarosa, contiene una actividad proteolítica que degrada caseína, polilisina y poliarginina. La cromatina posee el 67% de esta actividad, la que fue parcialmente solubilizada con NaCl 0.7M. La enzima soluble tiene un pH óptimo de 8, es activa en urea 5M y es reversiblemente inactivada por NaCl 2M. Un aumento de la actividad sobre caseína y proteínas cromatínicas es obtenido en presencia de bisulfito de sodio 30mM. Es inactivada parcialmente por TLCK y totalmente por PMSF. La proteólisis de cromatina por esta enzima es detectada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Se concluye que en cromatina de huevo no fecundado existe una enzima proteolítica con características de tripsina que cataliza la hidrólisis de determinadas proteínas cromatínicas.

ENZIMAS FIJADORAS DE CO₂ EN LA HALOFILA MODERADA

VIBRIO COSTICOLA. (CO₂ - fixing enzymes in the moderate halophile, *Vibrio Costicola*). Salvarrey, M.S. y Gazzulo, J.J. - Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, Rosario, Argentina.

La bacteria halófila moderada *Vibrio costicola* es capaz de crecer entre 0.5 y 2.2 a 3.5 M NaCl, dependiendo de la fuente de carbono; la concentración salina asociada a las células es variable y similar a la extracelular (Kushner y col.).

Empleando un método radioquímico hemos determinado la naturaleza de las enzimas potencialmente fijadoras de CO₂ presentes en *V. costicola* desarrollado en medio complejo con NaCl 1 M a 30 °C. Se encontró una alta actividad de carboxiquinasa fosfoenolpirúvica dependiente de ADP (PEPCK), una actividad menor de carboxilasa fosfoenolpirúvica (PEPC) y una baja actividad fijadora de CO₂ atribuible a la enzima málica NADP dependiente; no se encontró carboxilasa pirúvica. Las enzimas han sido separadas y parcialmente purificadas. PEPC es activada por acetil-CoA e inhibida por L-aspartato; PEPCK es activada sinérgicamente por Mg²⁺ y Mn²⁺. Ambas enzimas, en especial PEPC, son inhibidas por concentraciones salinas similares a las supuestamente intracelulares. Estas propiedades son similares a las de las enzimas fijadoras de CO₂ presentes en una *Pseudomonas marina*, halófila leve, previamente estudiada en nuestro laboratorio.

EFFECTO DE LA HIDROLISIS DE FOSFOLIPIDOS DE MEMBRANA SOBRE LA UNION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (HC) A MICROSOMAS. (Effect of hydrolysis of membrane phospholipids on the specific binding of human growth hormone to microsomes). Sanchez, S.H., Vidal, J.C. y Paladini, A.C. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Depto. de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.-

El tratamiento de microsomas de hígado de rata hembra adulta con distintas fosfolipasas incrementa la unión específica de la HC humana a los mismos. Se usaron fosfolipasas de pancreas, de veneno de *B. Neuwiedii* y de *C. Welchii*.

Los aumentos de unión varía del 30 al 100% y representan mayor capacidad sin modificación de afinidad de los sitios. Los nuevos receptores tienen igual sensibilidad a la tripsina que los preexistentes.

0.2 a 1% de miristoil lecitina agregada al medio incrementa 100% la unión específica; 5% la anula. 5% de seroalbúmina anula el efecto de la fosfolipasa A₂.

No se registran cambios en los espacios intraventriculares durante el tratamiento con las fosfolipasas.

Medidas de la enzima marcadora 5'nucleotidasa indican que la incrementación de unión específica no puede explicarse por una apertura de vesículas invertidas de la membrana plasmática.

En microsomas de hígado y riñón de coneja se observan efectos similares a los descriptos.-

ALGUNAS PROPIEDADES DE LA FOSFORILASA DE TUBERCULO DE PAPA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR AGREGADO. (Some properties of a primer independent isoenzyme of potato tuber phosphorylase). Sivak, M. y Tandecarz, J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (Universidad de Buenos Aires).

El propósito de esta comunicación es describir: a) el comportamiento electroforético de las fosforilasas de una preparación no sedimentable de tubérculo de papa y b) algunas propiedades diferenciales de la isoenzima, cataliza la transferencia de ^{14}C glucosa a partir de ^{14}C glucosa-1-P a material insoluble en TCA, en ausencia de polisacárido agregado. Por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio y urea, el producto radioactivo insoluble en TCA migra hacia el ánodo.

