

Simposios

SIMPOSIO TRANSPORTE DE CALCIO Y FUNCION CELULAR

Coordinador: *Benjamín Suárez*

CALCIUM TRANSPORT AND CELLULAR FUNCTION (Symposium 1)
Suárez, B. Centro de Estudios Científicos de Santiago y Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Calcium plays a central role in the regulation of cell function. Ca^{2+} is compartmentalized and the free intracellular Ca^{2+} concentration can fluctuate over several orders of magnitude during a cell functional cycle. Specific mechanisms maintain resting Ca^{2+} concentrations or elicit rapid changes of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in response to extracellular stimuli. Calcium homeostasis is finely tuned by the interplay of different transport systems (carriers and channels) present in the cell membrane or in the membranes of intracellular organelles such as the endoplasmic (ER) or sarcoplasmic reticulum (SR), that are activated and/or modulated by a variety of effectors.

In neurons, an increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ is normally triggered by depolarization of the cell membrane that activates voltage dependent calcium selective channels. Very recent evidence also suggests a contribution from intracellular Ca^{2+} release. In cardiac muscles, Ca^{2+} influx via voltage dependent calcium channels, Na/Ca exchanger and intracellular Ca^{2+} release from the SR contribute to the elevation of internal free $[\text{Ca}^{2+}]$ during the excitation-contraction coupling process. In skeletal muscle, in contrast, major changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ take place as a consequence of Ca^{2+} release from the SR.

This symposium will discuss the regulation mechanisms of the calcium transports systems and their relevance to cell function.

Supported in part by Proyecto FONDECYT 89-902.

EVIDENCE FOR CA-INDUCED CA RELEASE IN ISOLATED RAT CARDIAC MYOCYTES. Eisner, D.A., O'Neill, S.C., Donoso, P. & Valdearmillos, M. Department of Physiology, University College, London.

We have investigated the extent to which Ca-induced Ca release is involved in cardiac contraction. The following results were obtained. Removal of extracellular Ca immediately abolished both the Ca current and contraction. There are two explanations for this: (a) the sarcoplasmic reticulum has been depleted of Ca or (b) the Ca current is required to initiate Ca-induced release of Ca from the s.r. We have measured the Ca content of the s.r. from the magnitude of the release of Ca produced caffeine. This was not decreased by exposure to Ca-free solution showing that the s.r. still contains Ca. This supports hypothesis (b).

Ca-induced Ca release has been demonstrated directly by releasing Ca rapidly using the "caged" Ca containing compound nitr-5. This contraction was abolished by ryanodine showing the involvement of the s.r.

Finally, we have examined the mechanism of action of caffeine on both Ca release and contraction. The data indicate that (i) caffeine probably acts via sensitizing the Ca-induced Ca release to Ca and (ii) that the effects of caffeine on contraction result from a combination of elevated $[\text{Ca}^{2+}]$, and a direct effect of caffeine on the contractile machinery.

ACTIVATION MECHANISMS OF CALCIUM CHANNELS FROM SARCOPLASMIC RETICULUM OF SKELETAL MUSCLE. Bull, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Calcium channels have been detected in isolated membranes from sarcoplasmic reticulum (SR) from frog muscle. Several lines of evidence indicate that these conductances participate in calcium release during excitation-contraction coupling. High conductance channels present in rabbit and frog SR are activated by ATP and calcium applied at the myoplasmic side and blocked by magnesium and ruthenium red. The channels present in SR membranes from the frog are activated by micromolar concentrations of (1,4,5)-inositol trisphosphate, a postulated internal agonist of EC-coupling. This drug increases fractional open time in a concentration dependent manner without effect on single channel conductance. Gating and conductance of the same channel are modified by nanomolar concentrations of ryanodine, a plant alkaloid that elicits irreversible contractures.

SR membranes from frog muscles also contain another channel selective for calcium and barium, insensitive to calcium and ATP or InsP3 but activated by caffeine.

The available evidence favors the view that the calcium channels from the SR are agonist-activated conductances. Endogenous or exogenous agonists activate the channels by increasing fractional open time without alteration of single channel conductance. Channel activation results mainly from the concentration dependent decrease of closed time intervals.

Supported by Grants FONDECYT 88-972 and 89-902, NIH Grant GM-35981.

SUBCELLULAR DYNAMICS OF Ca^{2+} MOBILIZATION FOLLOWING VOLTAGE GATED TRANSMEMBRANE Ca^{2+} RELEASE FROM INTRACELLULAR POOLS IN BULLFROG SYMPATHETIC NEURONS. Arturo Hernandez-Cruz. Dept. of Neurosciences. Roche Institute of Molecular Biology. Nutley, NJ. 07110, USA. and Instituto de Neurociencias, UNAM, Mexico City.

A combination of laser scanned confocal microscopy (LSCM) and digital image processing was applied to monitor spatiotemporal $[\text{Ca}^{2+}]$ gradients in voltage-clamped isolated bullfrog sympathetic neurons. Recordings were made in the whole-cell mode and fluorescent indicators (Fluo-3 or Rhod-2; 200 μM) were applied through the pipet to observe steady and rapidly dissipating $[\text{Ca}^{2+}]$ gradients. Application of a single voltage step, revealed an inward decrementing wave of increased $[\text{Ca}^{2+}]$ which reached the center of the cell in about 300 ms. Ca signals in the nucleus were consistently larger and decayed more slowly. A similar pattern was observed when intracellular Ca-release was induced by caffeine (CAF). Measurements of macroscopic Ca-activated K currents ($I_{\text{K(Ca)}}$) were conducted to monitor changes in submembrane $[\text{Ca}^{2+}]$ ($V_h = -35\text{mV}$). Pressure-ejection of 10 μM CAF produced a transient increase of $I_{\text{K(Ca)}}$. Short applications (10-200 ms) produced small responses that were additive. Longer pulses elicited a very steep increase of the response, which saturated with 1-2 sec exposures. Large responses exhibited a refractory period of several minutes suggesting depletion and subsequent reuptake. Changes in Ca^{2+} were not homogeneous suggesting regional variations in density of release sites. Dantrolene (100 μM), procaine (2mM) and ryanodine (5 μM), blockers of Ca-release in skeletal muscle, had similar effects in neuronal Ca^{2+} release. Surprisingly, ruthenium red (30 μM) did not block the release, but delayed the reuptake, producing Ca^{2+} and $I_{\text{K(Ca)}}$ responses which lasted for several minutes. At present, we investigate the pharmacology of Ca-release from the CAF-sensitive pool.

SIMPOSIO DIFERENCIACION Y DESARROLLO EMBRIONARIO

Coordinador: *Eduardo Bustos*

REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DURANTE EL DESARROLLO INICIAL DEL RATON. (Regulation of protein synthesis during early development of the mouse).

Luis Izquierdo y Roberto Mayor. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La capacidad de regulación del embrión inicial de ratón sugiere que su desarrollo, antes de la blastulación, no se representaría tan bien por un programa lineal de expresión génica como por una red de eventos genéticos y epigenéticos en equilibrio. Sin embargo, nuestros resultados revelan que los agentes que inhiben la replicación del DNA afectan el patrón de síntesis proteica mientras que las modificaciones de la forma celular causada por agentes que interfieren con la compactación de la mórula no afectan dicho patrón en forma significativa. Se interpreta éstos y otros resultados de acuerdo con diversas concepciones de la diferenciación celular y morfogénesis.

REMEDIACION DE CROMATINA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE ERIZOS DE MAR. (Remodeling of chromatin during early developmental stages of sea urchins). Imchenashvili, M., Puchi, M., Montecinos, M., Gutiérrez, S. Depto. de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Chile.

Durante las primeras etapas del desarrollo de equinodermos tres grupos de genes para histonas son secuencialmente expresados, las variantes CS, desde la fecundación hasta el estado de 18 blastómeros, las variantes tempranas, mayoritarias entre 16 blastómeros y blástula y las variantes tardías, preponderantes después de la eclisión. Estos grupos difieren entre sí tanto en la organización de los genes que los codifican como en la microheterogeneidad de variantes homólogas. En el presente trabajo se describen las características de las proteínas cromosómicas que conforman la cromatina en ovocitos y al comienzo del desarrollo las cuales son comparadas con las presentes en estados larvales. Los resultados obtenidos pueden resumirse como sigue: durante las primeras etapas de segmentación la cromatina está conformada por partículas nucleosómicas atípicas, formadas a lo menos por 7 variantes CS diferentes entre sí que presentan un carácter menos básico que las histonas tradicionales, estas variantes se encuentran ADPriladas y acetiladas. Interaccionan con 123 p.b. de ADN y prevalecen en estados larvales de desarrollo aunque muy diluidas por variantes larvales. El componente de MHCP es muy heterogéneo y no presenta diferencias muy significativas durante los primeros estados de segmentación. Al igual que las histonas CS, algunas proteínas ácidas se encuentran ADPriladas y prevalecen en cromatina en etapas larvales de desarrollo. En contraste con las variantes CS las etapas larvales contienen una cromatina formada mayoritariamente por histonas clásicas cuya microheterogeneidad varía en diferentes estados larvales, sin embargo, la similitud de las composiciones aminoácidas sugiere que las diferencias observadas se deben a modificaciones post-traduccionales de estas histonas. El conjunto de estos resultados indica que durante el desarrollo embrionario temprano la cromatina adquiere una estructura en mosaico en la cual están representadas la mayor parte de las proteínas cromosómicas en función del tiempo y cantidad que han sido expresadas durante el desarrollo. Se desconoce a la fecha si existe selectividad en distribución espacial de las diferentes proteínas cromosómicas en los diferentes territorios del embrión. Proyectos FONDECYT 0789-88. U. de Concepción 203117 y 203111.

The preservation of mammalian germplasm. D.G. Whittingham, MRC Experimental Embryology & Teratology Unit, St. George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, London, SW17 0RE.

In 1949, Drs. Polge, Smith and Parkes (Natural Institute for Medical Research, U.K.) discovered the protective action of glycerol on the spermatozoa of several species during freezing and thawing. Within the next 10 years, the preservation of bull spermatozoa became an established routine technique in cattle breeding programmes. During subsequent years, many other cells and tissues have been successfully stored at low temperatures and cryobiology has become a recognised scientific discipline investigating the mechanisms involved in the preservation of life and the causes of death at low temperature. In 1972 the preservation of mammalian embryos became a reality. Dr. Wilmot (AFRC, Cambridge, U.K.) and Drs. Whittingham (Cambridge University, U.K.), Leibo and Mazur (Oak Ridge National Laboratory, U.S.A.) showed that mouse embryos under the protection afforded by dimethyl sulphoxide can survive freezing to temperatures as low as -269°C (liquid helium) and produce normal fertile offspring after transfer to the reproductive tract of recipient foster mothers. In 1977, Dr. Whittingham reported the first successful storage of mouse oocytes at -196°C with the birth of live offspring from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*.

Recent success with the freezing of primary ovarian follicles and the production of mature oocytes in extra ovarian sites provides a potential source of female gametes hitherto unavailable in the mammal.

Over the intervening years it has become clear that gamete and embryo storage techniques are not only confined to biomedical research, but they have far reaching practical uses in the agricultural industry, the conservation of rare breed and endangered species and in the treatment of certain forms of infertility.

LA OVOGENESIS DE LAS RANAS MARSUPIALES DE AMERICA LATINA: NUEVOS MODELOS PARA VERTEBRADOS (Oogenesis of the marsupial frogs from Latin America: New vertebrate patterns). del Pino, E. M. Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

En la rana marsupial *Gastrotheca riobambae* hemos encontrado que el patrón del desarrollo temprano y su velocidad se encuentran profundamente alterados en comparación con otras ranas, como por ejemplo *Xenopus laevis*. La incubación materna en *Gastrotheca* se encuentra acompañada por un incremento notable en el tamaño del huevo, lo cual, a su vez está acompañado por los cambios del patrón de desarrollo. Por otro lado, la velocidad del desarrollo temprano es comparable a la del ratón, debido a la protección materna. El desarrollo temprano de los animales, viene ya programado en el huevo. Por tanto, es de esperarse que la ovogénesis se encuentre profundamente alterada en las ranas marsupiales. Nuestro trabajo ha demostrado que a diferencia con *X. laevis*, durante la ovogénesis de *G. riobambae* se acumulan cantidades muy pequeñas de rRNA, como resultado de una modesta amplificación de los genes ribosomales (rDNA). La baja amplificación del rDNA se refleja también en el número limitado de nucleolos con que cuenta el oocito de *Gastrotheca*. La baja cantidad de rRNA está asociada al desarrollo más lento, como en los mamíferos, en los cuales el oocito no amplifica el rDNA y la cantidad de rRNA acumulada es pequeña. Existen, sin embargo, ranas marsupiales cuyo desarrollo ocurre a velocidad alta. La aceleración del desarrollo ha sido posible por un incremento en las reservas de RNA del huevo, debido a que se ha incrementado el número de núcleos en el oocito, como en *Flectonotus pygmaeus*, en donde los oocitos tempranos son multinucleados con 2.000 núcleos o más por oocito.

SIMPOSIO EXPRESION GENICA EN TRIPANOSOMATIDOS

Coordinador: Norbel Galanti

SIMPOSIOS: EXPRESION GENICA EN TRIPANOSOMATIDOS Y BIOLOGIA CELULAR DE PROTOZOOS (Gene expression in Trypanosomatids and Cell Biology of Protozoa). Cazzulo, J. J.* y Galanti, N.** Coordinadores. *Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina y ** Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La Biología Celular y Molecular de Tripanosomatidos ha abierto caminos insospechados para la Biología y la Genética. Así, desde el descubrimiento del DNA en mitocondrias hasta la edición de transcritos en esos mismos organelos, estos protozoos se han convertido en fuente permanente de nueva información. Problemas tan interesantes como las peculiares transformaciones fenotípicas en diferentes ambientes, los intrincados y finos mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped, la división mitótica sin condensación de la cromatina, la organización de ribosomas en base a numerosas partículas de rRNA de tamaños diversos, la transcripción discontinua del mensaje genético, la asignación de ciertos genes a fragmentos de DNA denominados "minicromosomas", convierten a los tripanosomatidos en uno de los centros de la investigación biológica. Sumado a lo anterior esta el hecho que muchos de ellos constituyen un grave problema de salud para la población humana y una importante fuente de pérdida de recursos animales y vegetales.

En dos simposios, se tratarán temas tales como mecanismos de glicosilación de proteínas, enzimas de superficie en la interacción parásito-huésped, actividad de proteinasas, enzimas de replicación del DNA, genes que codifican para antígenos específicos y mecanismos de diferenciación celular de estos protozoos. Esta diversidad temática es un reflejo de la intensa investigación que se desarrolla en Iberoamérica en torno a estos protozoos parásitos.

METABOLISMO DE POLIAMINAS EN TRIPANOSOMATIDOS (Polyamine metabolism in trypanosomatids). Algranati, I.D.; Sánchez, C. y González, N.S. Instituto Luis F. Leloir "Fundación Campomar", Buenos Aires, Argentina.

Las poliaminas desempeñan un rol esencial en la proliferación y diferenciación celular. Recientemente se ha demostrado que algunos inhibidores de la biosíntesis de poliaminas bloquean la multiplicación de *Trypanosoma brucei* y pueden curar infecciones producidas por este parásito. Por esta razón se ha iniciado el estudio del metabolismo de poliaminas en otros parásitos como *T. cruzi* y *L. mexicana* con el objetivo de investigar la posibilidad de la utilización de drogas antipoliamicinas en la quimioterapia de la Enfermedad de Chagas y en Leishmaniasis.

