

## CONFERENCIAS

GENÉTICA DE POBLACIONES HUMANAS DE ISLA DE PASCUA. (Human population genetics of easter island). Cruz-Coke, R. Sección Genética, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile.

Un modelo clásico de genética de poblaciones estatuye que el proceso de microevolución se desarrolla bajo la influencia de los efectos sistemáticos de la mutación, selección y migración, contra las fuerzas dispersivas del azar y de la endogamia. Se hace un análisis de las interacciones de estos factores en la población nativa humana de la isla de Pascua. El genoma de los polimorfismos de los pascuenses tiene un tercio de sus loci en estado isogénico y las otras frecuencias genicas están fuertemente diferenciadas de las poblaciones polinesias, amerindias y europeas que comparten sus genes y culturas. La migración ha sido el factor evolutivo más poderoso para plasmar el genoma de los pascuenses. La hibridización acumulada durante un siglo alcanzaría un 60% de genes europeos, 58% de genes chilenos y 48% de genes polinésicos. La consanguinidad nativa tribal era muy baja (exogámica), la cual ha aumentado con la relajación de las normas culturales. Así mismo la selección natural por diferencia de mortalidad se ha relajado y la población nativa ha aumentado su crecimiento y emigración de la isla. La exogamia y la migración se ha opuesto a los efectos negativos de la deriva genética (random drift). Todo este conjunto de factores evolutivos interactuantes está formando una nueva población híbrida con componentes étnicos de los pueblos parentales de Polinesia, América y Europa.

LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS, ORGANOIDES DUALES EN EL ALMACENAMIENTO Y LA LIBERACIÓN DEL NEUROTRANSMISOR. (Synaptic vesicles as dual organelles in the storage and release of the neurotransmitter). Pellegrino de Iraldi, A. Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, República Argentina.

El papel de las vesículas sinápticas en la neurotransmisión es materia de controversia. Esta se desarrolla habitualmente en el marco conceptual de la neurosecreción y las vesículas sinápticas son consideradas explícita o implícitamente como vesículas secretoras. En la hipótesis vesicular su contenido, de magnitud predeterminada, se libera de manera todo o nada, por exocitosis, en el espacio intersináptico, ante la llegada del impulso nervioso. La membrana vesicular incorporada a la membrana plasmática se recupera posteriormente por reciclamiento. En la hipótesis citoplásmica el neurotransmisor liberado por impulso nervioso no proveniría de las vesículas sinápticas, que serían sitios de almacenamiento del neurotransmisor o de depósitos de calcio, sino de citosol.

En nuestro laboratorio, observaciones morfológicas e histoquímicas en diferentes condiciones experimentales, utilizando una preparación monoaminérgica, son coherentes con la hipótesis de que las vesículas sinápticas son orgánulos activamente involucrados en el proceso del almacenamiento y de la liberación del neurotransmisor, que tienen una vida media prolongada durante la cual presentan variaciones funcionales, que pueden albergar fracciones de distinta estabilidad del neurotransmisor y que este puede ser liberado de las mismas por mecanismos calcio-independientes o calcio-dependientes, en la liberación espontánea o en la evocada por estimulación nerviosa o sus equivalentes.

Expondremos esas evidencias experimentales.

FIBRAS OXITALÁNICAS Y LA RESISTENCIA MECÁNICA DE ALGUNOS TEJIDOS INCLUSO LA MÉDULA ÓSEA (Oxytalan fibers improving mechanical properties to some tissues including bone marrow). Cotta-Pereira, G., Lucena, S.B., Iruela-Arispe, M.L., Mayer-da-Silva, A., & Cidadão, A.J. Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil.

Oxytalan fibers have been firstly described by light microscopy in periodontal tissue (Fullmer & Lillie, '58) as representing a new connective fiber different from collagen, reticular and elastic fibers. Using tannic acid-glutaraldehyde fixation, they have been observed in dermo-epidermal junction at the EM level as formed by bundles of elastic microfibrils without amorphous component, elastin (Cotta-Pereira et al., '76). The presence of oxytalan fibers has been correlated with mechanical properties of some tissues, as dermo-epidermal junction, suspensory ligament of the lens, tendons, ligaments, where resistance to mechanical stress is required. Such fibers, devoid of amorphous elastic material probably show a lesser tendency to elongate when compared with elastic fibers which possess abundant amorphous elastin, the protein responsible for their elastic properties (Cotta-Pereira & Iruela-Arispe, '88).

At the present, oxytalan fibers have been identified in human bone marrow by LM using selective stains for elastic tissue and immunoperoxidase detection of elastic microfibrils (monoclonal HB8) and by EM using TAG fixation. The occurrence of an oxytalan network in bone marrow is probably related to mechanical support for hemopoietic precursors by offering full contact between cells and other extracellular matrix components involved in hemopoiesis control.