La actividad de fosforilasa independiente de aceptor agregado puede separarse de las otras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Por cromatografía en DEAE-celulosa se obtienen 3 picos de actividad enzimática, pero solamente uno tiene actividad independiente de aceptor externo, el que eluye a 0.28 M de CLK. En esta fracción coexisten ambas actividades, y a través de diferentes etapas de purificación no se pudo separar la actividad independiente de aceptor externo de la actividad de fosforilasa clásica. Sin embargo, es posible medir una actividad en presencia de la otra aprovechando las diferentes propiedades que poseen en lo que se refiere a: a) requerimiento de aceptor exógeno; b) afinidad por glucosa-1-P; c) sensibilidad a la inactivación por temperatura; y d) rango de pH.

BIOSÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE COLÁGENO EN FIBROBLASTOS DE EMBRIONES DE COBAYO (*Biosynthesis and processing of collagen in guinea pig embryo fibroblasts*).

S. Sanojara, G.M. Machado-Santelli, H.F. Andrade Jr., Y R. Brentani. Laboratorio de Oncología Experimental da Fac. Medicina da Univ. São Paulo e Fundação Centro de Pesquisas em Oncologia - São Paulo - Brasil.

Colágeno después de sintetizado es secretado por fibroblastos en el medio de cultivo bajo forma de una molécula precursora mayor, el procolágeno. Este es hidrolizado en sus dos extremidades por proteasas específicas de lo que resultan dos cadenas proteicas maduras, $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

Tal proceso ha sido estudiado en cultivos primarios de fibroblastos de embriones de cobayo después de la incorporación de prolina- ^3H en diferentes intervalos de tiempo. El medio conteniendo las moléculas de procolágeno radioactivas fué transferido para un cultivo equivalente conteniendo exceso de prolina no radioactiva. Además del análisis del procesamiento de las moléculas secretadas del procolágeno, se estudió también el procesamiento de esas moléculas en la camada celular. Los productos de estos experimentos fueron analizados en geles de SDS-poliacrilamida y fluorografía donde se observó la presencia de por lo menos 5 bandas correspondientes a los diferentes precursores. En los experimentos de "chase" con prolina no radioactiva se observó una reducción cuantitativa de los precursores con el correspondiente acúmulo de los productos finales $\alpha 1$ y $\alpha 2$.

La interpretación de estos datos ponen de relieve que no existe un orden preferencial de acción de las peptidasas de procolágeno sobre los péptidos finales.

ESTUDIOS SOBRE EL PROCESAMIENTO DE tRNA EN OOCITOS DE XENOPUS LAEVIS (Studies on tRNA processing in *X. laevis* oocytes) Solari, A., y Allende, J.E.; Dpto. Bioquímica, Facultad de Medicina (Norte), Universidad de Chile.

Todos los RNA de eucariotes sufren modificaciones post transcripcionales que tienen importancia en la estructura y función de estas macromoléculas y que implican instancias de posible regulación de la expresión génica celular. Nuestro trabajo se ha concentrado sobre dos reacciones de procesamiento del tRNA en oocitos de *X. laevis*, la reparación del terminal CCA en la posición $3'$ por medio de la tRNA nucleotidil transferasa y la metilación de las bases nucleotídicas por la tRNA metil transferasa. Avanzando en el trabajo ya presentado sobre la tRNA nucleotidil transferasa, se ha estudiado la ubicación celular de esta enzima logrando determinar que los núcleos de oocitos contienen alrededor del 40% de la actividad estando el resto en el citoplasma. Las enzimas de ambos compartimentos tienen similar comportamiento cromatográfico y dependencia del pH del medio. Estudios sobre la metilación de tRNA se realizaron utilizando (^3H)S-adenosil-metionina y tRNA de *E. coli*. Se han logrado caracterizar por cromatografía en DEAE-celulosa tres fracciones que se diferencian además por su respuesta a la espermidina por sus pesos moleculares y por su especificidad de sustrato. Mediciones en extractos de núcleos aislados demuestran que este organelo tiene una tRNA metilasa que se activa 8-10 veces por la adición de 1 mM espermidina en lo que se diferencia de la enzima citoplasmática que es inhibida por esta poliamina. Auspiciado por: OEA, Universidad de Chile, Fundación Ford y PNUD/Unesco proyecto RLA 78/024.