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana* para medir la velocidad de entrada de varias poliaminas y amino ácidos básicos, como así también la conversión *in vivo* de arginina, ornitina y lisina en poliaminas. Los niveles endógenos de poliaminas y la actividad de las descarboxilasas de ornitina y arginina se determinaron en extractos celulares en condiciones adecuadas para cada caso.

Los resultados indicaron que espermidina y espermina son las poliaminas más abundantes en *T. cruzi*, mientras en *Leishmania* la relación putrescina : espermidina es aproximadamente 4:1. Se ha detectado elevada actividad de ornitina descarboxilasa en *L. mexicana*. En cambio en *T. cruzi* sólo existen trazas de esta enzima y de arginina descarboxilasa. El estudio de las propiedades de la ornitina descarboxilasa de *Leishmania* indicó que es estable, a diferencia de la enzima de células de mamífero. Los datos obtenidos permiten concluir que en *T. cruzi* gran parte de las poliaminas son tomadas del medio de cultivo y en *L. mexicana* son preferentemente sintetizadas por el parásito. Este hecho permitiría utilizar inhibidores de la síntesis de poliaminas para bloquear la proliferación de la *Leishmania*.

QUINASAS DE PROTEINAS EN *Trypanosoma cruzi* (Protein kinases in *Trypanosoma cruzi*). Telles-Iñán, M.L.; Gómez, R.L.; Ulloa, R.M.; Erijman, L. y Torres, H.M. Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Buenos Aires, Argentina.

El proceso de diferenciación en *Trypanosoma* de formas epimastigotes a tripomastigotes está asociado a un aumento intracelular de AMP cíclico y las bases moleculares de este proceso son poco conocidas. En nuestro laboratorio se caracterizó una quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (PKA) en formas epimastigotes de *T. cruzi*.

Extractos citosólicos del parásito se cromatografiaron por DEAE celulosa y se obtuvieron dos fracciones con actividad de quinasa de proteínas. La fracción que eluye a 0.32M de NaCl (PKII) se estimula con concentraciones nanomolares de AMP cíclico y posee capacidad de unir específicamente al nucleótido, mientras que la actividad de quinasa observada a 0.15M de NaCl no se activa con AMP cíclico ni tiene capacidad de unirlos.

La holoenzima PKII se disoció en el componente regulatorio y el catalítico. Estos componentes reconstituyen un sistema homólogo y heterólogo con subunidades purificadas de corazón bovino RII y C. El AMP cíclico revierte en ambos casos la inhibición provocada por la subunidad R. En ausencia de aceptor de fosfatos, la holoenzima se autofosforila en un polipéptido de 56kd. Esta proteína es reconocida en Western blots por un anticuerpo policlonal contra la subunidad regulatoria tipo II de corazón.

A su vez en las formas epimastigotes se caracterizó una quinasa de proteínas tipo C, dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos. La enzima requiere Ca^{2+} y fosfatidil serina para su actividad y se encuentra parcialmente soluble y pegada a membranas. Ambas enzimas se purificaron y adsorbieron en columnas de fenil-sepharosa en presencia de Ca^{2+} y se eluyeron con EGTA. La quinasa C asociada a membranas como la fracción soluble presentan las mismas características : fosforilan preferencialmente histona H1, se estimulan por diacilglicerol y ésteres de forbol y se inhiben por polimixina B y estaurosporina.

Por fraccionamiento subcelular la PKC se encuentra asociada con microsomas y fracción citosólica, a diferencia de la PKA que es citosólica.

Estas evidencias adicionales a la regulación de la fosfodiesterasa de *T. cruzi* por Ca^{2+} -calmodulina indican que el sistema regulatorio que involucra segundos mensajeros es semejante en el parásito al de células de mamíferos.

ORGANIZACION DE LOS GENES QUE CODIFICAN ANTIGENOS DEL TRYPANOSOMA CRUZI (Organization of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens). Macina, R.A.; Affranchino, J.L.; Pollevick, G. and Frasch, A.C.C. Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

En trabajos previos del laboratorio se clonaron genes de *T. cruzi* que codifican antígenos del parásito y que son reconocidos por sueros obtenidos de pacientes en el período agudo y crónico de la Enfermedad de Chagas (Ibañez y col. Mol. Biochem. Parasitol. 25 : 175, 1987; Mol. Biochem. Parasitol. 30 : 27, 1988 y Affranchino y col. Mol. Biochem. Parasitol. 34 : 221, 1989). La secuencia de ocho de estos genes demostró que están formados por repeticiones iguales que varían entre 15 y 204 nucleótidos de acuerdo al gen considerado. Dos de estos genes, denominados SAPA (por Shed Acute Phase Antigen) y *30 fueron analizados en 15 aislamientos del parásito obtenidos en Bolivia, Brasil y Argentina. SAPA está constituido por una familia de 4 a 6 genes homólogos, la mayoría de ellos presentes en todos los aislamientos analizados. Se observó una gran heterogeneidad en el tamaño de los fragmentos de restricción entre los parásitos estudiados. Esta heterogeneidad se debe principalmente a la diferencia en el número de repeticiones presentes. Este resultado se confirmó luego del estudio de tres genes clonados homólogos a SAPA, los que poseían 14, 33 y 47 unidades repetidas. El segundo gen analizado, número 30, también varía en cuanto al número de repeticiones entre cepas, lo que se correlacionó con diferencias en los tamaños de los ARN mensajeros y las proteínas correspondientes. Estos resultados indican que antígenos homólogos pueden variar en tamaño entre cepas de *T. cruzi* debido a que los genes que las codifican poseen un número variable de unidades repetidas.

Estudios sobre la síntesis de DNA y DNA polimerasas en formas epimastigotas y tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (Studies of DNA synthesis and DNA polymerases on *T. cruzi* epimastigote and tripomastigote forms).

A. Solari, J. Venegas y C. Rojas.

Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70086, Stgo. 7

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, el cual posee un ciclo biológico con múltiples formas celulares.

Existe una forma proliferativa o epimastigota en el huésped invertebrado y una forma no proliferativa o tripomastigota en la sangre del huésped vertebrado. Con el propósito de estudiar la regulación de proliferación durante la transición epimastigote-tripomastigote, hemos montado el método de diferenciación celular desarrollado por: V. Contreras y S. Goldenberg con la cepa de *T. cruzi* LQ. Los resultados indican que las formas tripomastigotas no poseen la capacidad de sintetizar DNA de acuerdo al test de incorporación de [³H] Timidina en DNA, sin embargo, ellas presentan una actividad total de DNA polimerasas equivalente a la encontrada en formas epimastigotas. Resultados de purificación y caracterización de las DNA polimerasas de epimastigotes indican que existen al menos dos formas de DNA polimerasas distinguibles por varios criterios. Estudios de síntesis de DNA por autorradiografía sugieren que al menos una de las DNA polimerasas nucleares de las formas epimastigotas sería sensible a afidicolina, agente conocido como potente inhibidor de las DNA polimerasas (y) de mamíferos. Financiado por PNUD/World Bank/WHO y UNIVERSIDAD DE CHILE.

(Immunocytochemical localization of sugar-binding proteins, neuraminidase and cloned antigens in *Trypanosoma cruzi*). De Souza, W. - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

In the last years new advances in the immunocytochemistry field opened the possibility for the high resolution localization of macromolecules using gold-labeled probes. Using neoglycoproteins evidences were obtained for the existence of lectin-like substances on the surface of tripomastigote, but not in epimastigote and amastigote forms, which recognize N-acetyl-glucosamine and D-galactose. These observations are discussed in relation to the effects exerted by some monosaccharides and lectins on the process of *T. cruzi* - host cell interaction. Neuraminidase was located on the surface of the tripomastigote-amastigote transition form which is infective. Evidences were obtained showing that this enzyme, which seems to be involved in the process of infection of vertebrate cells by *T. cruzi* is secreted through the flagellar pocket of tripomastigotes. We used some polyclonal antibodies obtained by Frash and co-workers against antigenic proteins encoded by six recombinant DNA clones and the results obtained showed that one of the antigens, which has a high molecular weight and contains tandemly repeated amino acid sequence motifs which are recognized by sera from patients with Chagas's disease, as located in the region of flagellum-cell body adhesion.

Work supported by WHO, FINEP, CNPq and FAPERJ.

SIMPOSIO BIOLOGIA CELULAR DE PROTOZOOS

Coordinador: Juan José Cazzulo

N-GLICOSILACION DE PROTEINAS EN MAMIFEROS Y PROTOZOARIOS: DIFERENCIAS Y SIMILITUDES. (Protein N-Glycosylation in mammals and protozoa. Differences and similarities). Farodi, A.J. Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.

Tres tipos de oligosacáridos son transferidos de derivados de dolicol-P a proteínas en protozoarios: a) el oligosacárido completo (Glc3Man9GlcNAc2), lo mismo que en células de mamíferos, plantas, insectos y hongos de tipo salvaje, es transferido en *Euglena gracilis*; b) Glc3Man5GlcNAc2 es el compuesto transferido en *Tetrahymena pyriformis* y *T. thermophyla*, lo mismo que en la línea celular de linfoma murino Thy-1. Diferenciando de estas células, ambas tetrahymenae formaron dolicol-P-Man tanto *in vivo* como *in vitro* pero resultaron deficientes en todas las manosiltransferasas dependientes de dolicol-P-Man. Como no se encontró manosilación de residuos Ser/Thr en ambas tetrahymenae, estos resultados sugieren que dolicol-P-Man estaría involucrado en la síntesis de algún otro glicoconjugado desconocido; c) en tripanosomatidos oligosacáridos no glucosilados son transferidos a proteínas (Man 6,7,9 GlcNAc2, dependiendo de las especies). Estos protozoarios son deficientes en la formación de dolicol-P-Glc, y algunas especies también en ciertas manosiltransferasas dependientes de dolicol-P-Man. Se encontró que la oligosacariltransferasa de tripanosomatidos transfiere, en ensayos libres de células, Glc1-3Man9GlcNAc2 y Man7-9GlcNAc2 a la misma velocidad mientras que la enzima de mamíferos y hongos transfiere Glc3Man9GlcNAc2 en forma preferencial. Las glicoproteínas de tripanosomatidos, al igual que las de mamíferos, plantas y hongos resultaron ser glucosiladas transitoriamente en el retículo endoplásmico.

Apoyado por UN/WHO-TDR, CONICET (ARG.) y UBA (ARG.)

CISTEIN PROTEINASAS EN *Trypanosoma cruzi* (Cysteine proteinases in *Trypanosoma cruzi*). Cazzulo, J.J. Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Campomar, A. Machado 151, 1405 Buenos Aires, Argentina.

Hemos purificado hasta homogeneidad proteica una cistein-proteinasa a partir de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi*. Es una glicoproteína monomérica, con un peso molecular de 60 kDa. Contiene aproximadamente 10% de carbohidrato, del tipo de alfa manosa. Hemos determinado su composición en aminoácidos, y la secuencia de 32 aminoácidos del extremo N-terminal, así como de un péptido triptico interno; estas partes de la molécula presentan un 65% de identidad con la papaina y la cathepsina L de mamífero. Un segundo componente difuso (PM 25 a 35 kDa), presente en algunas preparaciones, es un producto de degradación de la enzima, pues al menos dos de las bandas presentan la misma secuencia N-terminal del polipéptido original de 60 kDa. La enzima es activada por 2-mercaptoetanol, ditiotretol y glutatión reducido, e inhibida por E-64, TLCK, organomercuriales y leupeptina. La proteinasa es capaz de degradar proteínas, como azocaseína, seroalbúmina, hemoglobina, fibrinógeno e IgG, y sustratos sintéticos con grupos cromogénicos; en este último caso, la unión que se rompe incluye el carboxilo de Arg o Lys. Por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo fibrinógeno, y por revelado de Western blots de extractos totales del parásito con un antisuero contra la enzima purificada, observamos que esta proteinasa, para la cual proponemos el nombre de "cruzipaina", es la principal cistein proteinasa presente en epimastigotes de diferentes cepas y clones del parásito, y también, aunque en menores niveles, en amastigotes y tripomastigotes.

Subsidiado por TDR/DMS, SAREC Y CONICET.

SIMPOSIO TRANSDUCCION DE SEÑALES

Coordinador: Richard Foster

TRANSDUCCION DE SEÑALES (SIGNAL TRANSDUCTION). Simposio 5. Foster, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Norte, Universidad de Chile.

El cambio, de un instante a otro, en la expresión de la conducta de una célula, es el resultado de la activación de sistemas de señales que transfieren información desde la superficie celular al interior, los cuales, usando un repertorio molecular mínimo, representado por los segundos mensajeros, regulan un variado número de respuestas celulares. No es de extrañar entonces que, cuando un músculo se contrae una célula adrenal secreta o un oocito fertilizado, los mensajeros secundarios, mediadores de la acción sean los mismos. Así, estos sistemas de señales, tienen un carácter universal. La información, transducida por proteínas G, está mediada por al menos dos grandes sistemas de segundos mensajeros: Uno, representado por el inositol trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), y otro representado por el adenosin monofosfato cíclico (AMPc), siendo este último el más estudiado. En este Simposio, a nivel de segundos mensajeros, veremos al IP_3 en el acoplamiento excitación-contracción y al DAG participando en la activación de la proteína quinasa C a través de tres mecanismos diferentes. A nivel de transducción estudios en las subunidades Gs y Gi de la proteína G del oocito de *X. laevis* y finalmente regulación de canales de calcio en células endocrinas por segundos mensajeros.

POSFOSFATOS EN MUSCULO ESQUELETICO: PARTICIPACION EN EL ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION. (Phosphoinositides in skeletal muscle: role in excitation-contraction coupling). Carrasco, M.A., Sánchez, X., Hidalgo, C. y Jaimovich, E. Depto. de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, Univ. de Chile, Santiago, Chile.

En analogía con otros sistemas celulares, el inositol trisfosfato, IP_3 , ha sido propuesto como mensajero químico responsable del acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético. Brevemente, el modelo propone que, como consecuencia de la depolarización de la membrana de los túbulos transversales, se formaría IP_3 por hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), liberándose al espacio triádico. El IP_3 alcanzaría por difusión la región de las cisternas terminales del retículo sarcoplasmático abriendo canales de calcio con lo cual aumenta la concentración de calcio intracelular. Finalmente, el IP_3 debe ser degradado por fosfatasa específicas.

En estudios realizados con células musculares y con membranas aisladas de músculo esquelético de anfibio, hemos determinado la presencia de maquinaria metabólica para la síntesis y degradación de PIP_2 y para el catabolismo de IP_3 . Estos resultados apoyan la hipótesis de IP_3 como mensajero químico del acoplamiento excitación-contracción en músculo esquelético.

Financiado por Fondecyt 896, NIH GM 35981 y Univ. de Chile DTI 2123.

PHOSPHOLIPID SIGNALLING SYSTEMS IN THE ACTION OF INSULIN. Farese, R., Villa, M., Standart, M., Ishizuka, T., Hoffman, J., Cooper, D. Departments of Internal Medicine and Biochemistry, University of South Florida and J.A. Haley Veterans' Hospital, Tampa, Florida USA.