THREE-DIMENSIONAL IMAGE COMPUTING WITH TANDEM-SCANNING AND LASER-SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY. Schatten, G. Integrated Microscopy Resource for Biomedical Research, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA.

Confocal microscopy offers considerable advantages for improved spatial and lateral imaging of fluorescence specimens, particularly for samples with overlapping structures which contribute to out-of-focus fluorescence. Laser-scanning confocal microscopy has been shown by several laboratories to be remarkably powerful in virtually eliminating out-of-focus artifacts and thereby increasing the signal to noise ratio. Fluorescence microscopy with the tandem-scanning reflected light microscope (TSM) offers several features not available with the laser-based instruments including real-time imaging with white-light and little or no spatial distortions. The use of conventional illumination sources permits the full selection of filter sets typically employed during conventional epifluorescence imaging, including dyes excited in the ultraviolet such as the DNA-binding dyes DAPI and Hoechst. While the fluorescence images obtained with the TSM are dim owing to the low-dose illumination, the application of a cooled charged-couple device (CCD) permits high resolution recording of the low-light levels. Development progresses normally even during constant observation under the TSM, probably because the illumination intensity is quite low; this holds promise for living confocal studies with vital dyes. Eggs and embryos are ideal test material since the cells are large (ca. 100 µm), since there are numerous overlapping microtubules which contribute to out-of-focus artifacts, and since the three-dimensional relationships are not well understood.

This lecture will serve as both a primer on confocal microscopy and three-dimensional image computing, as well as provide new results on motility and structural changes during fertilization. Supported by the NIH.

ADQUISICION Y MANTENIMIENTO DE LA POLARIDAD EN CELULAS EPITELIALES. Pedro J.I. Salas y Dora E. Vega-Salas. Inst. Luis F. Leloir. Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

La polaridad (asimetría) de células epiteliales en cultivo de tejidos (MDCK), se estudió empleando como marcadores anticuerpos monoclonales contra proteínas de la membrana plasmática. Se halló que proteínas apicales y basolaterales se polarizan con distintas cinéticas y dependiendo las primeras de contactos con el sustrato y las segundas de contactos célula-célula. Se halló, además, un compartimiento de almacenamiento de proteínas apicales (VAC), que representa un mecanismo regulador de la polaridad dependiente de contactos intercelulares. La polarización de marcadores apicales observada en células con uniones estrechas ("tight junctions") discontinuas pudo ser explicada, en parte por el anclaje específico de las proteínas de membrana al citoesqueleto, determinado por Recuperación de Fluorescencia después del Fotoborrado (FRAP) y extractabilidad en detergentes no iónicos. Mediante técnicas bioquímicas convencionales se determinó que los filamentos intermedios juegan un papel importante en la estructura del citoesqueleto que interviene en el mantenimiento del dominio apical. Estos resultados permiten concluir: a) que la polarización de la membrana plasmática en células epiteliales requiere la intervención de varios mecanismos diferentes, y no solamente de la separación de proteínas recién sintetizadas; b) que se requieren señales extracelulares, como los contactos con la célula vecina y con la membrana basal para marcar la topografía de la polaridad, y c) que filamentos intermedios y, posiblemente, actina juegan un papel central en el mantenimiento de la polaridad.

ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE LA PARTICULA NUCLEOSOMICA QUE AFECTAN LA TRANSCRIPCION POR RNA POLIMERASA II. (Structural element in the nucleosomal particle affecting transcription by RNA polymerase II). Palacian, E. y González, P.J. Centro de Biología Molecular, C.S.I.C. y U.A.M., Madrid.

Los organismos eucarióticos utilizan como molde de transcripción DNA asociado a histonas. La cromatina activa en transcripción presenta alteraciones en su estructura nucleosómica que podrían tener por objeto facilitar este proceso. Utilizando partículas mononucleosómicas como moldes de transcripción *in vitro*, se ha determinado el efecto que producen sobre la síntesis de RNA distintas alteraciones estructurales que han sido relacionadas con la cromatina activa. Mientras que el octámero de histonas (H2A.H2B.H3.H4)<sub>2</sub> bloquea la transcripción, permitiendo sólo la síntesis de cadenas cortas de RNA (menos de 40 nucleótidos con "cores" nucleosómicos), la pérdida de un dímero H2A.H2B estimula notablemente este proceso, sintetizándose cadenas de RNA de alrededor de 140 nucleótidos. Otros cambios de la partícula nucleosómica, eliminación de los extremos aminoterminales de las histonas y unión de las proteínas no histónicas HMGs 14 y 17, no afectan apreciablemente la transcripción. Los resultados obtenidos sugieren que la partícula nucleosómica carente de un dímero H2A.H2B, podría ser un intermediario durante la transcripción *in vivo*, al facilitar la acción de la maquinaria enzimática.