RITMO CIRCADIANO DE LA CETOGENESIS EN HIGADO DE RATA. (Circadian Rhythm for ketogenesis in rat liver). Souza, B.C. de, Wajnberg, S., Gonçalves, E., Perry, M.L.S. e Dick, T. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Albino rats kept at 20°C room temperature, on a 12 hs/light/dark cycle and on an "ad libitum" feeding schedule present circadian variations of their free fatty acid (FFA) blood levels and of their hepatic glycogen content. The possibility of a synchronous variation of the metabolism of ketogenic bodies (KB), was investigated by measuring the following parameters: KB blood levels (every 6hs), glycemia, ketogenic activity of liver homogenates (in the presence of palmitate, ATP and CoA), FFA blood levels and hepatic glycogen content (every 3 hs).

Hepatic glycogen levels were highest at 9:00 AM and lowest at 9:00 PM, and FFA blood levels presented an opposite variation. Glycemia attained a maximum at 12:00 PM and a minimum at 12:00 AM. Blood KB levels presented an inverse variation. Ketogenic activity of liver homogenates had a biphasic variation with peaks at 6:00 AM and 6:00 PM and minimums at 12:00 PM and between 9:00 and 12:00 AM.

Therefore, we were able to detect circadian correlations between hepatic glycogen and blood FFA levels on one hand, and between liver ketogenic activity and blood glucose and KB levels on the other.

Supported by PROPESP-UFGRS, Brazil

CARACTERISTICAS DE LA SINTESIS DE RNA EN VIRUS VACUNA. (Properties of RNA synthesis on Vaccinia virus). Spencer, E.* y Hurwitz, J.† INTA. Universidad de Chile*, Albert Einstein College of Med. Yeshiva University†.

Virus vacuna purificado tiene la propiedad de transcribir RNA "in vitro" en presencia de ribonucleotidos trifosfato, Mg^{+} y DTT. El RNA producido tiene "cap" y es poliadenilado. La síntesis de RNA depende de la hidrólisis de ATP a ADP y P parece estar relacionada con la elongación del RNA y no con su iniciación, como ha sido informado anteriormente. Se estudió la relación entre la síntesis de RNA y la acción de dos fosfohidrolasas dependientes de RNA que tienen capacidad de desestabilizar DNA, formando DNA de simple hebra a partir de DNA nativo.

Las enzimas (RNA polimerasa y las fosfohidrolasas) fueron purificadas. La RNA polimerasa tiene propiedades semejantes a algunas RNA polimerasas de eucariotes. Solo usa como template DNA de simple hebra o formas "super helical" de plasmidio PMB 9 o DNA QFI de phago ϕ x 174. El efecto de otras enzimas de virus vacuna en la actividad de la RNA polimerasa sobre preparaciones de cromatina viral, sugiere que la transcripción requiere de otros factores proteicos.

CINETICA DEL TRANSPORTE DE L-¹⁴C]LEUCINA EN LEVADURAS. (Kinetics of L-¹⁴C]leucine transport in yeasts). Stoppani, A.O.M., Ramos, E.H., Conches de Bongioanni, L. Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La cinética del transporte de L-¹⁴C]leucina en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *S. ellipsoideus*) involucra dos sistemas (S-1 y S-2) caracterizados por los parámetros cinéticos $K_{T,1}$, $K_{T,2}$, J_1 y J_2 . S-1 es un sistema de alta afinidad y baja velocidad mientras que S-2 es un sistema de baja afinidad y alta velocidad. Los coeficientes cinéticos secundarios derivados de K_T y J muestran valores compatibles con la operación de un doble sistema de transporte. Cuando se aumenta la carga de energía metabólica celular por preincubación con glucosa, disminuye $K_{T,2}$ pero $K_{T,1}$ no varía. La activación metabólica aumenta J_1 y J_2 aproximadamente 10 veces y entonces $J_2 > 4J_1$. Con levadura metabólicamente activa y concentraciones de L-¹⁴C]leucina < 0.01 mM, la entrada se produce por S-1 mientras que con concentraciones ≥ 1.0 mM la entrada se produce por S-2, de manera que S-1 y S-2 no suman sus actividades. Ambos sistemas son concentrativos. Los inhibidores de la ATPasa de la membrana (DCCD, etc) inhiben a S-1 (no a S-2) mientras que los ionoforos inhiben ambos sistemas. Durante el período inicial de entrada, se observa una fase de cinética muy rápida ("entrada inicial") seguida por el estado estacionario. Con levadura ayunada y concentraciones altas de L-¹⁴C]leucina, la "entrada inicial" incide sobre el valor de las constantes cinéticas interfiriendo con la interpretación del mecanismo de operación de S-1 y S-2.