Insulin increases diacylglycerol (DAG) through hydrolysis of a phosphatidylinositol (PI)-glycan, de novo synthesis of phosphatidic acid (PA), and hydrolysis of phosphatidylcholine (PC). Insulin increases de novo PA synthesis apparently through activation of glycerol-3-phosphate acyltransferase by a low molecular weight insulin mediator derived from the PI-glycan through activation of a phospholipase C (PLC). Activation of this PLC appears to require a pertussis toxin-sensitive, G protein. Activation of another PLC, which hydrolyzes PC, also occurs, and this effect of insulin is mimicked by protein esters and other agonists which activate protein kinase C (PKC). Presumably, DAG, derived from hydrolysis of the PI-glycan and/or de novo PA synthesis, may activate the PKC-PLC. Insulin-induced increases in DAG have now been shown to activate PKC in EC3H-1 myocytes, rat adipocytes, and rat skeletal muscle preparations. This activation involves translocation of PKC from cytosol to membrane, as well as increased enzyme activity. Activation of PKC appears to play an important role in glucose transport since various agents which activate PKC also activate glucose transport, and since inhibitors of PKC inhibit the effects of insulin on glucose transport. Our findings suggest that insulin activates a PLC which hydrolyzes a PI-glycan, leading to the subsequent activation of both de novo PA synthesis through PI-glycan-derived headgroup mediators, and PC hydrolysis through PKC-dependent activation of a PKC-PLC. DAG production is enhanced through all these mechanisms, leading to activation of PKC which appears to play an important role in the actions of insulin, most notably glucose transport.

PROTEINAS G EN LA TRANSDUCCION DE SEÑAL EN OOCITOS DE *X. laevis* (G proteins in signal transduction of *Xenopus laevis* oocytes). Clate, J. y Allende, J.E.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

La señal originada en el exterior de la célula por la interacción de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento con sus respectivos receptores es transducida hacia el interior de la célula por un grupo de proteínas de membrana, denominadas proteínas G. Estas proteínas son heterodímeros formados por las subunidades, α y β , y su función es dependiente de GTP. Actualmente se han clonado 18 diferentes subunidades, 2 subunidades α y 2 subunidades β . Estas proteínas están presentes en todos los eucariotes, desde levadura hasta mamíferos, indicando esto la importante función que ellas cumplen en la regulación celular.

En oocitos de *X. laevis* el proceso de maduración y fertilización son iniciados por la hormona progesterona y espermió, respectivamente. Ambas señales extracelulares son transducidas hacia el interior del oocito por proteínas G. Estudios indirectos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que estas proteínas G son del tipo Gs y Gi. Con el propósito de identificar estas proteínas G, hemos clonado los cDNA codificantes para 4 de estas proteínas. La secuencia de aminoácidos deducida indica que corresponden a los tipos Gs-1a, Gs, Gi-1 y Gi-3 descritas en mamíferos. Para iniciar el estudio de la función de estas proteínas, hemos subclonado los cDNA en un sistema de expresión bacteriano y se ha analizado algunas propiedades de estas proteínas G recombinantes, como su ADP-ribosilación por la toxina de *Bordetella pertussis* y su interacción con las subunidades.

Paralelamente se han obtenido los respectivos mRNA y proteínas G en un sistema de transcripción y traducción in vitro con el objeto de expresar estas proteínas en el oocito utilizando la técnica de microinyección.

CANALES DE CALCIO EN CELULAS ENDOCRINAS: REGULACION Y PAPEL, EN LA SECRECION POR EXOCITOSIS (A new class of calcium channels controlled by receptor activation and second messenger). Rojas, E., Hidalgo, J., Carroll, P., Alvarez, I., Cera, Stutzin, A. y Stojilkovic, S. Laboratorio de Biología Celular y Genética, Servicio Nacional de Salud, Bethesda, USA y Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Tres tipos de canales de Ca^{2+} sensibles al potencial de membrana, (denominados L, T y N) controlan una fracción importante del Ca^{2+} que entra a la célula. Estudios en cultivos primarios de diferentes tejidos endocrinos han revelado la presencia de uno o más de estos tipos de canales en la membrana plasmática de las células secretoras. Nuestros resultados confirman que el canal de Ca^{2+} de tipo L, que no se inactiva al despolarizar la membrana y que es sensible a las dihidropiridinas, se encuentran en las células cromafines de la glándula adrenal, en células B del islote Langerhans y en células de la adeno-hipófisis (gonadotrofos). Además hemos establecido que tanto las células B como los gonadotrofos poseen el canal de Ca^{2+} de tipo T que presenta inactivación por despolarización de la membrana y que es insensible a las dihidropiridinas. Sabemos que la respuesta secretora en estos tres tipos celulares va siempre acompañada de un marcado aumento global del Ca^{2+} citosólico, (Ca^{2+})_i. La contribución de cada uno de estos canales al aumento de (Ca^{2+})_i, que es un pre-requisito en la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática, aún no ha sido establecida. Ciertamente existen algunos resultados paradójicos para cada uno de estos tres sistemas celulares que obligan a pensar en canales alternativos para la entrada de Ca^{2+} .

En nuestra búsqueda de tal mecanismo alternativo, en células secretoras hemos descubierto un tipo de canales de Ca^{2+} (denominado G) con las siguientes propiedades comunes: i) corriente unitaria 1 pA (cell-attached) y (Ca^{2+})_i ≈ 25 nM, ii) activación por agonistas de receptores específicos o por el metabolismo de la glucosa y, iii) relativamente insensible al potencial de membrana, a la concentración de Ca^{2+} (nM) en el lado citosólico y a los agentes convencionales que inhiben la activación de los canales L, T y N. Nuestros resultados indican que este tipo de canal juega un papel fundamental en la respuesta secretora de los tres tipos celulares.

SIMPOSIO PROCESAMIENTO INTRACELULAR DE PROTEINAS

Coordinador: Alfonso González

MUTACIONES QUE AFECTAN EL ENSAMBLAJE PEROXISOMAL (Mutations affecting peroxisomal assembly) Santos, M.J. Dept. Biología Celular, P. Universidad Católica de Chile.

Los peroxisomas son organelos celulares esenciales, cuyas proteínas son sintetizadas en ribosomas libres e importadas postraduccionalmente al organelo, sin procesamiento proteolítico. Recientemente, se han identificado señales de destinación en las proteínas peroxisomales en su extremo carboxílico. También se han identificado algunos elementos de la maquinaria de importación de estas proteínas, tales como proteínas de membrana y ATP.

Estamos caracterizando células que son portadoras de mutaciones que afectan múltiples funciones peroxisomales, como es el caso del Síndrome de Zellweger. Enfermedad genética humana, letal, en que no se detectan peroxisomas. Concordante con este hallazgo, las proteínas destinadas a la matriz peroxisomal se sintetizan en forma normal, pero permanecen en el citoplasma o son degradadas. En cambio las proteínas de la membrana peroxisomal son ensambladas en vacuolas aparentemente vacías ("fantasmas peroxisomales"). Esto sugiere que el defecto de esta afección reside a nivel de la maquinaria de importación de proteínas peroxisomales al interior del organelo.

Hemos evaluado la presencia de heterogeneidad genética en este síndrome. Mediante técnicas de genética de células somáticas detectamos la presencia de 5 grupos de complementación distintos en esta afección, lo que implicaría que al menos 5 genes participan en el ensamblaje normal de los peroxisomas.

UN GLICOLIPIDO ACTUA COMO SENAL PARA LA SEGREGACION DE PROTEINAS APICALES (A glycolipid acts as a signal for the sorting of apical proteins). Rodríguez-Boulán, E., Caras, I., Saltiel, A. and Lisanti, M. Departamento de Biología Celular y Anatomía, Cornell University Medical College, New York, NY; *Genentech, California; *Rockefeller University, NY.

Nuestro laboratorio está interesado en los mecanismos que determinan la polaridad de la célula epitelial. Previos estudios con virus encapsulados que geman en forma polarizada de la superficie de células epiteliales en cultivo han demostrado que proteínas apicales y basolaterales son segregadas en las cisternas distales del aparato de Golgi, e incorporadas en vesículas de transporte distintas que se fusionan con la cara celular correspondiente (para revisión, ver Rodríguez-Boulán y Nelson, Science, August 1989). Ciertos glicolípidos son segregados también en el Golgi y cotransportados en vesículas a la cara apical en forma preferencial (ibidem). Para tratar de entender la relación entre segregación de glicolípidos y proteínas apicales, hemos estudiado la polaridad de proteínas ancladas por la unión covalente con glicosil-fosfatidilinositol (Proteínas-GPI) en la línea renal epitelial MDCK. Todas las proteínas-GPI (un total de 6) en MDCK están polarizadas en la cara apical (Lisanti y col., PNAS USA 85:9557, 1988). Otras líneas celulares epiteliales, LLC-PK1 (renal) y Caco2 (intestinal), también muestran una distribución apical de proteínas-GPI. Finalmente, transferencia de GPI a una proteína basolateral (la glicoproteína gD1 de Herpes) o a una proteína de secreción no polarizada (hormona de crecimiento), usando técnicas de ADN recombinante, resulta en la segregación apical de estas neoproteínas-GPI. (Financiado por grants de NIH, AHA, ACS y por el MDPHD program de la Universidad de Cornell)

TOPOGRAFIA DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PROTEINAS EN EL LUMEN DEL RETICULO ENDOPLASMICO Y APARATO DE GOLGI. (Topography of posttranslational modifications of proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus). Hirschberg, C.B.* , Abeijon, C.* , Capasso, J.* , Milla, M.* , Clairmont, C.* , Yanisawa, K. , Y Robbins P.W. , *Depto. de Bioquímica, Escuela de Medicina, Univ. de Massachusetts, Worcester, MA, y Depto. de Biología, MIT, Cambridge, MA.

Estudios en nuestro laboratorio, usando enfoques bioquímicos, genéticos y de biología celular, han demostrado que la membrana del aparato de Golgi (AG) contiene transportadores específicos para nucleótidos azucar y PAPS. Recientemente hemos obtenido evidencia para un transportador de ATP en las membranas del AG y retículo endoplásmico (RE). Estos sustratos son transportados desde el citosol hacia el lumen de vesículas del AG y RE a través de un intercambio con el nucleótido monofosfato correspondiente. Se han preparado proteoliposomas que pueden transportar nucleótidos azucar específicamente. Este enfoque debiese ser útil en la purificación y caracterización de las proteínas transportadoras. También hemos obtenido recientemente evidencia de un transportador de GDP-manosa en vesículas de tipo Golgi en levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Además, hemos descrito que la membrana del RE del hígado de rata contiene transportadores para UDP-N-acetil glucosamina y UDP-glucosa pero no para GDP-manosa. Esto sugiere que la síntesis de oligosacáridos unidos a dolicol ocurre de manera asimétrica en la membrana de este organelo y que la topografía de glicosilación de macromoléculas es diferente en membranas de distintos organelos.

SIMPOSIO: DESTINACION Y PROCESAMIENTO INTRACELULAR DE PROTEINAS (Intracellular addressing and processing of proteins) Coordinador: Alfonso González de la Rosa. Fac. de Medicina. P. Univ. Católica de Chile.

Las proteínas, luego de su síntesis en el compartimento citosólico, son destinadas a sus distintos sitios de función en la célula o a rutas específicas para su secreción. Durante este proceso a menudo deben atravesar membranas, sufren modificaciones importantes en su estructura, y pueden ser sustrato de eventos de reconocimiento que las retienen en ciertos compartimentos o las dirigen hacia vesículas específicas de transporte. Estos aspectos se expondrán, junto con los modelos experimentales para su estudio, en relación al ingreso y recorrido de proteínas en la ruta exocítica y a la biogénesis de peroxisomas. Se analizará el aparato que transloca proteínas a través de las membranas del retículo endoplásmico (RE) y los elementos involucrados en la glicosilación de macromoléculas a nivel del RE y aparato de Golgi. El tráfico de proteínas entre el aparato de Golgi y la superficie celular será examinado en relación a las rutas alternativas de transporte y a las posibles señales de destinación que en distintas células epiteliales deben dar cuenta de la biogénesis de gránulos de secreción o de una superficie celular polarizada. Por otro lado, el análisis de la biogénesis de peroxisomas mostrará otros problemas propios de la segregación post-traducciona/ de proteínas a organelos limitados por membranas.

COMPONENTES DE LAS VESICULAS DE SECRECION. (Sorting of Secretory Vesicle Components). KELLY, R. Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143.

The formation of organelles requires the proteins be sorted correctly to their destinations. The soluble proteins inside endocrine secretory granules have sorting information that allows them to be selected and sorted at high concentration. Recently we have begun to examine the sorting of membrane proteins in secretory cells. We have shown that synaptic vesicle membrane proteins are expressed in endocrine cells and are selectively targeted to a structure with the properties of authentic synaptic vesicles. These synaptic vesicle-like structures arise by endocytosis. They are not present in non-neuronal cells, even when DNA encoding a synaptic vesicle protein is expressed in them. Sorting of synaptic vesicle proteins into synaptic vesicles promises to be a fruitful area of research since the vesicles are simple, easy to isolate and very well characterized.

SIMPOSIO DIFERENCIACION CELULAR EN PLANTAS.

Coordinadora: *Gloria Montenegro*

Simposio: DIFERENCIACION CELULAR EN PLANTAS. (Differentiation in plant cells). Montenegro, G. Coordinador. Laboratorio de Botánica, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La importancia del conocimiento de la biología celular y molecular en plantas es hoy día indiscutible debido a la creciente necesidad de seleccionar plantas resistentes a patógenos y a herbicidas; propagar plantas resistentes a la sequía con fines de reforestación en zonas áridas y otras que generen recursos vegetales con potencial económico ya sea industrial, medicinal o alimenticio.

Durante el desarrollo del simposio se analizarán los últimos avances en aspectos de la estructura molecular de la pared celular y el rol en el crecimiento y diferenciación de la célula; cambios ultraestructurales de células sometidas a la falta de gravedad (experimentos recientes realizados a bordo de la Nave Espacial Columbia) y respuestas morfogénicas de plantas cultivadas in vitro correlacionadas con la manipulación de factores exógenos y de la totipotencialidad de la célula vegetal.

Proyecto FONDECYT 199/88

REGULACION DE RESPUESTAS MORFOGENICAS DE PLANTAS IN VITRO. (*In vitro* regulation of Plant Morphogenesis). Jordán, M. Laboratorio de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago.

Mecanismos conducentes a la regeneración de plantas *in vitro* a partir de células y tejidos, implican revertir inicialmente programas ontogénicos pre-determinados gatillándose posteriormente diversos procesos de diferenciación, organogénesis y embriogénesis. En el caso de una reembrionalización de células parenquimáticas, de microsporas, o de tejidos, las respuestas morfogénicas en diferentes especies pueden ser gatilladas por la concentración y niveles entre varias fitohormonas utilizadas (androgénesis, embriogénesis somática, organogénesis caulinar y radicular), la especificidad de citoquinas (variación somaclonal), el tiempo de inducción por auxinas (rizogénesis) y la densidad celular junto con condicionantes en medios de cultivo para suspensiones celulares y fusión de protoplastos. Las respuestas morfogénicas por factores endógenos dependen mayormente del tipo y condición del explante, de la edad del tejido u órgano, la evolución del metabolismo secundario, especialmente el grado de oxidación de compuestos fenólicos en plantas leñosas y, la situación de estabilidad metabólica y cromosomal en cultivos de larga permanencia *in vitro*. Se ilustran diferentes ejemplos de plantas estudiadas en nuestro laboratorio que responden específicamente ante las condiciones de cultivo indicadas.

Proyecto FONDECYT 0669/89, DIUC 85/86 y PNUD/ONUDI-RLA/83/003/PRB.

MIMICKING IN ULTRASTRUCTURAL EFFECTS OF MICROGRAVITY IN PLANT CELLS. Randy Moore and William Bowie, Department of Biological Sciences, Wright State University, Dayton, OH, USA and Krug International, Lyndon B. Johnson Space Center (NASA), Houston, TX, USA.