MADURACION DEL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL TRANSITO EPIDIDIMARIO (Epididymal maturation of spermatozoa) Burgos M.H. IHEM. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

El espermatozoide que ingresa a las vías seminales extratesticulares es incapaz de desplazarse en forma adecuada y de fertilizar ovocitos.

Durante el tránsito epididimario adquiere la motilidad progresiva, modifica su morfología, experimenta notables variaciones en el contenido superficial de polipéptidos y glicoproteínas y adquiere la capacidad fertilizante.

Durante los cambios morfológicos que en algunas especies son muy relevantes cabe mencionar la modificación de la forma de la cabeza y en especial del acrosoma y una notable disposición del contenido acrosomal en zonas que se desplazan durante el tránsito epididimario hasta lograr una ubicación constante en el espermatozoide maduro.

Otro cambio significativo revelado por la criofractura de la membrana plasmática del espermatozoide es el notable aumento de las partículas intramembranas en la región postacrosomal. Estas partículas corresponden a proteínas intrínsecas de la membrana plasmática en relación probable con el reconocimiento y fusión intergamético.

Existen otras variaciones que se pueden seguir mediante el análisis electroforético e inmunocitoquímico de la membrana plasmática del espermatozoide. Estos estudios revelan que ciertas glicoproteínas secretadas por el epidídimo se incorporan a la superficie del espermatozoide y otras de procedencia testicular viajan enmascaradas hasta el final del tránsito epididimario haciéndose visibles en la región postacrosomal. Una efectiva interrelación gameto-epididimaria en ambos casos explicaría los cambios mencionados.

ORGANO SUBCOMISURAL Y LIQUIDO CEFALO-RAQUIDEO. (Subcommissural organ and cerebrospinal fluid). Rodríguez, E.M., Nualart, F., Rodríguez, S., Herrera, H. Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. El órgano subcomisural (OSC) es un órgano circumventricular del cerebro que secreta varias glicoproteínas al líquido cefalo-raquídeo (LCR) donde las mismas se condensan formando una estructura fibrosa, la fibra de Reissner (FR). La FR se extiende a lo largo del canal central de la médula espinal. En el OSC de bovino hay al menos cuatro glicoproteínas secretorias de un peso molecular aparente de 540, 450, 320 y 190 KD. El uso de anticuerpos obtenidos contra cada uno de los tres primeros compuestos y de lectinas en electrotransferidos indican que el compuesto de 540 KD es una forma precursora. Además este compuesto está presente en el OSC y ausente en FR. La síntesis, el procesamiento, transporte al polo ventricular y la liberación ocurren en 1 h. Un pool de material sintetizado queda almacenado en el RER por 4-5 días. El material liberado al LCR hace que la FR crezca cuadalmente a un ritmo del 7% de su longitud, por día. Caudalmente el material que compone la FR se desagrega y alcanza vasos sanguíneos. El desconocimiento total de la función del OSC nos llevó a desarrollar 3 modelos experimentales: a) anticuerpos contra productos secretorios del OSC inyectados al LCR se unen selectivamente al material que el OSC libera al LCR. Ellos resulta en la desconexión de la FR del OSC y en la fragmentación de dicha fibra. El animal carece de FR por al menos 2 semanas; b) ratas con hidrocefalia experimental no forman FR, el material secretorio inmunoreactivo del OSC disminuye y los capilares sanguíneos del OSC sufren grandes cambios; c) el OSC transplantado bajo la cápsula renal, aunque continúa secretando hacia cavidades neoformadas, no forma FR. Se concluye que el LCR participa en la formación de la FR, y que ésta puede influenciar la circulación de LCR. Grants: S.Volkswagenwerk, F.R.G., 1/63-476, FONDECYT 0890-88, D.I. U.A.CH. S-89-01.

HOW PLANTS GROW IN OUTER SPACE: THE INFLUENCE OF MICROGRAVITY ON CELLULAR AND SUBCELLULAR DIFFERENTIATION. Randy Moore, Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, OH 45435 USA.

I used the Space Shuttle Columbia to determine how microgravity influences cellular and subcellular differentiation in plants. Specifically, I launched imbibed seeds of onion, corn, and mustard spinach into outer space. Seedlings were fixed in microgravity for ultrastructural analysis approximately 5 days after launch. Microgravity significantly alters cellular differentiation in plants. For example, cells differentiating in microgravity seedlings grown in microgravity allocate significantly larger relative volumes to hyaloplasm and lipid bodies, and significantly smaller relative volumes to plastids, mitochondria, and dictyosomes. These changes in cellular differentiation correlate with altered cellular function. For example, dictyosomes produce and secrete mucilage from peripheral cells of root caps. The smaller relative volume of dictyosomes in peripheral cells of flight-grown seedlings correlates with reduced production and secretion of mucilage. Microgravity also induces subcellular changes during cellular differentiation. For example, plastids in flight-grown seedlings contain significantly less starch than Earth-grown seedlings.