"BIOSINTESIS Y TRANSFERENCIA DE OLIGOSACARIDOS UNIDOS A ASPARAGINA EN LAS GLICOPROTEINAS". (Biosynthesis and transfer of asparagine-linked oligosaccharides). Staneloni, R.J., Ugalde, R.A. y Leloir, L.F. Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Obligado 2490, 1428 Buenos Aires.

Estudios previos han demostrado que los microsomas de hígado catalizan la síntesis de un dolicol difosfato-oligosacárido que contiene 2 acetylglucosaminas, 9 manosas y 1-3 glucosas. Este oligosacárido es transferido en block a un polipéptido y luego procesado para dar lugar a la formación de los diversos sacáridos que se encuentran unidos a asparagina en las glicoproteínas. Se ha desarrollado un sistema para cromatografía en papel que permite separar los oligosacáridos con 3, 2 y 1 glucosas. Con este procedimiento se ha podido establecer que solo el dolicol difosfato oligosacárido que contiene las tres glucosas sirve como dador para la transferencia a proteína. Además se comprobó que en la biosíntesis del oligosacárido las tres glucosas se adicionan usando dolicol difosfato-glucosa como dador. También se ha estudiado la acción de las glucosidasas específicas que hidrolizan las glucosas inmediatamente después de la transferencia a proteína.

ESTRUCTURA MOLECULAR DEL FOSFOLIPIDO DML COMO MODELO DE MEMBRANAS. (Molecular structure of the phospholipid DML as a model for membranes). Suwalsky, M.- Departamento de Polímeros, Instituto de Química, Universidad de Concepción.

Los fosfolípidos son los principales constituyentes de las membranas biológicas y determinan su naturaleza de bicapa.

La estructura molecular de la dimiristoil-lectina (DML) fue estudiada por difracción de rayos X. Muestras orientadas fueron analizadas en función del grado de hidratación a una temperatura constante ($21^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$).

Las moléculas del fosfolípido presentan una estructura de bicapa y cambian de conformación y modo de empaquetamiento según el grado de hidratación. Con un bajo contenido de agua las moléculas presentan las cadenas hidrofóbicas totalmente extendidas y paralelas entre sí, mientras que los grupos polares fosforilcolina están inclinados casi perpendicularmente originándose con las moléculas un sistema de atracciones electrostáticas que estabilizan la estructura. La celda unitaria es ortorómbica, con $a = 54.8$ Å (que corresponde al ancho de la bicapa), $b = 8.64$ Å y $c = 9.88$ Å (separación lateral de las moléculas). A medida que aumenta gradualmente la hidratación los grupos fosforilcolina tienden a abrirse, lo que eventualmente conduce a la ruptura de las uniones electrostáticas y, consecuentemente, al desorden molecular. A una hidratación máxima las moléculas se encuentran totalmente extendidas. En este estado, el ancho de la bicapa es de 64 Å. Los cambios descritos son reversibles.

FORMAS MOLECULARES INTERCONVERTIBLES DE FOSFODIESTERASA DE NUCLEOTIDOS CICLICOS EN GLOBULOS ROJOS. (Interconvertible molecular forms of cyclic-nucleotide phosphodiesterase in red blood cells).

Téllez-Iñón, M.I. and Torres, H.N.
Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Fundación Campomar. Obligado 2490 - 1428 Buenos Aires -Argentina.

El sistema soluble de fosfodiesterasa de glóbulos rojos tiene capacidad para hidrolizar cAMP y cGMP cuando se realizan los ensayos a bajas concentraciones del nucleótido cíclico.