The objective of this research was to determine how effectively the actions of a classical clinostat and the Slow Turning Lateral Vessel (STLV) mimic ultrastructural effects of microgravity in plant cells. We accomplished the objective by comparing the ultrastructure of cells grown on clinostats and in the STLV with that of cells grown at 1g and in microgravity aboard the Space Shuttle Columbia. Cells of calli and intact seedling of corn and mustard spinach grown in microgravity and in the STLV contained significantly more lipid bodies, significantly less starch and fewer dictyosomes than comparable cells grown at 1g. Cells of seedlings grown on clinostats had significantly different ultrastructure than those grown in microgravity or in the STLV, indicating that clinostats do not mimic microgravity at the cellular level. Calli and seedlings grown in the STLV had ultrastructure similar to those grown in microgravity, indicating that the STLV effectively mimics microgravity at the cellular level.

LAS PROTEINAS DE LA PARED CELULAR Y SU POSIBLE ROL EN EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACION DE LA CELULA VEGETAL. (The plant cell wall proteins and their possible role on the growth and differentiation of the plant cell).

Cardemil, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La pared celular de las células vegetales puede considerarse como una matriz extracelular constituida de polisacáridos neutros, ácidos, polímeros de resistencia, y de proteínas, entre las cuales la más conocida es la extensina. La extensina es una proteína básica rica en hidroxiprolina y glicosilada en los residuos de hidroxiprolina y serina con arabinosa y galactosa respectivamente. La pared celular regula el crecimiento en longitud de la célula vegetal y le da su forma durante la diferenciación celular. Además protege a la célula vegetal.

De todos los componentes de la pared, es la extensina la que más aumenta cuando la célula sufre heridas o algún daño mecánico. El aumento de extensina en la pared celular se correlaciona con una detención del crecimiento celular.

Las semillas y plántulas de Araucaria araucana, responden al estrés de heridas con un aumento de hasta 3 veces el nivel basal de proteínas de pared, en el caso del embrión y de 20 veces en el caso del megagametofito. Inmunoimpresión de los tejidos de semillas y plántulas, en papel de nitrocelulosa, usando anticuerpos policlonales obtenidos contra extensina de zanahoria o contra la extensina de cubiertas de semillas de soja, revela que la expresión de la proteína depende del tiempo de desarrollo y del tejido dañado.

Las proteínas de pared celular de semillas y plántulas de A. araucana, se han caracterizado por electroforesis en geles SDS poliacrilamida y catiónica y su composición aminoácida se ha determinado. (FONDECYT 0160; AID/OPS 542G-SS-8073-00).

ROL DE POLISACARIDOS DE ALMACENAMIENTO EN PARED CELULAR DE SEMILLAS. (The role of storage cell wall polysaccharides in seeds¹). Dietrich, S.M.C. Instituto de Botánica, Caixa Postal 4005-01051 São Paulo, S.P. Brasil.

Storage cell wall polysaccharides found in seeds are the galactomannans and xyloglucans. Both have been shown to be degraded after germination and the enzymes responsible for the complete hydrolysis have been studied in a few species.

Galactomannans are potentially important for the chemotaxonomy of Leguminosae since their yield and mannose: galactose (M:G) ratio vary within subfamilies and genera. A survey of galactomannan in seeds of tropical Leguminosae indicated that it occurs more frequently and in higher amounts in species of the subfamily Caesalpinioidae than in Mimosoidae and Faboidae. Galactomannans of Caesalpinioidae present higher M:G ratio. Considering the evolutive pattern accepted for the Leguminosae in which Mimosoidae derived from Caesalpinioidae with Faboidae being the more evolved subfamily, the data suggest that in the course of evolution there was a decrease in galactomannan content with an increase in the proportion of galactose in the molecules. Galactomannans are highly hygroscopic compounds and their degree of solubility is inversely proportional to the M:G ratio. One could then suggest that the increased branching (lower M:G ratio) of galactomannans in Faboidae may represent an evolutive adaptation providing an enhancement of cell water-potential with lesser amounts of the polysaccharide. No correlation was found between galactomannan and velocity of seed imbibition whereas seeds with high content and high M:G ratio imbibed more water per weight.

Perhaps the role of galactomannans in plant water-relations would be better envisaged in plants of arid zones such as the Brazilian "caatingas" and the deserts.

1. Aided by FAPESP and CNPq.

SIMPOSIO MATRIZ EXTRACELULAR

Coordinador: *Enrique Brandan*

SINTESIS, FUNCION Y REGULACION DE LA MATRIZ EXTRACELULAR. (Synthesis, function and regulation of the extracellular matrix). Coordinador: Dr. Enrique Brandan, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

La matriz extracelular participa en un número de funciones celulares en las cuales destacan adhesión, migración, proliferación y regulación de la expresión génica. Varios componentes de la matriz extracelular han sido aislados destacando entre sus constituyentes, al colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas no-colagenosas como fibronectina y laminina.

En este simposio, el Dr. A.R. Kornblihtt mostrará evidencia de la regulación del gen de fibronectina a través del cAMP y la participación de diferentes factores en su expresión. A continuación, el Dr. E. Brandan mostrará líneas experimentales en las cuales se evalúan la síntesis y el procesamiento de proteoglicanos de heparán sulfato, como el análisis de un modelo en el cual se estudia la regulación de la expresión de estos proteoglicanos. Luego, el Dr. J.J. Minguell nos mostrará cómo la interacción de elementos de la matriz extracelular con células troncales hematopoyéticas tiene una gran influencia en la diferenciación de éstas. Finalmente, el Dr. C.P. Dietrich presentará evidencia experimental que indica la importancia de las cadenas de glicosaminoglicanos presentes en los proteoglicanos de heparán sulfato, las cuales participarían en procesos de reconocimiento célula-célula y en el control del crecimiento celular.

SULFATACION, ASOCIACION CELULAR Y EXPRESION DE PROTEOGLICANES (Sulfation, cellular association and expression of Proteoglycans). E. Brandan, Facultad Ciencias Biológicas. P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Los proteoglicanos (PGs) corresponden a un grupo de macromoléculas compuestas de una proteína central y cadenas de carbohidratos sulfatados, llamados glicosaminoglicanos (GAGs). Los PGs se encuentran asociados a la superficie celular por interacciones hidrofóbicas y/o hidrofílicas, o bien están presentes en la matriz extracelular interactuando con otros componentes. Diferentes funciones biológicas se han atribuido a los PGs de manera que es importante determinar los eventos moleculares involucrados en su síntesis como en la regulación de su expresión. Las reacciones de adición y sulfatación de los GAGs ocurre exclusivamente en el aparato de Golgi. La enzima responsable de la adición de grupos sulfatos a la glucosamina presente en los GAGs constituyentes de los PGs de heparán sulfato (PGHS), corresponde a una glicoproteína cuya actividad específica está enriquecida en 65.000 veces con respecto al homogeneizado. Los PGHS se encuentran asociados al aparato de Golgi a través de interacciones hidrofóbicas, mientras que en la membrana plasmática se encuentra además una forma hidrofílica de éste, existiendo una relación precursor-producto entre estas dos formas de PG. Como modelo para estudiar la regulación de la expresión de PGs hemos evaluado los niveles de síntesis en músculos esqueléticos de rata. Un aumento significativo en la síntesis de PGs, se observa a los pocos días de producir desnervación. Experimentos en los cuales se ha bloqueado la actividad muscular, sugieren que la influencia neural en la expresión de PGs musculares es a través de la actividad muscular.

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN DE LA FIBRONECTINA POR AMPc EN CELULAS DE LA GRANULOSA DEL OVARIO. (Regulation of fibronectin gene transcription by cAMP in ovary granulosa cells) Bernath, V.A., Muro, A., Barañao, J.L. y Kornblihtt, A.R. INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

La fibronectina (FN) es la proteína mejor caracterizada de la matriz extracelular. Un solo gen da origen a veinte polipéptidos diferentes por un complicado mecanismo de procesamiento alternativo del mRNA. Los fenómenos de adherencia y migración celulares relacionados con el desarrollo embrionario, la diferenciación y el cáncer dependen en gran parte de la interacción de la FN con su receptor celular (integrina).

La síntesis de FN es marcadamente inhibida por FSH, forskolina y AMPc, en una línea de células de la granulosa bovina establecida en nuestro laboratorio. Las gonadotropinas (FSH y LH) promueven la diferenciación de las células de la granulosa durante la maduración del folículo, activando la síntesis de estrógenos. El efecto del AMPc sobre la FN es máximo a las 48 hs y es consecuencia de una dramática reducción de los niveles de mRNA de FN, la cual depende de la síntesis de proteínas. El análisis *in vitro* de la interacción de factores de transcripción con la región promotora del gen de la FN revela que existen diferencias específicas de tejidos: mientras extractos de granulosa sólo tienen factores que reconocen los elementos proximales CRE (cyclic AMP recognition element) y SP1, extractos de hígado tienen factores que reconocen los elementos CRE, CAAT, SP1 y AP2. La demostración de interacciones proteína-proteína entre los factores que reconocen CRE y CAAT, así como el hallazgo de distintos tipos de interacción DNA-proteína entre el elemento CRE y su factor, nos permiten definir los mecanismos moleculares del rol inhibitorio del AMPc, comparándolos con los que median el ya bien documentado rol activador transcripcional del AMPc en otros genes de mamíferos.

HEMATOPOYESIS: ROL DE MATRIZ EXTRACELULAR. (Role of extracellular matrix components in hemopoiesis). Minguell, J.J. Unidad de Biología Celular. INTA. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

La comprensión del proceso hematopoyético ha sido facilitada por la disponibilidad de sistemas de cultivo de médula ósea (long-term cultures) como asimismo de varias líneas celulares con características tanto de precursores hematopoyéticos como de fenotipos de estroma. La mediación de elementos de estroma en la regulación de la hematopoyesis ha sido ampliamente establecida, sin embargo, los mecanismos involucrados aún no están aclarados. Factores de crecimiento (FC) como IL-3, GM-CSF, G-CSF y M-CSF al igual que moléculas de matriz extracelular (ME) como glicoproteínas, proteoglicanos (PG) y colágeno claramente tienen un rol en la hematopoyesis.

Líneas celulares hematopoyéticas equivalentes a progenitores del tipo CFU-G/M sintetizan y exponen PG de condroitin sulfato asociados a la membrana. Estas moléculas permiten la adhesión del progenitor, vía fibronectina, a células de estroma. El recambio o procesamiento de PG parece ser instrumental para el ulterior inicio de procesos de proliferación y diferenciación de la célula troncal. En estos eventos, otros compuestos de ME (glicoproteínas y proteoglicanos) unen FC (IL-3 y GM-CSF) y los "presentan" a receptores de la célula progenitora. De este modo la adecuada organización en el espacio y en el tiempo de células de estroma y sus productos, ME y FC, genera microambientes en los cuales la célula troncal hematopoyética se aloja, se autoreplica y se diferencia a los diferentes linajes hematopoyéticos.

HEPARAN SULFATOS: ESTRUCTURA, BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA. (Heparan sulfates: Structure, Biosynthesis and Biological activity). Dietrich, C.P., Nader, H.B., Moraes, C.T., Oliveira, F.W., Jeronimo, S.M.B., Ferreira, T.M.P.C. and Chavante, S. Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, S.P. Brasil.

We have previously shown that heparan sulfates are ubiquitous components of membranes and extracellular matrices of cells in culture and vertebrate and invertebrate tissues and also exhibit a peculiar structural variability. Heparan sulfate is composed of four disaccharide units made of glucosamine and glucuronic acid. The glucosamine is either N-acetylated or N-sulfated and also may contain a sulfate at the C-6 position of the hexosamine moiety. The proportion of these four units as well as the molecular weight of these compounds vary according to the tissue and species of origin. Each tissue contains a specific heparan sulfate which is synthesized in the embryonic development during the citodifferentiation stage and whose proportion of the four disaccharide units remains unchanged until the complete development of the species. Inhibition of the synthesis of heparan sulfate by selenate arrests growth of endothelial cells in culture and inhibits molting of the insect *Rhodnius prolixus*. Although in small amounts, the heparan sulfate synthesized in the presence of selenate, has the same structure of the one synthesized by control cells. This implies that the sulfation is a necessary step for chain polymerization. All the results obtained so far suggests that heparan sulfates are involved in cell-cell recognition processes (independent from fibronectin and laminin) and in the control of cell growth.

(Aided by grants from FINEP, CNPq and FAPESP, Brasil)

SIMPOSIO ORGANIZACION FUNCIONAL DEL NUCLEO

Coordinador: Raúl Fernández

SIMPOSIO ORGANIZACION FUNCIONAL DEL NUCLEO (Functional organization of the Nucleus). **Fernández-Donoso R.**, Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Estudios paleontológicos y de evidencias fósiles sugieren que los eucariontes emergieron hace unos 1.500 millones de años, probablemente a partir de bacterias desprovistas de pared celular y que habrían desarrollado un citoesqueleto rudimentario. Desde esta fase inicial de la evolución del núcleo hasta alcanzar la complejidad del sistema nuclear de los animales y plantas superiores, debió irse produciendo gradualmente: 1. la aparición de la envoltura nuclear probablemente a partir de la membrana plasmática bacteriana 2. el desarrollo de un nucleoesqueleto proteico y de un sistema de señales de intercambio núcleo citoplasmático 3. la aparición de la mitosis y de cromosomas lineales provistos de centrómero, telómeros, nucleosomas y replicones múltiples y 4. la aparición de la meiosis y del complejo sinaptonémico.

Hace tal vez unos 900 millones de años, la arquitectura y organización supramolecular del núcleo habría alcanzado características semejantes a las actuales. Desde un punto de vista histórico, se puede considerar al núcleo como un compartimento celular que ha venido conservando y transmitiendo fielmente la información genética a través de generaciones celulares y de organismos. Paradojalmente, el mismo sistema nuclear ha garantizado la variabilidad individual y la diversidad evolutiva en las poblaciones naturales y especies.

Teniendo en cuenta el contexto reseñado, en este Simposio analizaremos la estructura y funcionalidad de la envoltura nuclear y de los complejos de poro. Trascendiendo el nivel puramente celular, estudiaremos las consecuencias de las interacciones DNA-proteínas nucleares en el apareamiento, recombinación y segregación cromosómicas, así como su participación en la génesis de asociaciones reiteradas entre bivalentes meióticos. Finalmente, analizaremos la evolución de determinados segmentos del DNA que están involucrados en el origen y propagación de la heterocromatina.

ORGANIZACION FUNCIONAL DEL NUCLEOLO (Functional organization of the nucleolus). **Benavente R.**, Institute of Zoology I, University of Wurzberg, 8700 Wurzberg, FRG.

El microscopio electrónico permite identificar tres componentes en el nucléolo: a) los centros fibrilares, b) el componente fibrilar denso y c) el componente granular. Estudios previos, basados en técnicas de autoradiografía, sugieren que la transcripción del DNA ribosomal (rDNA) tiene lugar en el componente fibrilar denso, mientras que en el componente granular tendría lugar el procesamiento y empaquetado de las partículas preribosomales. Sin embargo, estudios posteriores con técnicas inmunocitoquímicas han permitido localizar a la RNA polimerasa I (la enzima responsable de la transcripción del rDNA), exclusivamente, en los centros fibrilares, sugiriendo que la transcripción tiene lugar en dicho componente (1). Recientemente, hemos iniciado una serie de experimentos cuyo objetivo es el estudio del rol funcional de los componentes nucleolares, utilizando técnicas de microinyección de anticuerpos (2). Mediante esta técnica es posible interferir, selectivamente, en la función de una proteína nucleolar por vez. Las alteraciones en la organización funcional del nucléolo, inducidas mediante este procedimiento, pueden ser evidenciadas con la ayuda de técnicas inmunocitoquímicas, autoradiográficas y de microscopía electrónica. Se presentarán los resultados de estos estudios, los que serán discutidos a la luz de los conceptos corrientes sobre la estructura y función nucleolar.