MECHANISM OF PROTEIN STABILIZATION BY SOLVENTS. Timasheff, S.N. Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, MA 02254-9110, U.S.A.

The equilibrium between the native, active structure and the denatured one in the protein refolding process is determined by a fine balance of environmental factors, one of which is the nature of the solvent medium. Studies have been carried out on the interactions of globular proteins with denaturing solvents, such as urea and guanidine hydrochloride, and stabilizing solvents, such as sugars and precipitating salts. In the denaturation reaction, the net effect of a solvent is a resultant of such interactions with the protein in the two end states. In the case of denaturing solvents the proteins in the unfolded state interact preferentially with the denaturant. Stabilizers, on the other hand, are excluded from the domain of protein molecules in both end states of the reaction, i.e. the preferential interaction is that of hydration. A particularly interesting class consists of solvents which are preferentially excluded from proteins in the folded globular state, but bind preferentially to the unfolded state. Factors which determine such interactions have been established for a variety of solvents. These include the increase of the surface free energy of water by addition of a stabilizer, steric exclusion, solvophobicity, repulsion by charged groups, attraction or repulsion by non-polar and polar regions on the protein surface. (This work was supported in part by NIH Grants GM-14603 and CA-16707).

REGULACION DE LA VARIABILIDAD DEL PAISAJE EN HABITATS INTERMAREALES EXPUESTOS DE CHILE CENTRAL. (Regulation of landscape variability in wave-exposed rocky intertidal habitats of Central Chile). Santelices, B. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Integración de resultados de estudios experimentales con algas marinas permiten aproximar el problema de la determinación del paisaje en ambientes intermareales, donde a menudo éste es considerado como altamente variable. En hábitats expuestos de Chile Central existe zonación de morfologías de algas más bien que una zonación estricta de especies. Los límites superiores e inferiores de cada zona están determinadas por interacción de factores, cuya importancia relativa cambia rápidamente en espacio y tiempo. Cuando se remueven los factores que restringen la distribución de una especie dada, otros factores -generalmente ignorados o considerados como secundarios- se hacen limitantes. Al interior de cada zona, las interacciones competitivas son simétricas pero ellas son generalmente asimétricas entre dos zonas. A pesar de notables diferencias morfológicas, todas las formas dominantes combinan adaptaciones que les permiten escapar de pastoreo con atributos que determinan alta capacidad competitiva. Sin embargo, entre estas formas existe una clara jerarquía competitiva que se expresa en desplazamientos verticales y zonación, siendo los niveles más bajos de la playa posibles de ser ocupados potencialmente por cualquier tipo de alga. La existencia de jerarquías competitivas, el control abiótico de la distribución de especies, la aparición de factores secundarios que limitan distribución y los cambios de signo en interacciones interespecíficas reducen la variabilidad posible del paisaje y permiten alguna predicción en estos hábitats.

DEGRADACION DE LA LIGNINA: PROYECCIONES BIOTECNOLÓGICAS. (Degradation of lignin: biotechnological applications). Vicuña, R. Unidad de Microbiología y Genética Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. P. Universidad de Chile. Casilla 114-D. Santiago, Chile.

La lignina es un polímero aromático, estereoirregular que protege y confiere rigidez a la pared de la célula vegetal. En la naturaleza, es degradada por algunas especies de hongos, los que la mineralizan a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Las bacterias no son muy eficientes atacando la lignina polimérica, aunque sí degradan intermediarios metabólicos liberados por los hongos.

Diversas peroxidases de hongos, algunas de ellas dependientes de Mn, parecen jugar un rol en la depolimerización de la lignina. Sin embargo, al contrario de los resultados obtenidos in vivo, hasta hoy día los intentos de depolimerizar lignina in vitro han resultado infructuosos. Por otra parte, se han descrito recientemente dos enzimas bacterianas que rompen enlaces típicos en modelos de lignina de bajo peso molecular.

La degradación microbiana de la lignina ofrece proyecciones biotecnológicas. En efecto, la íntima relación de la lignina con la celulosa dificulta los procesos de pulpe de la madera. Mas aún, la obtención de pulpa de alta calidad exige una etapa final de blanqueamiento, consistente en la remoción de restos de lignina, proceso que resulta en la eliminación de compuestos tóxicos a través de efluentes. En años recientes se han producido interesantes avances en biopulpe, bioblanqueamiento y tratamiento de efluentes, los que aparte de ser procesos no contaminantes, tienen un requerimiento energético significativamente menor que los tradicionales.