La purificación parcial de los extractos por filtración en Bio-gel A 1.5m mostró la presencia de dos actividades enzimáticas con capacidad de hidrolizar cAMP. La actividad asociada al componente de peso molecular mayor tiene actividad hidrolítica sobre cGMP. Por lo contrario la actividad asociada al componente de menor peso molecular no hidroliza a este nucleótido. La recromatografía de la fracción de mayor peso molecular en el mismo sistema, muestra la formación de un componente de bajo peso molecular sin capacidad para hidrolizar cGMP, mientras la recromatografía de la fracción de bajo peso molecular genera un componente de alto peso molecular con capacidad para hidrolizar ambos nucleótidos.

Estos resultados sugieren que el estado de agregación de la enzima determina su especificidad por el nucleótido cíclico.

CARACTERIZACIÓN DE DNA POLIMERASA DE PSEUDOMONA BAL-31. (Characterization of a DNA polymerase from *Pseudomonas* BAL-31). Valdés, F.J., Vicuña, J. R., Medina, M. A. y Yudelevich, A. - Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Celular, Universidad Católica de Chile.-

Hemos detectado y purificado a homogeneidad a partir de *Pseudomonas* marina BAL-31, una DNA polimerasa DNA dependiente. La preparación final muestra niveles muy bajos de actividad exonucleolítica y se encuentra libre de actividad endonucleolítica. Por centrifugación en gradientes de glicerol se estimó para esta enzima un peso molecular nativo de 110.000 d. En geles de acrilamida en condiciones denaturantes la polimerasa migra como un solo polipéptido cuyo peso molecular es de 105.000 d. Como todas las demás DNA polimerasas, esta enzima requiere un metal divalente para su acción catalítica. Este requerimiento es satisfecho por Mg^{2+} o Mn^{2+} en concentraciones cercanas a 1mM. Cationes monovalentes muestran un efecto inhibitorio a concentraciones sobre 50mM. Esta enzima es similar a la DNA polimerasa I de *E.coli* en algunas propiedades como peso molecular, resistencia a N-etilmaleimida y capacidad para extender un polinucleotido de una hebra en ausencia de proteínas auxiliares.

Financiado por DIUC.-

GLICOPROTEINAS DEL PLASMA SEMINAL HUMANO

Glycoproteins from Human seminal plasma

Tartorella, H. - Dpto. Bioquímica, Inst. Biociencias, UFRGS, P. Alegre, RGS. Brasil. Becaria de CAPES.

Mazzini, M.N. y Cerezo, S.A. - Dpto. Química Orgánica Fac. Ciencias Exactas y Naturales - UBA - Argentina.

El estudio de las macromoléculas de plasma seminal humano puede aportar datos sobre problemas de infertilidad. Algunas glicoproteínas del plasma tienen oligosacáridos con unidades terminales no reductoras con configuración α -D-glucosa o α -D-mano u otras estéricamente relacionadas. Se fraccionó el plasma seminal humano dializado usando Concavalina A-Sepharose 4B.

Se separan: I- moléculas que no interaccionan con Con A,
II- que interaccionan débilmente y
III- que interaccionan fuertemente.

Cada uno de estos tipos se dividió en fracciones de acuerdo al diagrama de elución. El estudio de estas fracciones indicó:

- Las macromoléculas de tipo II y III son glicoproteínas. La fracción de la clase I estudiada posteriormente también es una glicoproteína. Es notable la ausencia de proteínas.
- Son glicoproteínas de bajo peso molecular y tendencia a la agregación.
- La composición en aminoácidos varía para todas las fracciones y subfracciones obtenidas de las mismas.
- Los hidratos de carbono están formados casi exclusivamente por hexosas y contienen cantidades menores de hexosaminas y ácido siálico.

CAMBIO EN LA ACTIVIDAD DE SISTEMAS PROTECTORES DE LA LIPOPEROXIDACION EN DESNUTRICION EXPERIMENTAL. (Changes in the activity of protective system against lipoperoxidation in experimental malnutrition). Valenzuela, A., Hoffman, J., Fernández, N. y Guerra, R. INTA. Universidad de Chile.