(1) Scheer U & Rose KH: PNAS 81, 1431 (1984).

(2) Benavente R et al: J Cell Biol 105, 1483 (1987);
Chromosoma 97, 115 (1988);
Exp Cell Res 178, 518 (1988).

LAS PROBABILIDADES DE ASOCIACION DE LOS BIVALENTES NUCLEOLARES EN EL ESPERMATOCITO HUMANO (Probabilities of association between nucleolar bivalents in human spermatocytes). **Fernández-Donoso R.**, Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha postulado que durante la profase de la meiosis las asociaciones entre los bivalentes nucleolares no ocurren al azar y que se producen debido a la atracción de la heterocromatina presente en sus brazos cortos y/o por la formación de nucléolos comunes entre dos o más bivalentes. Con el propósito de dilucidar las restricciones que al simple azar debería imponer la particular arquitectura del núcleo del meiocito, se realizó un estudio probabilístico que consideró las interacciones entre los telómeros de los bivalentes con el área total AT y con áreas restringidas AB de la envoltura nuclear. Las probabilidades se calcularon a través de una derivación de la fórmula de Peller para la distribución de partículas homogéneas en espacios discretos. Las probabilidades esperadas ESP-AT y ESP-AB para cada clase de espermatocito según la combinatoria de asociaciones SPTR, fueron las siguientes:

SPTR	ESP-AT	ESP-AB
5000000	0,00	0,04
4100000	0,00	1,24
3200000	0,00	2,50
3110000	0,12	12,50
2210000	0,18	18,74
2111000	10,60	49,99
1111100	89,10	14,99

Se compararon ESP-AT y ESP-AB con las frecuencias de asociaciones en reconstrucciones 3-D de series ópticas de 60 espermatocitos en paquitenio. Se encontró que los valores de ESP-AB se ajustan a las frecuencias observadas. Estos resultados sugieren que las asociaciones entre bivalentes nucleolares podrían ocurrir al azar en un ámbito restringido del núcleo, el cual correspondería al espacio en el que se organiza el bouquet.

Proyecto Fondecyt 1194 y Proyecto D.T.I. B2686.

MECANISMOS DE APAREAMIENTO Y RECOMBINACION EN LOS CROMOSOMAS SEXUALES. (Mechanisms of pairing and recombination in sex chromosomes). **Solari A. J.**, Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los cromosomas sexuales heteromórficos han surgido repetidamente en grupos zoológicos en los que una estabilidad adicional del sexo genotípico es ventajosa. Hay un patrón general en la conducta meiótica de los cromosomas sexuales heteromórficos, ya sea de machos XY en mamíferos como de hembras ZW de aves. En los pares XY de mamíferos hay regularmente una sinapsis parcial demostrable por el complejo sinaptonémico (Solari, 1974). Además existe un nódulo de recombinación (NR) localizado cerca de los extremos apareados (Solari, 1987). La región pseudoautosómica definida por sondas de ADN se equivale a la mitad distal de la región sináptica del par XY humano (en promedio 0,4 μ m), aproximadamente 50% del brazo corto del Y humano, o 5 Mb de ADN. En la gallina hay regularmente sinapsis parcial entre el Z y el W, con la formación de un NR localizado a 0,65 μ m del extremo. La localización del NR no depende de la integridad del cromosoma Z, quedando localizado en igual posición en las traslocaciones Z-autosoma (Solari et al., 1988). Por consiguiente, el patrón general meiótico de los pares heteromórficos comprende la sinapsis regular, con zonas homólogas y no homólogas, más la presencia de señales (región "caliente") para una recombinación localizada. Las conductas excepcionales de los pares XY de marsupiales y de *Psammomys* sugieren la presencia de patrones secundarios alternativos. La heteropnosis propia del par XY de los mamíferos podría ser regulada separadamente y está relacionada con la viabilidad del meiocito en las hembras excepcionales de *Akodon azarae*. (Apoyado por CONICET y F. Antorchas).

LA VARIACION DEL DNA ALTAMENTE REPETIDO A NIVEL INTRA E INTERESPECIFICO. (Inter-and intraespecific variation of the highly repeated DNA). Bianchi, N.C. IMBICE, C.C. 403, 1900 La Plata, Argentina.

La heterocromatina está formada por secuencias cortas de ADN, altamente o moderadamente repetidas, y agrupadas en áreas restringidas de los cromosomas. En el ADN repetido que forma la heterocromatina existen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Por tal motivo, cuando se digieren los cromosomas con enzimas de restricción del tipo de las denominadas "cortadoras frecuentes" se produce una extracción del ADN cromosómico, y se induce un bandedo que permite cuantificar la frecuencia aproximada de los sitios de restricción. Este método se empleó para evaluar la frecuencia de sitios de reconocimiento *AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MboI*, *DdeI* y *RsaI* en la heterocromatina de individuos pertenecientes a especies filogenéticamente cercanas, y en individuos pertenecientes a una misma especie. Los resultados obtenidos muestran una marcada variabilidad en la frecuencia de los sitios de reconocimiento de las endonucleasas antes mencionadas a nivel interespecífico, interindividual y también en los cromosomas de un mismo individuo. Estos hallazgos permiten realizar inferencias acerca del mecanismo de origen de la heterocromatina y acerca de su nivel mutacional.

LA ENVOLTURA NUCLEAR. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LOS COMPLEJOS DE PORO. (The Nuclear Envelope. Structure and Function of Pore Complexes). Berrios, M. Department of Pharmacological Sciences, School of Medicine, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794-8651, U.S.A.

Complejos de poro son estructuras supramacromoleculares que forman canales entre el núcleo y el citoplasma de células eucarióticas. Varias publicaciones indican que estos organelos están implicados en la regulación del tráfico de macromoléculas a través de la envoltura nuclear. Estructuralmente, cada complejo de poro tiene dos anillos paralelos compuestos de ocho subunidades anulares. Uno de ellos está expuesto al nucleoplasma y el otro al citoplasma. Interpuesta entre estos dos anillos hay una estructura cilíndrica que define el canal del complejo de poro. Estudios de microinyección celular sugieren que este canal tiene un diámetro máximo de difusión pasiva de alrededor de 9 nm. Sin embargo, poros nucleares pueden transportar macromoléculas substancialmente más grandes; el importe de proteínas más grandes que 70 kD es aparentemente específico y requiere energía. Varios polipéptidos han sido localizados en el complejo de poro. Entre estos hay glicoproteínas, algunas de las cuales contienen una nueva variedad de enlace glicosídico. La localización histoquímica de una actividad ATPásica aparentemente asociada con el poro nuclear, así como la evidencia reciente en cuanto a requisitos energéticos para el importe de proteínas específicas *in vitro* han resultado en un considerable interés en caracterizar las ATPasas asociadas con el complejo de poro. Nosotros hemos comunicado previamente la identificación de un polipéptido de alta masa molecular con actividad ATPásica asociado con fracciones enriquecidas en envolturas nucleares. Este polipéptido está relacionado con la cadena pesada de miosina y ha sido localizado *in situ* en poros nucleares usando anticuerpos conjugados con oro coloidal y microscopía electrónica de transmisión. Basándonos en estas observaciones, hemos propuesto un modelo en el cual las moléculas de miosina serían componentes de los complejos de poro. Observaciones preliminares usando anticuerpos conjugados con oro coloidal indican que las cadenas livianas de miosina también están asociadas con los complejos de poro. Esta reciente observación da apoyo adicional a la noción que moléculas de miosina son componentes tanto estructurales como funcionales en poros nucleares.

SIMPOSIO INTERACCIONES GAMETICAS

Coordinador: *Claudio Barros*

INTERACCIONES GAMETICAS EN ANIMALES (Gamete interactions in animals) Barros, C. Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. Se puede considerar que la fecundación es el punto límite entre la vida y la muerte. Si el ovocito es fecundado este se activa y se inicia el desarrollo que lleva a la formación de un nuevo individuo. En tanto que si no es fecundado este degenera y muere. En esta interacción la superficie de los gametos es de primordial importancia para establecer su reconocimiento y posterior formación del cigoto. Las presentaciones de los Drs. Esponda y Cabada abordarán esta problemática asociada a las glicoproteínas de superficie del espermatozoide y de las cubiertas vitelinas. En la mayor parte de las especies el espermatozoide debe experimentar la reacción del acrosoma como un prerequisite para atravesar las cubiertas ovocitarias durante la fecundación aspecto que será discutido en los anfibios por el Dr. Cabada. La Dra. Cuasnicu discutirá el mecanismo de inducción de la reacción del acrosoma en mamíferos, y la participación del ambiente oviductal en la fase final de la capacitación y proveer así un mecanismo autónomo para la reacción acrosómica. El éxito de la fecundación requiere de la internalización del núcleo del espermatozoide así como de movimientos de los pronúcleos al centro del huevo los que son mediados por elementos del citoesqueleto, aspectos que serán discutidos por el Dr. Schatten. Finalmente los conocimientos adquiridos con el estudio de la fecundación se ha traducido en su aplicación a la reproducción humana a través de la fecundación extracorpórea planteando importantes interrogantes las que serán discutidas por el Dr. Austin, codescubridor del fenómeno de la capacitación espermática y por decir así "padre de la fecundación *in vitro*".

Symposium "GAMETE INTERACTIONS IN ANIMALS"

THE SIGNIFICANCE OF FERTILIZATION. Austin, C.R. 47 Dixon Road, Buderim, Q. 4556, Australia.

The fertilization of a human egg, often thought of as initiating the life of a person, is in reality but the beginning of a beginning for one or more individuals. While pronuclear fusion establishes a diploid genome, this is at first a structural entity without function. No significant RNA synthesis occurs between germinal vesicle breakdown and early cleavage, and in fact embryonic genes do not begin to find expression until about the 4- to 8-cell stage. Gene expression then progressively spreads throughout the genome, during prenatal development and beyond. The progressive nature is well shown in the early mouse embryo by the widening range of energy sources utilizable, by the rising levels of glycogen storage and by the increasing uptake of nucleic acids and protein precursors. While HCG- β RNA is transcribed in human embryos about 2 days after fertilization, it is not expressed until the 6- to 8-cell stage. Cleavage in the human embryo up to the 16-cell stage is not linked to physical or functional integration, each cell being inherently capable of giving rise to an entire person (together with a complex of placental structures); alternatively, cells from separate embryos on being brought together can jointly lead to the establishment of a chimeric individual. Multiplicity can also originate later, the primitive streak stage being the normal time for monozygotic twinning. Only when that stage has passed does true individuality exist, for (excluding anomalies) just one person can now eventuate. The gene-transfer function of fertilization can be replaced or augmented by intranuclear or intra-blastocyst gene injection, or by the use of teratocarcinoma or embryo-stem cells.

Egg-mediated motility during fertilization. Schatten, G., Wright, S., Holy, J., Thompson-Coffe, C., Simerly, C., and Schatten, H. IMR, Univ. of Wisconsin, U.S.A.

The successful consummation of fertilization requires motility effected by the oocyte cytoskeleton. The required movements include the translocation of the sperm from the oocyte's surface into the cytoplasm as well as the migrations of the pronuclei leading to their apposition at the oocyte center. By the use of microinjected derivatized-tubulin (biotinylated-tubulin and Rhodamine-tubulin), questions will be posed about the dynamics of microtubules at mammalian fertilization. Since the unfertilized oocyte is arrested at metaphase, questions will be posed as to whether the microtubules in this quiescent cell are inactive or dynamic. Since other cell types separate various classes of microtubules by post-translational modifications of α -tubulin, the spatial and temporal patterns of microtubule acetylation and detyrosination during mouse fertilization will be described. Microtubules are nucleated *in vivo* by the centrosome, the cell's microtubule organizing center (MTOC). The behavior of this structure during fertilization is unlike that predicted from studies in lower systems and has raised the hypothesis that the centrosome is maternally inherited in mammals, in contrast to the paternal pattern found in most all other animals. *In vitro* evidence suggests that the kinetochore actively translocates the chromosomes into alignment at the metaphase plate during prometaphase (condensation), and also is responsible for the separation of the chromosomes at anaphase (anaphase A). Since the mammalian oocyte is arrested at metaphase, the activity of the kinetochore can be explored with unrivaled synchrony by microinjection of antibodies specific for kinetochore proteins. These studies reinforce the importance of studying mammalian fertilization in order to generate a full appreciation of the cellular and molecular basis of reproduction in mammals.

MECHANISM OF MAMMALIAN ACROSOME REACTION INDUCTION WITH ESPECIAL REFERENCE TO THE PROCESS OF SPERM CAPACITATION. Cuasnicu, P.S. and Bedford, J.M. Cornell University, New York, USA.

Spermatozoa of all eutherian mammals studied up to date must undergo a process of capacitation in the female tract before they become capable of fertilizing an egg. This functional change allows the spermatozoa to undergo the acrosome reaction (AR) which enables it to fuse with the oolema. It has long been known that a component in the egg coat may stimulate the AR in invertebrates. The probability exists however, that this may not be so for eutherian mammals. This question which is central to a better understanding of the mechanisms of mammalian fertilization is nonetheless controversial. Some investigators have concluded that it is the interaction with the zona pellucida (ZP) that specifically induces the AR, while others have observed that the reaction occurs before the zona is reached. Recent experiments in which zona free hamster eggs were transferred into the tubal ampulla of previously inseminated females, demonstrate that a functional AR *in vivo* require no interaction with the ZP nor with other products of ovulation (Cuasnicu and Bedford, 1988) adding weight to the possibility that capacitation may provide a means of autonomous regulation of the AR. Since completion of capacitation may limit the fertile life of sperm thereafter, it seems logical that sperm become fully capacitated near the site of fertilization. In this regard, experiments in which the capacitation potential of the uterus and lower (isthmus) and upper (ampulla) region of the oviduct was explored suggest that the ampullary environment might provide the final element that completes capacitation (Cuasnicu and Bedford, submitted). Such an arrangement would be clearly beneficial for the phase of sperm storage that takes place in the isthmus, particularly in species where the interval between insemination and ovulation is often prolonged.

GLICOPROTEINAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN ESPERMATOZOIDES ANIMALES. (Plasma membrane glycoproteins in animal spermatozoa). Esponda, P. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Velázquez, 144. 28006-Madrid, España.

Una serie de experimentos han demostrado que ciertas glicoproteínas (GP) presentes en la membrana del espermatozoide de mamíferos participan en fenómenos que ocurren antes y durante la fecundación. En la mayoría de estos estudios las GP se han analizado cualitativamente; pero últimamente se han desarrollado métodos, mediante ensayos en fase sólida, que han permitido la obtención de datos cuantitativos respecto a los cambios que ocurren en el espermatozoide durante su paso por los tractos genitales. Sin embargo, el análisis comparativo revela que probablemente existen GP que poseen otras funciones aún no dilucidadas. En mamíferos, aves, reptiles y peces eslamobramquios, la membrana que tapiza el área acrosomal es la zona más rica en GP con carbohidratos terminales del tipo α -D-Manosa, α -L-Fucosa y ácido neuramínico; este hecho es llamativo en marsupiales donde el acrosoma presenta una ubicación lateral, y también en algunos invertebrados independientemente de la forma y tamaño del acrosoma. Los peces teleosteos configuran un caso especial dado que el acrosoma está ausente y varias GP son abundantes en toda la superficie de la cabeza del gameto. Cuando se analizan estos datos en relación con los mecanismos de fecundación y con los fenómenos que ocurren en el espermatozoide durante su paso por los tractos genitales, se esboza la idea de que algunas de estas GP podrían actuar como protectoras del acrosoma.