La lipoperoxidación es iniciada por los radicales libres del oxígeno: superóxido e hidroxilo. Muchas enzimas generan estos radicales exponiendo a la célula a la lipoperoxidación. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSHPx) participarían en la protección de la célula contra este daño. SOD y CAT formarían un sistema antioxidante y GSHPx un sistema detoxificador. En la desnutrición se producen alteraciones en la estructura y función de los glóbulos rojos que estarían relacionadas con fenómenos lipoperoxidativos. Utilizando este modelo se estudió el cambio de actividad de las enzimas SOD, CAT y GSHPx y los niveles de lipoperoxidación en glóbulos rojos. Se observó que la desnutrición disminuye la actividad de CAT y aumenta la de GSHPx y los niveles de lipoperoxidación. La baja actividad de CAT facilitarían la lipoperoxidación al disminuir el efecto antioxidante del sistema SOD-CAT. El aumento de GSHPx sería una respuesta adaptativa al aumento de la lipoperoxidación.

REGULACION DE LA AROMATIZACION TESTICULAR POR LH. (LH regulation of testicular aromatization). Valladares, L.* y Payne, Anita†. INTA. Universidad de Chile*. Reproductive Endocrinology Program, Dept. Ob-Gyn. and Biological Chemistry. The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109*.

No se conoce bien el sitio inra testicular de síntesis de estrógenos y cuál es la gonado trofina que regula la aromatización testicular.

En este estudio se demuestra que el tratamiento IN VIVO de ratas adultas con hCG por 6 días induce aromatización de testosterona (T) en homogenizado testicular, cuando este se incuba con T tritiada. No se pudo detectar presencia de E₁-H³ o E₂-H³ en ratas tratadas con FSH. Pero, en aquellas inyectadas con hCG se producen 238 pg de E₂-H³ por testículo. No se obtiene E₁-H³. En homogenizados de tejido intersticial y de túbulo seminíferos de ratas tratadas con hCG, solo el primero es capaz de producir E₂-H³ a partir de T-H³. Experimentos realizados en células de Leydig purificadas por gradiente de Metrizamida demuestran que la aromatización de T-H³ a E₂-H³ puede ser estimulado por hCG IN VITRO.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF TWO CATFISH HAEMOGLOBINS FROM AMAZON RIVER. - Vieira, H.F., Vieira, M.L.C., Portus, M.L.G., and Focesi, Jr. A. - U.F.C., INPA and Depto Bioquim., IB - UNICAMP - Brazil.

Several fish species are generically polymorphic at their haemoglobin loci, and the biological significance of this heterogeneity is not ascertained. To study such a phenomenon two fish species from the same family (DORADIDAE) were chosen: i) Oxydoras sp a slow-swimming, bottom dwelling fish which lives in Amazon River deeper-water and presents a single haemoglobin, and ii) Megalodoras sp with same characteristic but that lives in shoreline areas of the river and has 4 haemoglobins.

The oxygen binding equilibrium curves from the haemolysate of the fishes showed the following: Oxydoras sp haemolysate presented oxygen affinity constant in the stripped form at pH 7 of about P₅₀ = 0.36 Torr and small increase with the pH (Bohr effect = -0.14) whereas Megalodoras sp present P₅₀ = 0.33 Torr at pH 7 and Bohr effect even lower of -0.03. In the presence of ATP the P₅₀ values become 1.58 Torr and 0.67 Torr at the same pH and the Bohr effect -0.60 and -0.42 of Oxydoras sp and Megalodoras sp respectively.

The findings suggest that the oxygen disposal and the metabolic activity of the fishes should play an important role in the functional properties of the haemoglobin.

Supported by FAPESP, CAPES.

AI SLAM I EN T O Y S E CU EN C I A D E B A S E S D E L O S G E N E S P A R A tRNA^{eu} DE LEVADURAS. (Isolation and nucleotide sequence of the yeast tRNA^{eu} genes). Venegas, A., Quiroga, M., Zaldivar, J. y Valenzuela, P. - Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Biología Celular, Universidad Católica, Santiago.-

A partir de un banco genético de 400 colonias conteniendo plasmidios recombinantes con genes de tRNA de levaduras se detectaron 14 clones diferentes que dieron señal positiva por hibridización con ¹²⁵I-tRNA^{eu} de levaduras. El peso molecular de los insertos de DNA de levaduras varió entre 2.45 x 10⁶ y 14 x 10⁶ daltons. Uno de los clones, PYL18, se analizó en detalle.