FECONDACION EN ANFIBIOS. (Amphibian fertilization).

Cabada, M.C. Área Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, R. Argentina.

En el acrosoma de los espermatozoides de algunos Anfibios Anuros se han encontrado enzimas tales como proteasas y glicosidasas. Las mismas son activas frente a las cubiertas vitelinas (CV) y al cortex de los ovocitos, los que al ser puestos en presencia de un crudo enzimático evidencian en primer lugar un "arrugamiento" del hemisferio animal, observándose luego paulatinos desprendimientos de trozos de CV, llegando hasta la desaparición de la misma. En la membrana plasmática subyacente se observa una disminución en el número y tamaño de las microvellosidades. En el correspondiente hemisferio vegetativo no se observan estas modificaciones. El pasaje de los espermatozoides a través de la CV está mediado por la actividad de estas enzimas y por la presencia de algunos restos glicosídicos en la CV: la incubación de ovocitos con lectinas (concanavalina A, fitohemoaglutinina, de germen de trigo, etc.), determina la no fecundación de los mismos. Por otra parte, la incubación de los espermatozoides con las glicoproteínas que difunden de las CV aisladas, inhiben la capacidad fecundante de los mismos. En este último caso es la fracción glicídica la responsable de la actividad biológica. La activación de los ovocitos impide la poliespermia mediante un mecanismo que implica, en parte, la modificación de la sensibilidad de la CV a las enzimas acrosomales. Ello es debido a la interacción de la CV con el producto que eliminan los gránulos corticales de los ovocitos durante la activación.

SIMPOSIO METABOLISMO CELULAR DE ACIDOS GRASOS Y COLESTEROL

Coordinador: *Federico Leighton*

IDENTIFICACION DE ACETATO LIBRE COMO EL PRODUCTO DEL ACETIL-CoA GENERADO POR LA β -OXIDACION PEROXISOMAL EN HEPATOCITOS. F. Leighton (*) y S. Bergseth (+) (*) Dep. de Biol. Celular, U. Católica de Chile e (+) Instituto de Bioquímica Médica, U. de Oslo.

Se ha propuesto que el acetil CoA generado en peroxisomas sale del organelo como acetil-carnitina para luego entrar a la mitocondria e incorporarse al "pool" de acetato. Este acetato, en condiciones cetogénicas, sería precursor de cuerpos cetónicos. Para evaluar esta proposición, estudiamos la β -oxidación de ácidos grasos y de ácidos dicarboxílicos en hepatocitos de ratas, con o sin proliferación peroxisomal. La oxidación peroxisomal se detectó como producción de H_2O_2 y la oxidación mitocondrial, como producción de cuerpos cetónicos. Encontramos que no se producen cantidades significativas de acetil-carnitina y que ésta tampoco es un precursor cetogénico al agregarla exógenamente. Los ácidos dicarboxílicos son sustratos peroxisomales (J. Biol. Chem. 264:10347, 1989) y no son cetogénicos. La búsqueda de productos alternativos a la acetil-carnitina nos llevó a identificar al acetato libre como el producto principal derivado del acetil-CoA generado en peroxisomas. Para esto realizamos observaciones empleando diferentes sustratos y aislamos productos radiactivos de sustratos marcados. Nuestra conclusión es que bajo condiciones de oxidación de ácidos grasos, la β -oxidación mitocondrial lleva a cetogénesis, y la β -oxidación peroxisomal a acetogénesis. Este hallazgo puede permitirnos detectar y medir la β -oxidación peroxisomal en animal entero. (UNDP CHI/88/017 ; FONDECYT 250/88)

EFFECTO DEL COLESTEROL SOBRE LA COMPOSICION MICROSOMAL HEPATICA Y SUS PROPIEDADES BIOFISICAS Y ENZIMATICAS R.R. Brenner, Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Fac. de Cs. Médicas, 60 y 120, (1900) La Plata, Argentina.

El colesterol es un importante constituyente de las membranas. En los microsomas el contenido de colesterol es modificado por la dieta. Se estudió en cobayos el efecto del colesterol sobre las propiedades físicas de la membrana y el comportamiento cinético de la UDP-glucuronil transferasa *in vivo* o *in vitro*. El colesterol a temperatura ambiente rigidiza los lípidos generales de la membrana microsomal y modifica la cinética de la UDP-glucuronil transferasa. Disminuye los 4 Kms, aumenta la V_{max} y el coeficiente de Hill llevando la reacción de no miceliana a miceliana. Son cambios reversibles, producidos aparentemente por modificación del estado físico de los lípidos del entorno de la enzima. Mientras el colesterol dietario no modifica durante 21 días la composición de los ácidos grasos de los microsomas hepáticos en el cobayo, los altera en la rata aumentando las relaciones 16:1/18:0 y disminuyendo la 20:4/18:2. Dichas alteraciones son consecuencia de los aumentos de la $\Delta 9$ desaturasa y disminución de la $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa. Estos resultados *in vivo* son antagónicos a los obtenidos *in vitro* para las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas y parecen ser debidos a un aumento de la fosfatidilcolina *in vivo*. Habría también un efecto viscosotrópico sobre la $\Delta 9$ desaturasa. La administración de β -sitosterol (60%) y campesterol (40%) a la rata incorpora ambos esteroides en los microsomas pero no aumenta la fosfatidilcolina. Se produce disminución de fluidez y aumento de las tres $\Delta 9$, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, indicando una regulación viscosotrópica.

METABOLISM ANAD METABOLIC EFFECTS OF HYPOLIPEMIC LONG CHAIN ALKYLTHIOACETIC ACIDS (3 THIA FATTY ACIDS). Jon Bremer and Rolf K. Berge, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norway.

Tetradecylthioacetic acid lowers blood cholesterol and blood triacylglycerol when fed to rats (about 50% with a dose of 150 mg x Kg body weight⁻¹ x day⁻¹). A series of fatty acid metabolizing enzymes are induced in the liver, such as acyl-CoA synthetase, peroxisomal β -oxidation, fatty acid ω -hydroxylation, acyl-CoA hydrolase(s), carnitine palmitoyltransferase II. The 3-thia fatty acids are non- β -oxidizable, but they are metabolized by ω -hydroxylation followed by peroxisomal β -oxidation from the ω -end. Thus, they induce their own oxidation. The sulfur atom is oxidized to sulfoxide. The main metabolites found in the urine are carboxypropylsulfoxyacetic acid and the symmetric thiodiglycolic acid sulfoxide. In isolated hepatocytes the long chain 3-thia fatty acid analogues are strong inhibitors of fatty acid synthesis from acetate. Cholesterol synthesis is also inhibited. Stearate desaturation ($\Delta 9$ desaturase) is unaffected and stearate oxidation even is stimulated. The 3-thia fatty acids are incorporated into phospholipids and triacylglycerol to a similar extent as palmitate. The 3-thia fatty acids may be useful tools in studies on the regulation of fatty acid metabolism.

SECRECION BILIAR DE LIPIDOS DESDE EL HEPATOCITO (HEPATIC SECRETION OF BILIARY LIPIDS). M.P. Marzolo, A. Rigotti, L. Amigo y F. Nervi. Departamento de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Chile.

Una cantidad significativa de colesterol biliar es transportado en vesículas bilamellares de fosfolípidos, tanto en bilis sobresaturadas (humanas) como insaturadas (ratas). Los aspectos fundamentales de la secreción biliar de lípidos tienen que ver con los determinantes cuantitativos de la secreción hepatocitaria de colesterol a la bilis y a la biología celular de este proceso.

Existen evidencias que tanto los lípidos de VLDL como los lípidos biliares se originan del retículo endoplásmico. En esta serie de experimentos en el hígado aislado estudiamos la interrelación funcional entre las tres vías de excreción hepatocitaria de colesterol incorporado a: VLDL, vesículas bilamellares y neosíntesis de ácidos biliares. Se estimuló cada una de estas vías con manipulaciones dietéticas: 30% fructosa (aumenta producción de VLDL); 5% colestipol (aumenta la síntesis de ácidos biliares); 1% diosgenina (aumenta la secreción biliar de colesterol).

Estos estudios demuestran una relación recíproca entre la secreción biliar de col y secreción sinusoidal de col en VLDL. La estimulación de la síntesis de sales biliares no modifica la secreción de colesterol hepático a la bilis y el sinusoides. Los resultados son consistentes con la hipótesis de que la compartimentalización metabólica del colesterol hepático es un factor fundamental que determina la cantidad de colesterol incorporado en vesículas fosfolipídicas que será transportado a la bilis.

APOLIPOPROTEIN B. A SECRETED INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN IS INEFFICIENTLY TRANSLOCATED ACROSS THE ENDOPLASMIC RETICULUM. Roger A. Davis, Christine Wu and Kathryn E. Howell, University of Colorado Medical School, Denver, Colorado, USA.

Previously, we found that unlike albumin which is quantitatively secreted, only a fraction of de novo synthesized apo B is secreted, the remainder is retained in the endoplasmic reticulum, where it is degraded. To understand the basis for these observations, we examined the first step in the secretory pathway: translocation. In isolated microsomes secretory proteins, once translocated are resistant to exogenous proteases, whereas non-translocated proteins are exposed on the cytoplasmic surface and are protease sensitive. Translocation of apo B was compared to albumin by determining their relative sensitivity to degradation by trypsin in hepatic microsomes. Rough, smooth and Golgi sub-fractions were incubated with trypsin, the reaction was inhibited and the trypsin was removed. The relative amount of apo B and albumin was estimated by Western blotting using specific antibodies. In the rough microsomal fractions, trypsin reduced the amount of both small and large molecular weight apo B, whereas no detectable degradation of albumin was observed. In contrast, incubating smooth and Golgi fractions with trypsin resulted in little (if any) degradation of either protein. Since the microsomes remained intact and were orientated right side out as demonstrated by the inability of trypsin to both degrade albumin and to affect the latency of the intraluminal enzyme mannose-6-phosphatase, the selective degradation of apo B suggests a pool of it is exposed on the cytoplasmic surface. If this interpretation is correct, the trypsin accessible pool of apo B should be exclusively membrane associated. Rough microsomes were separated into membrane and intracisternal content fractions by ultracentrifugation following incubation with sodium carbonate. Essentially all of the apo B that was degraded was membrane bound. To determine if the trypsin accessible pool of apo B is transient form, pulse/chase experiments were performed. The results show that the % of apo B that was trypsin accessible, increased during the first 20 min of the chase, suggesting that during this time the trypsin accessible pool of apo B is no translocated (it does not become trypsin insensitive). If there is a pool of apo B associated with the cytoplasmic surface of the RER it should provide a antigen for immuno-isolation. Monoclonal antibodies against the N-terminal and C-terminal halves of apo B were bound to magnetic beads, which were incubated with increasing amounts of microsomes. Recovery of glucose-6-phosphatase was used as a measure of the isolation of RER. Monoclonal IgG against both domains of apo B were effective in specific isolation of RER, whereas non-immune IgG against albumin did not. The combined data support the concept that apo B translocation across the endoplasmic reticulum governs the entry of apo B into two functionally different pools: the intraluminal trypsin insensitive pool participates in the VLDL assembly/secretion pathway; the trypsin accessible non-translocated cytoplasmic pool is shunted away from the VLDL assembly/secretion pathway. Regulated translocation of apo B may provide a unique mechanism with which to determine the rate of VLDL assembly/secretion.

SIMPOSIO MECANISMOS DE ACCION DE HORMONAS

Coordinador: *Luis Valladares*

RELACION ENTRE ESTIMULO GONADOTROFICO RESPUESTA ESTEROIDOGENICA Y GRADO DE DIFERENCIACION DE LAS CELULAS DE LEYDIG TESTICULARES. (Relationship between gonadotropic stimulation, steroidogenic response and degree of differentiation of testicular Leydig cells). Chemes H, León M, Calvo J.C, Rey R, Charreu E.H, y Cigorruga S. División de Endocrinología, Hospital de Niños e IBYME, Buenos Aires, Argentina.

A través de varios modelos experimentales se explorarán las evidencias existentes sobre la heterogeneidad de las poblaciones celulares esteroideogénicas testiculares. Los elementos mesenquimáticos precursores de las células de Leydig de humanos y ratas, aún careciendo de la diferenciación citológica de tipo esteroideogénico, responden al estímulo con hCG con secreción de testosterona (T) y diferenciación hacia elementos maduros. Durante la maduración puberal de la rata, la desensibilización del testículo luego de la inyección de altas dosis de LH-hCG es de menor magnitud o más transitoria que la observada en animales adultos. Estos cambios en la respuesta bioquímica del testículo en maduración ante el estímulo gonadotrófico correlacionan con la cambiante relación cuantitativa de las poblaciones de células de Leydig diferenciadas y sus precursores y resultan del balance entre el incremento de receptores y enzimas esteroideogénicas en los precursores mesenquimáticos y la caída de receptores y presencia de lesiones enzimáticas en las células de Leydig maduras. En ratas adultas, la administración de dosis repetidas de hCG resulta en un estado de resensibilización con recuperación de la capacidad de responder a la reestimulación "in vitro" con hCG. Esta resensibilización es debida al efecto trófico-diferenciador de la hCG sobre los precursores mesenquimáticos. La capacidad esteroideogénica y de respuesta al hCG de los precursores mesenquimáticos testiculares es muy evidente en cultivos de fibroblastos testiculares de niños prepuperales que demuestran altos niveles de producción de testosterona y efecto citológico diferenciador de la hCG.

MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS: PERSPECTIVA FISIOLÓGICA. (Physiologic perspective of the mode of action of hormones). Croxatto H.B., Forcelledo M.L. y Morán F. Unidad de Reproducción y Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile.

Un problema común al fisiólogo y al farmacólogo es descubrir los sitios de acción e interacciones endocrinas involucradas en el efecto que produce una hormona exógena. Esta tarea difiere a la del biólogo celular ocupado de la interacción hormona-célula, no obstante ambas contribuyen a entender el mecanismo de acción de las hormonas.

Se analiza, como ejemplo del enfoque fisiológico, los mecanismos por los cuales la administración de estradiol (E) por vía subcutánea (sc), o por infusión endovenosa (iv) en 200 min, pero no en 10 min, produce aceleración del transporte de embriones por el oviducto de la rata (TEO). El examen de concentraciones tisulares de E mostró que la falta de respuesta a E dado por iv en 10 min. no se explica por menor biodisponibilidad de la hormona.

Al comparar efectos de retroalimentación de E sc e iv sobre el eje gonadal, se descubrió que el estrés asociado al procedimiento de iv produce un aumento de progesterona (P) circulante de origen adrenal, mediado por la hipófisis, que no depende de la administración de E. El aumento de P y E en la circulación tienen el mismo curso temporal cuando E se da por iv en 10 min. E iv en 200 min o E sc prolongan el aumento de E circulante varias horas más que el de P y ambos aceleran el TEO. Cuando se previene el aumento de P por hipofisectomía o se antagoniza con la antiprogesterina RU486, E iv en 10 min acelera el TEO. Se concluye que el efecto de E exógeno sobre el TEO está modulado, en situaciones asociadas a estrés, por cambios concomitantes en la concentración plasmática de P.

ESTUDIO SOBRE RECEPTORES ADRENERGICOS EN EL OVARIO. (Ovarian adrenergic receptors studies). Aguado L, Carrizo D, Blazquez M, Rastrilla A.M. y Telleria C. Laboratorio de Biología de la Reproducción. Univ.Nac.de San Luis - San Luis - Argentina.