El gen para tRNA^{eu} se localizó en base a mapa físico, usando diferentes enzimas de restricción y posterior hibridización de los fragmentos con tRNA^{eu}. La presencia del gen para tRNA^{eu} se confirmó por análisis de secuencia de DNA mediante el método químico de Maxam y Gilbert.

La región nucleotídica que codifica para este gen no es colineal con aquella del tRNA^{eu}. Un intron de 33 pares de bases interrumpe la secuencia codificadora del DNA (en sentido 3'-- 5') justo una base después de la región que codifica para el anticodon. En base a estos resultados hemos postulado una estructura secundaria para el precursor de tRNA^{eu} en la cual el brazo del anticodon se extiende con la formación de pares entre bases del anticodon y bases de la secuencia intercalada.

Resultados preliminares del análisis del mapa físico de otro clon sugieren que la longitud de los intrones de los genes de tRNA^{eu} puede ser variable y sin embargo, las secuencias vecinas al gen parecen conservarse sin grandes variaciones.

EVIDENCIAS PRELIMINARES DE LA EXISTENCIA DE 3 NADH DESHIDROGENASAS EN MITOCONDRIA DE PHASEOLUS VULGARIS. (Preliminary evidence of three NADH dehydrogenases in Phaseolus vulgaris mitochondrias). Villa, C., Vega, P. Oestreicher, G. Dep. de Bioquímica, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Estudios en mitocondrias de phaseolus vulgaris han evidenciado la existencia de dos NADH deshidrogenasas ubicadas a ambos lados de la membrana mitocondrial interna. La actividad enzimática se midió por el método del ferricia nuro y NADH citocromo c reductasa tanto en mitocondrias intactas como sonicadas.

En mitocondrias intactas los pH óptimos fueron 6,9 y 8,4, en cambio en las sonicadas los pH óptimos fueron 6,9, 7,8 y 8,4.

La separación de las membranas mitocondriales permite obtener una fracción soluble, una fracción liviana de membrana externa y una fracción pesada de vesículas de membrana interna cuyos pH óptimos son 6,9, 8,4 y 7,8 respectivamente. La actividad enzimática pH 6,9 es insensible a rotenona y las actividades a pH 7,8 y 8,4 son sensibles a rotenona.

Financiado por proyecto N°B-629 791 de la Oficina de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional, Universidad de Chile. El poroto phaseolus vulgaris variedad apollo fue proporcionado por la estación Experimental de la Platina. INIAP Minist. Agricult.

AI SLAM I EN T O Y AN AL I S I S M O L E C U L A R D E L O S G E N E S D E tRNA^{arg} D E L E V A D U R A S. (Isolation and molecular analysis of yeast tRNA^{arg} genes). Villanueva, J., Venegas, A., Yudelevich, A. y Valenzuela, P.- Departamento de Biología Celular, Laboratorio de Bioquímica, Universidad Católica de Chile.-

Una colección de 3.700 clones bacterianos (*E.coli*) que contienen plasmidios recombinantes con segmentos de DNA de levaduras (*S.cerevisiae*) han sido analizados por la presencia de genes de tRNA. A partir de éstos, usando la técnica de hibridización en colonias, hemos aislado 19 clones que hibridizan con ¹²⁵I-tRNA^{arg}. Los plasmidios híbridos de cada una de estas colonias fueron aislados y analizados con endonucleasas de restricción e hibridización con ¹²⁵I-tRNA^{arg}. Los resultados indican que hay 6 fragmentos diferentes de DNA de levaduras que poseen genes de tRNA^{arg}. Estos poseen un tamaño que varía entre 5,4 x 10⁶ y 10 x 10⁶ daltons. Uno de estos genes, localizado en un fragmento EcoR_I de 2,5 x 10⁶ daltons ha sido analizado en detalle. El gen de tRNA^{arg} ha sido localizado en un fragmento de 300 pares de bases obtenido por digestión con la enzima Alu I. Este segmento se ha aislado en forma preparativa por electroforesis en geles de agarosa. El análisis de su secuencia de bases está en progreso.

Financiado por DIUC y NIH.

RELACION ENTRE TRANSPORTE ACTIVO DE AMINOACIDOS Y SISTEMAS DE ENERGIA ACOPLADOS EN LEVADURAS. (The relationship between active amino acid transport and energy coupling systems in yeasts). Wainer, S.R. y Ramos, E.H. Instituto de Química Biológica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En levadura *Saccharomyces carlsbergensis*, cepa silvestre, con baja y alta carga energética, la entrada de L-[¹⁴C]leucina es mediada por dos sistemas de transporte de acuerdo a los parámetros cinéticos medidos. En su mutante citoplasmática (rho⁻) los dos sistemas de transporte pueden ser determinados en condiciones de alta carga energética.

En la cepa silvestre el consumo de D-glucosa permite un transporte concentrativo del aminoácido. El propionaldehído permite la entrada contra gradiente aún en condiciones de respiración celular inhibida. En la mutante el consumo de D-glucosa permite un transporte activo dependiente exclusivamente de energía citoplasmática no mitocondrial.

Los desacoplantes m-clorofenil hidrazona del cianuro de carbonilo (CCCP), trifluorometoxifenilhidrazona del cianuro de carbonilo (FCCP), 2,4 dinitrofenol (DNP) y pentaclorofenol (PCP) inhiben el transporte activo de L-[¹⁴C]leucina en las dos levaduras, la inhibición es mayor sobre la translocación que sobre la entrada muy temprana.

En las células sometidas al proceso de shock osmótico se observa una reducción en la entrada del aminoácido, en ese caso el aporte energético residual no es afectado por el CCCP y el FCCP y sólo parcialmente por el DNP y el PCP.

SECRECION DE MSH DURANTE LA PSEUDOPRENEZ EN LA RATA. (MSH secretion during pseudopregnancy in the rat). Volosin, M. y Celis, M.E. Instituto de Investigaciones Médicas M. y M. Ferreyra. Córdoba, Argentina.

La función fisiológica de las melanotrofinas (MSH) en los mamíferos permanece aun sin dilucidarse. Ha sido demostrado que MSH sufre variaciones durante el ciclo sexual y preñez. El presente trabajo se realizó con el fin de conocer el perfil de secreción de MSH durante la pseudopreñez (PSP). Esta se induce por estimulación vaginal (EV) en la mañana del estro (día 0 de PSP) y se determinan los valores de MSH en suero y el contenido en hipófisis durante las 24 hrs. posteriores a la estimulación vaginal y en los días 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 de PSP. Se dosa el MSH por medio de un ensayo biológico, utilizando un α -MSH sintético como estándar. Una hora después de la EV el MSH en suero se encuentra aumentado con respecto a los controles. Durante el curso de la PSP el MSH presenta, en los días y horarios estudiados, una variación cíclica, tanto en suero como en hipófisis, con dos picos uno diurno y otro nocturno. Estas observaciones dan la posibilidad de que el MSH esté involucrado de algún modo en la PSP. El perfil de variaciones de MSH durante los días estudiados es muy similar al observado por otros autores para prolactina con la diferencia que los picos de MSH son anteriores a los de esta. Se propone un mecanismo por el cual el MSH estaría involucrado junto con prolactina en la mantención de la PSP.

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA BETA-LACTAMASA EXTRACELULAR DE *STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS*. (Purification and characterization of an extracellular beta-lactamase of *Streptomyces antibioticus*). Zaror, M.I. y Garcés, E.-Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médico-Biológicas, Universidad de Concepción.

Las beta-lactamasas son enzimas que tienen la propiedad de hidrolizar la unión carbanida (C-N) de los antibióticos beta-lactámicos y constituyen uno de los mecanismos de resistencia de los microorganismos que las producen.

Se purificó una beta-lactamasa extracelular de *Streptomyces antibioticus* aislado de suelos de Concepción. La metodología de purificación comprende: ultrafiltración por membrana, precipitación por sulfato de amonio, filtración por sephadex y cromatografía en columna de DEAE-Celulosa.

La enzima se comporta como una proteína globular, de bajo peso molecular y de carácter aniónico. Frente a diferentes sustratos ensayados, se comporta como penicilinas y como cefalosporinas con la misma actividad. Se determinaron las constantes cinéticas para bencilpenicilina, ampicilina y cefalosporina. Presenta un amplio rango de pH óptimo y no requiere la adición de metales para efectuar su acción. Por otra parte, su actividad es inhibida por iones cúpricos y ferrosos, por para-cloromercuribenzoato y monoyodoacetato y por metilina y cloxacilina.