La función que cumplen las vías nerviosas que llegan al ovario, ha sido un problema que los investigadores han tratado de resolver desde hace muchos años. En nuestro grupo de trabajo encaramos el estudio del efecto adrenérgico. Para ello se caracterizaron los receptores adrenérgicos en el ovario de ratas prepuberales, utilizándose como sustrato cianopindolol 1-125, encontrándose se muy baja densidad de receptores en anestro y la Kd calculada por saturación o por método cinético fué de 0.044 nM. El estudio con agonistas y antagonistas mostró que los receptores son prácticamente B₂ puros. Un aspecto importante fué el hallazgo de que el número de sitios receptores se modifica a lo largo del primer ciclo astral. Los valores varían entre 10 y 40 fmoles/mg de proteínas. La estimulación adrenérgica en incubaciones de ovarios enteros, con zinterol, un agonista B₂ — mostró relación entre el número de sitios receptores y el efecto biológico expresado en producción de progesterona, androstenediona y testosterona, no así en estradiol. La sección de NOS mostró el desarrollo de hipersensibilización, con un aumento del número de sitios receptores en membrana de ovario. Este fenómeno pudo ser simulado "in vitro" con células granulosas en cultivo donde se mostró el efecto de la regulación negativa de la epinefrina y norepinefrina. Hubo una magnificación del efecto de la gonadotropina en la estimulación de la producción de progesterona cuando se co-incubaban con catecolaminas. El efecto adrenérgico además, muestra ser dependiente de la presencia en el medio de FSH. Hubo cierto grado de regulación heteróloga de los sitios adrenérgicos por LH, FSH y Prolactina que fue muy notable para corticosterona (B) los efectos de FSH y B parecen ser post-AMP cíclico.

THE GONADOTROPIN-SENSITIVE ADENYLYL CYCLASE SYSTEM: A NEW APPROACH IN UNDERSTANDING REGULATION OF CORPUS LUTEUM DURING THE MENSTRUAL CYCLE AND PREGNANCY IN THE HUMAN AND NONHUMAN PRIMATE. Rojas, F.J. Department of Obstetrics and Gynecology, University of California Irvine, Orange, CA 92668, USA.

The major luteotropic factors in primates that promote the growth of the corpus luteum (CL) and stimulate the secretion of progesterone during the menstrual cycle and early pregnancy are LH and hCG, respectively. There are, however, few studies on the mechanisms of gonadotropin action in this specie. In order to understand the molecular events that control luteal function in primates, we have investigated the presence of LH/hCG-stimulable adenylyl cyclase (AC) in membrane preparations of human CL. We first established the experimental conditions to measure optimal expression of LH/hCG-induced AC and defined its properties and regulation by several hormones and nonhormonal activators. Our data revealed that the human luteal AC is linked to a guanine nucleotide regulatory component and that its activation is dependent on Mg ion. Having demonstrated the existence of functional components of the AC system in the primate CL, we then investigated basal activity, nonhormonal stimulation and responsiveness of AC to LH/hCG in luteal membranes from humans and cynomolgus monkeys at various stages of the menstrual cycle and pregnancy. In the menstrual cycle luteal AC responsiveness to LH/hCG was detectable during the midluteal phase, but not during the late luteal phase or in the follicular phase of the following cycle. Also, nonhormonal stimulation was high in CL obtained during the midluteal and late luteal phases, but declined drastically by the follicular phase of the next cycle. In early pregnancy the enzyme was unresponsive to LH/hCG stimulation, yet its sensitivity to nonhormonal stimulation was similar, if not identical, to that of midluteal phase CL. Functional activity was also evident at the end of pregnancy. These results demonstrate that expression of AC activity in human luteal membrane changes significantly with varying hormonal status under physiological conditions. Because the gonadotropin-sensitive AC system represents the capacity of the LH/hCG receptors to couple and elicit a response, these data provide new insights into the regulation of corpus luteum life span and function in primates.

SIMPOSIO INMUNOLOGIA DE LA REPRODUCCION

Coordinador: *Alfredo de Ioannes*

SIMPOSIO: INMUNOLOGIA DE LA REPRODUCCION (Reproductive Immunology). Participantes: Ahuja K., Blaquier J., De Ioannes A.E., Goldberg E., Salling P.M.

Coordinador: *De Ioannes A.E.* Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La fecundación interna y la placentación son adaptaciones que han sido determinantes en las estrategias reproductivas de los vertebrados superiores. Desde el punto de vista inmunológico, la inseminación representa la introducción de material potencialmente inmunogénico del macho en la hembra y el desarrollo intrauterino puede ser considerado como un alotransplante. Los espermatozoides por su parte son también potencialmente inmunogénicos en los machos porque la espermatogénesis comienza en la pubertad, cuando la tolerancia inmunológica se ha establecido. A pesar de estas consideraciones, la infertilidad inmunológica es una patología poco frecuente en machos y hembras, esto sugiere que en los animales superiores se han desarrollado mecanismos que compatibilizan la coexistencia de un sistema inmune altamente sofisticado con esta modalidad reproductiva. La inmunología de la reproducción tiene como propósito el estudio de los mecanismos que controlan la respuesta inmune contra los gametos, tejido fetal y las causas de la infertilidad de origen inmunológico.

En este simposium se discutirán las propiedades funcionales y estructurales de antígenos espermáticos involucrados en la fertilización. Esta información es fundamental para el estudio y tratamiento de la infertilidad de origen inmunológico y además, posibilita el desarrollo de métodos alternativos para la regulación de la fertilidad.

EL PAPEL DE ACROSINA Y ANTICUERPOS ANTI-ACROSINA EN LA INTERACCION DE GAMETOS (Role of acrosin and antibodies to acrosin in gamete interactions) *De Ioannes A.E., Becker, M.L., Barros, C.* Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Acrosina es una serina proteasa localizada en el acrosoma de los espermatozoides de mamífero, que por su liberación durante la reacción acrosómica, actividad enzimática y sitio de unión a fucosa, podría tener un papel importante en la interacción de los espermatozoides con la zona pelúcida. La adición de anticuerpos contra acrosina o inhibidores específicos de serinas proteasas o inhibidores de fertilización in vitro inhibe la fecundación, sin embargo, la inmunización activa de animales de experimentación no disminuye la fertilidad.

Para investigar el mecanismo de acción de la acrosina a nivel de la unión de espermatozoides homólogos a la zona pelúcida de hamster y humana, se ha estudiado mediante microscopía de luz y electrónica de barrido el efecto de anticuerpos monoclonales (AMC) contra acrosina y el inhibidor de tripsina del poroto de soja (SBTI) en la interacción in vitro de espermatozoides sobre la superficie de la zona.

Nuestros resultados muestran tanto en hamster como en humanos que la co-incubación de los gametos en presencia del AMC ACRO-CZE5 y de SBTI, aunque impide la penetración de los espermatozoides, algunos de ellos alcanzan a interactuar con la zona dejando huellas con restos de membranas acrosomales en la superficie. Estas huellas se podrían explicar por la liberación masiva de la enzima durante la reacción acrosómica la cual no alcanza a ser neutralizada por los inhibidores y produce una proteólisis local de la zona.

El conjunto de estas observaciones permiten proponer que acrosina además de su papel clave en penetración al hidrolizar ZP1 y ZP2, expondría azúcares presentes en ZP2 para interactuar con el sitio de unión a fucosa de proacrosina.

PONDECYT 495-89/577-89 y CONRAD CSA-89040.

PARTICIPATION OF HUMAN EPIDIDYMIS SPERM COATING ANTIGENS IN FERTILIZATION. (Participación de antígenos epididimales de la cubierta del espermatozoide humano en fertilización). Sanjurjo¹, C., Davidovsky², A., Cameo¹, M.S., Gonzalez¹, F., Blaquier², J.
¹Fertilab, Paraguay 2302, 1121 Buenos Aires, Argentina, and ²Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, Buenos Aires, Argentina.

A polyclonal antiserum directed against human sperm coating proteins of epididymal origin (Anti-KCl) was tested for its ability to alter sperm function.

Spermatozoa from normal ejaculates were selected by swim up and capacitated by overnight incubation at room temperature. Exposure of these cells to Anti-KCl (1:6 dilution) prior to use in hamster ova penetration test reduced by 64% the penetration of denuded oocytes. Inhibitions of lesser magnitude were observed at higher serum dilutions. This effect was exerted without noticeable changes in sperm motility and in the absence of major agglutination. Anti-KCl did not inhibit the occurrence of spontaneous and induced (by human follicular fluid) acrosome reaction in capacitated spermatozoa. In contrast, exposure to Anti-KCl reduced the ability of spermatozoa to bind tightly to the hamster oolemma. All these effects were not elicited by a similar preparation obtained from pre-immune rabbit sera. Exposure of zona-free oocytes to antiserum did not change their penetrability by normal sperm. These results suggest that the antigens recognized by Anti-KCl participate in the process of fertilization.

THE M42 ANTIGEN (p200/220) OF MOUSE SPERM: BIOCHEMICAL, PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION (Antígeno M42 (p200/220) del espermatozoide de ratón: Caracterización bioquímica, fisiológica e inmunológica). Saling, P.M.², Carron, C.P.¹, Lakoski, K.A.², and Leyton, L.¹, Depts. of ¹Ob/Gyn, ²Cell Biology and ³Zoology, Duke University, Durham, North Carolina, USA.

To study fertilization, we have generated anti-sperm monoclonal antibodies (mAbs). One of these, M42 mAb is restricted to the plasma membrane over the acrosome in mature sperm. M42 mAb blocks mouse fertilization, both in vitro and in vivo by blocking an initial event of the acrosome reaction. M42 mAb recognizes a doublet of 200/220 kD (p200/220) in cauda epididymal sperm. Caput sperm display M42 Ag with Mr 220/240 kD, suggesting that M42 Ag is modified post-translationally during epididymal transit. Other results suggest that this change may be related to acquisition for fertilizing function. Enrichment of p200/220 (≈21,000-fold) has been achieved using HPLC gel filtration and ion exchange, coupled with affinity chromatography, and indicates that p200/220 is an acidic glycoprotein with differentially charged subunits. 'Native' p200/220 probably exists as a 600-700 kD oligomer. Active immunization of mice with p200/220, aimed at infertility induction, has been a long-term goal. Use of sperm-derived p200/220 appears unrealistic and we have investigated the use of anti-idiotypic Abs (anti-ids) directed against p200/220 to mimic native antigen. Monoclonal anti-id M42 Abs, termed anti-id 6E8 and anti-id 7D2, appear to recognize overlapping, but not identical, epitopes of M42 mAb. The anti-ids completely inhibit M42 mAb binding to sperm, and soluble p200/220 inhibits anti-id binding to M42 mAb. Immunization of mice with anti-ids induced idiotype-reactive anti-(anti-id) Abs, i.e., Abs with specific p200/220-binding activity.

Two major results have emerged to date: a) sperm antigens with contraceptive potential can be identified through the careful use of mAbs, and b) use of anti-ids can replace purified native antigen for contraceptive purposes.

Supported by the NIH and the A.W. Mellon Foundation.

AN ANALYSIS OF THE OOCYTE SURFACE AFTER CORTICAL GRANULES RELEASE. (Un análisis de la superficie del ovocito después de la liberación de los granulos corticales). Ahuja, K.K., Lee, S.H., Whittingham, D.G. MRC Experimental Embryology and Teratology Unit, St. George's Hospital Medical School, Cranmer Terrace, London SW17 0RE, U.K.

The release of cortical granules (CG) and the completion of meiosis are two of the earliest responses observed during the process of mammalian oocyte activation induced by either the entry of a fertilizing spermatozoon or by artificial activating agents. The newly released CG contents modify the properties of the oocyte plasma membrane and the overlying zona pellucida to prevent the entry of further spermatozoa into the oocyte, the so-called "block to polyspermy".

An immunocytochemical method has been established to study the kinetics of the release of CG glycoconjugates and their fate during the early stages of development in the mouse. We extended those studies involving UEA-I to rat, golden hamster and human oocytes. FITC-UEA-I binding to the plasma membranes of rat, hamster and human oocytes showed a punctuate distribution over the entire surface except the microvilli-free area overlying the meiotic spindle which is known to lack CG. The CG-free area of the rat oocytes was identical to the mouse but it was smaller in the hamster and rather insignificant in the human fertilized oocytes.

It is tempting to suggest that the fucosyl glycoconjugates may be universally present in the CG of mammalian oocytes and a simple staining method involving FITC-UEA I should provide a powerful tool for the study of fertilization-associated changes in mammalian oocytes.

TESTES-SPECIFIC LACTATE DEHYDROGENASE LDH-C4 AND DEVELOPMENT OF A CONTRACEPTIVE VACCINE. (Deshidrogenasa láctica específica de testículo LDH-C4 y el desarrollo de una vacuna anticonceptiva). Goldberg, E. Department of Biochemistry, Molecular Biology and Cell Biology, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA.

LDH-C4 has been used as a model sperm antigen for immunocontraception. This protein is immunogenic in males and females, and the antibodies which are produced are absolutely tissue-specific. Because the molecular structure of LDH-C4 is known we have been able to map antigenic determinants and to design synthetic peptides that provoke antibodies that recognise the native protein. In a fertility trial, pregnancy was significantly reduced in female baboons immunized with a synthetic peptide sequence of 12 amino acids representing the amino terminus of LDH-C4. Recombinant DNA and genetic engineering technology have been employed to express human LDH-C4 in *E. coli*, and to obtain recombinant vaccinia virus containing the LDH-C4 gene coding region. These results will be discussed in terms of immuno-contraception.

This research is supported by grants from the National Institutes of Child Health and Human Development, USPHS.

SIMPOSIO PROLIFERACION CELULAR Y ONCOGENES

Coordinadores: *Myriam Santos¹, Remigio López*

PROLIFERACION CELULAR Y ONCOGENES (Cell proliferation and oncogenes) López Solís, R.O., y Santos, M. Dpto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los mecanismos participantes en la regulación de la proliferación celular son escasamente conocidos. En general, se concibe que señales extracelulares son responsables de la transición reposo proliferativo-proliferación y viceversa. La caracterización de tales señales, los procesos que ocurren en las células blanco y la relación de éstos con la modulación de la respuesta proliferativa, son motivos de interés en la actualidad.

En el presente simposio se discutirá, a base de la información derivada de distintos sistemas experimentales *in vitro* e *in vivo*: 1.- la posible relación entre la inducción de proliferación celular y crecimiento celular, 2.- la complejidad de la activación génica que ocurre inmediatamente después de la recepción de la señal inductora de proliferación, 3.- la relación aparentemente excluyente entre proliferación celular y diferenciación celular, 4.- la relación entre la expresión de oncogenes nucleares y la transformación celular y 5.- la interacción entre oncoproteínas virales y oncoproteínas celulares en relación a la proliferación de células transformadas por virus. En síntesis, se analizarán mecanismos que pudieran participar en el control normal de la proliferación celular y las posibilidades que una alteración de los mismos pudiera resultar en el proceso neoplásico.

CRECIMIENTO CELULAR Y PROLIFERACION CELULAR (Cell growth and cell proliferation). López Solís, R.O., Díaz, M., Aliende, C., González, M.J., Peña y Lillo, S., Viaz, M. y Castillo, L. Dpto. Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Usualmente, una célula que se va a dividir debe crecer. Así, junto con los procesos propios de la proliferación celular (síntesis de DNA y mitosis) existen procesos que pudieran ser propios del crecimiento celular.

Un sistema que ha servido de modelo en estudios de proliferación celular consiste en la estimulación de las células acinares de las glándulas parótidas por isoproterenol (IPR), un agonista β -adrenérgico.

Se ha demostrado que al inducir proliferación celular, isoproterenol induce la aparición de novo de una familia de polipéptidos de naturaleza secretoria (polipéptidos C, D, E, F y G). A fin de evaluar una eventual relación entre los polipéptidos C, D, E, F y G y las vías de síntesis de DNA-mitosis o del crecimiento celular, se buscó separar ambas respuestas. La administración crónica diaria de IPR permitió inducir diferencialmente proliferación y crecimiento celular (primeros 4-5 días) o sólo crecimiento celular (5-12 días de tratamiento). Bajo estas condiciones se logró establecer que la acumulación de los polipéptidos C, D, E, F y G corresponde más bien a la respuesta de crecimiento celular. Utilizando tales polipéptidos como marcadores moleculares del crecimiento de las células acinares y recurriendo al uso de inhibidores metabólicos (actinomycin D) y de agonistas (dobutamina, salbutamol) y antagonistas (atenolol, ICI 118551) β -adrenérgicos se logró establecer que la inducción del crecimiento requiere 1) la mediación de receptores β -adrenérgicos de la membrana plasmática, 2) una interacción prolongada (2-3 horas) entre IPR y receptores β -adrenérgicos y 3) actividad transcripcional. Estas características parecen ser análogas a aquellas de las que depende la inducción de síntesis de DNA-mitosis en este sistema. Considerando la naturaleza secretoria de los polipéptidos C, D, E, F y G se ha logrado asimismo establecer que en células que han aumentado de tamaño y que no responden experimentando síntesis de DNA-mitosis, la resíntesis post-secreción de los polipéptidos es independiente de los receptores β -adrenérgicos y de la actividad transcripcional pero relacionada a la actividad secretoria. De este modo, el crecimiento celular en ausencia de proliferación celular parece corresponder a una respuesta de adaptación a la hiperactividad secretoria.

IDENTIFICACION DE GENES INDUCIBLES POR FACTORES DE CRECIMIENTO (Identification of growth factor inducible genes) Bravo, R. Kovary, K., Macdonald-Bravo, H. y Rysack, R.-P. Department of Molecular Biology, The Squibb Institute for Medical Research, P.O.Box 4000, Princeton, NJ 08543

El panorama que emerge del estudio de la respuesta génica temprana de fibroblastos a los factores de crecimiento es de una complejidad considerable. Al menos 80 cDNAs correspondientes a genes tempranos inmediatos han sido aislados. Varios de estos genes codifican factores de transcripción conocidos o presuntos, tales como c-fos, fra-1, fos B, Krox-20, Krox-24, c-jun y jun B.

Recientemente hemos identificado otro gen temprano inmediato (N10), el cual presenta una similitud significativa con la superfamilia de receptores nucleares que unen ligandos, entre las que se encuentran la familia de receptores de hormonas esteroidales y la familia de receptores tiroideos. La mayor similitud se restringe a una región de aproximadamente 70 aminoácidos, la que se corresponde con el dominio de unión a DNA de los receptores. Esta región contiene dos sectores tipo dedos de zinc. La proteína N10 está localizada en el núcleo y tiene una vida media aproximada de 30 minutos en fibroblastos estimulados.

El gen está compuesto por 7 exones distribuidos en un segmento de 6.5 kb. Los sectores tipo dedos de zinc están en exones separados, al igual que en otros miembros de la superfamilia. Sin embargo, en N10 la ubicación del intrón que separa los exones correspondientes a los sectores tipo dedos de zinc es diferente a la descrita para todos los demás miembros de la superfamilia. Esto sugiere que N10 representa una nueva familia de receptores que unen ligandos nucleares.

MOLECULAR APPROACHES TO THE RELATIONSHIP BETWEEN PROLIFERATION AND INITIATION OF OSTEOBLAST PHENOTYPE DEVELOPMENT. Gary S. Stein and Jane B. Lian. Dept. of Cell Biol., Univ. of Mass. Med. Ctr. Worcester, MA 01655.

The relationship of proliferation to the known developmental sequence associated with bone cell differentiation was examined in primary fetal rat calvarial derived osteoblasts (OB) using autoradiography, histochemistry, biochemistry and mRNA assays of OB cell growth and matrix genes. Initially, actively proliferating cells produce a fibronectin/Type I collagen extracellular matrix (ECM). A reciprocal relationship between the decline in proliferative activity and the induction of genes associated with matrix saturation and mineralization is supported by (1) a temporal sequence of events in which there is initially an enhanced expression of alkaline phosphatase (AP) immediately following the proliferative period with subsequent increased expression of osteocalcin (OC) and osteopontin (OP) at onset of mineralization; (2) increased expression of AP and OP when DNA synthesis is inhibited by hydroxyurea; (3) enhanced levels of the osteoblast markers (AP, OP, OC) as a function of ascorbic acid induced collagen deposition, suggesting that the ECM contributes to both the shutdown of proliferation and expression of the OB phenotype. By determining cellular mRNA levels and rates of mRNA synthesis in isolated nuclei, the down-regulation of cell growth related genes was found to be modified by transcription and mRNA stability. The down-regulation of a histone gene is associated with onset of OB differentiation and is transcriptionally mediated by selective loss of the interaction of a promoter binding factor (MinF-D) with a proximal regulatory element (Site II). This is supported by the persistence of Site II-MinF-D interactions when proliferating rat OB's are growth arrested under conditions that do not induce differentiation (i.e., induction OB markers), indicating that loss of this transcription factor is a marker of differentiation. In summary, appearance of markers of the OB phenotype appear to be induced by the down-regulation of proliferation. This is dependent upon extracellular matrix formation which supports the OB developmental sequence to a restriction point where mineralization and expression of other OB genes (e.g., OC) is required for completion of OB differentiation.

NUCLEAR PROTO-ONCOGENES *MYC*, *FOS* AND *JUN* : POSSIBLE ROLE IN MALIGNANT TRANSFORMATION CAUSED BY POLYOMA AND SIMIAN SARCOMA VIRUS (SSV).

Mari C.S. Armelin, Lucia E. Rameh and Martha H. Sonobe
Universidade de Sao Paulo, Instituto de Química, C.P. 20.780 - Sao Paulo, Brasil.

The SVV v-sis oncogenic sequence codes for a 28 KDa protein (p28^{v-sis}) that is homologous to PDGF (platelet-derived growth factor). An autocrine mechanism has been invoked as the basis for SSV-transformation. PDGF controls cell proliferation via the induction of a few cellular genes among which the nuclear proto-oncogenes *myc*, *fos* and *jun*. No cellular homologs to Polyoma T antigens oncogenic sequences have been found. However, both Polyoma and SSV transformation render Balb-3T3 cells PDGF-independent. We have been studying the role played by nuclear oncogenes' expression in viral transformation using DNA-mediated transfection of cloned v-sis and Polyoma large and middle T antigen cDNAs. Stable integration of viral sequences and expression in transfectant cell lines are confirmed by, respectively, Southern and Northern hybridization. Expression of PDGF-inducible *myc*, *fos* and *jun* proto-oncogenes is examined by S1 nuclease protection, Northern and Western blotting.

Supported by : FINEP, FAPESP, CNPq, CAPES.

DINAMICA DE LA INTERACCION ENTRE LA ONCOPROTEINA CELULAR p53 Y LA ONCOPROTEINA DEL VIRUS SV40. (DYNAMICS OF THE INTERACTION BETWEEN THE CELLULAR ONCOPROTEIN p53 AND THE SV40 VIRAL ONCOPROTEIN).

Santos, M., Corvalán, A., Ordoñez, G.E. y Arenas, C.P.
Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El proto-oncogen celular p53 codifica para una proteína (p53) que parece regular la transición G0/S. Células normales quiescentes no expresan dicha proteína, pero su entrada en el ciclo proliferativo se acompaña de una aumento paulatino en el contenido celular de la p53, que decae nuevamente al término de la mitosis. Por el contrario, una variedad de células transformadas e incluso células de tumores humanos presentan niveles permanentemente elevados de la p53. Este hecho, que podría ser un factor determinante de la mantención de estas células en continua proliferación, parece resultar de la interacción física de la p53 con proteínas particulares. En las células transformadas por SV40, la p53 se asocia con la oncoproteína viral, el antígeno tumoral mayor (ag-T). Si ambas oncoproteínas, en sus formas libres o asociadas, participan en el control de la proliferación de estas células, sería esperable que las interacciones entre sí o con estructuras celulares particulares sean dinámicas. Estudios inmunocitoquímicos y radioinmunoquímicos han mostrado que sólo las células en proliferación expresan p53 y ag-T en su superficie, mientras que la distribución intranuclear de ambas, su asociación con estructuras subnucleares particulares, su estabilidad, su velocidad de maduración y aparentemente su cinética de asociación-disociación, varían en función de la proliferación celular. Los resultados sugieren que el dinamismo postulado existe y que podría deberse a cambios estructurales del ag-T y/o de la p53 en relación con la actividad proliferativa. Proyectos : 447/87 Fondecyt; 82366 UCh; 59CHL24 TWAS.

SIMPOSIO CITOESQUELETO

Coordinador: *Octavio Monasterio*

CYTOSKELETON SYMPOSIUM PRESENTATION. (Presentación del Simposio "Citoesqueleto"). Monasterio, O. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

This symposium is mostly directed toward the analysis of microtubules, one of three principal filamentous elements of the cytoskeleton. They are mainly formed through the self-association of tubulin. Work during the past 15 to 20 years has demonstrated that microtubules are dynamic structures which are regulated predominantly by the levels of calcium and GTP and by the interaction with 'microtubule-associated proteins' and other proteins. The effect of colchicine and other natural drugs on the assembly of microtubules has been extensively studied *in vitro* and *in vivo*. In this respect, the synthesis of new drugs which bind reversibly to tubulin and depolymerize microtubules constitutes a novel approach. This has allowed the study of the function of microtubules *in situ*. The use of antibodies to specific regions of the tubulin subunits has suggested the regions of the dimers involved in protofilament formation. Genetic analysis and cloning of tubulin and intermediate filament proteins have been successfully used to understand the relationship between function and structure of these proteins and to understand how they are regulated at the translational and post-translational levels. New findings related to the mechanism involved in the assembly of microtubules and other components of the cytoskeleton will be thoroughly reviewed.

The knowledge of the relationships between the structure of the cytoskeleton proteins and the mechanisms that regulate their function in the cell will be hopefully understood at a molecular level in a near future.

INTERACCIONES MACROMOLECULARES QUE REGULAN EL ENSAMBLAJE DE LOS MICROTUBULOS. Maccioni, R.B. Int. Center for Cancer and Developmental Biology, Santiago, Chile and Univ. Colorado Health Sciences Center, Denver CO, U.S.A.

Hemos estudiado la subestructura del dominio C-terminal de α y β -tubulina y su relación con la interacción de proteínas asociadas (MAPs) y el control de la polimerización de los microtúbulos. Se utilizaron tres enfoques: proteólisis enzimática controlada, uso de péptidos sintéticos y anticuerpos antipéptidos y anti-idiotípicos. Los estudios de proteólisis demostraron que un dominio de 4kDa de la región C-terminal de α y β -tubulina es crítico para la regulación de la polimerización. Los estudios de unión revelaron que los péptidos α (K430-G441) y β (Y422-E434) interactúan selectivamente con las distintas MAPs. Los estudios inmunológicos utilizando los anticuerpos antipéptidos (Ab-1) confirmaron la participación de los subdominios de α y β -tubulina definidos por estos péptidos en la unión de las MAPs y que el bloqueo específico de esta interacción impide la polimerización. Nuestras conclusiones están apoyadas por el descubrimiento de anticuerpos anti-idiotípicos (Ab-2) en el suero de conejos inmunizados con los péptidos descritos, los cuales reaccionan específicamente con las MAPs. Estos anticuerpos nos han entregado valiosa información acerca de los dominios de las MAPs involucrados en sus interacciones con los microtúbulos. Péptidos sintéticos de las secuencias repetitivas de tau, V187-G204 y V218-G235, contienen los determinantes antígenicos reconocidos por los anticuerpos Ab-2. Los estudios indican que tau y MAP-2 comparten dominios estructuralmente similares para la interacción de la tubulina. (Financiado por Council for Tobacco Research, USA, American Heart Assoc. y Alzheimer Disease & Related Disorders Assoc.)

ESTRUCTURA Y ENSAMBLAJE DE TUBULINA EXAMINADOS CON ANTICUERPOS DE ESPECIFICIDAD PREDETERMINADA (Tubulin structure and assembly probed with antibodies to synthetic peptides). Andreu, J.M.¹, Arevalo, M.A.¹, Nieto, J.M.¹ y Andreu, B.². ¹Centro de investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid y ²Depto. Química Orgánica, Universidad de Barcelona, España.

Se sintetizaron péptidos correspondientes a las posiciones conservadas e hidrofílicas de las secuencias de tubulina α (155-168), β (153-165), α (214-226), β (241-256), α (430-443), α (425-443) y β (412-431). Contra estos péptidos se produjeron anticuerpos que reaccionan específicamente con las secuencias homólogas de la proteína, que están expuestas en la superficie del heterodímero $\alpha\beta$ tubulina. Mediante proteólisis limitada e inmunoblot con los anticuerpos monoespecíficos se determinó que cada monómero de tubulina consta de tres tipos mayoritarios de fragmentos compactos y tres bucles de proteólisis preferencial (Biochemistry 27, 5352-5365, 1988). Los anticuerpos contra las zonas próximas al extremo C-terminal [α (430-443), α (415-443) y α (412-431)] perturbaban subestquíometricamente el ensamblaje de tubulina purificada, induciendo la formación de microtúbulos, microtúbulos abiertos y hojas.

En microtúbulos nativos de células PtK2 y en microtúbulos de tubulina purificada inducidos in vitro por taxol las zonas β (153-165), α (430-443) y β (412-431) permanecen expuestas, mientras que α (155-168), α (214-226) y β (241-256) son ocultas por el ensamblaje de tubulina. Las posiciones α (214-226) y β (241-256) están probablemente implicadas en las interacciones axiales entre heterodímeros de tubulina para formar los protofilamentos, mientras que α (241-256) y β (214-226) deben ser cercanas a la interfase de unión entre los monómeros α y β en el heterodímero de tubulina.

DYNAMIC ASPECTS OF MICROTUBULE ASSEMBLY. Timasheff, S. N., Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, MA 02254, U.S.A.

In a large excess of GTP the assembly of microtubules can be described thermodynamically as a pseudo-equilibrium in terms of the Oozawa theory of nucleated polymerization. The hydrolysis of the E-site GTP subsequent to assembly, the constant diffusional exchange of tubulin monomers at the two ends of steady state microtubules and the differences in assembly-disassembly kinetics at the two ends render microtubules into a dynamic system. Well known consequences are the treadmilling phenomenon in in vitro assembled microtubules and the dynamic instability observed in cellular systems. The GTP GDP hydrolysis leads to a heterogeneous structure of microtubules, with a small GTP-tubulin cap at each end and GDP-tubulin making up the bulk of the assembled structure. Since GDP-tubulin is unable to assemble into microtubules but favors the formation of double rings, the core of the organelles is unstable and the stabilization is imparted by the caps at the two ends. The favored assembly geometry in the two states (microtubules with GTP-tubulin, double rings with GDP tubulin) has led to the conclusion that tubulin exists in two principal conformational states, "straight" and "curved", their equilibrium being allosterically controlled by the state of phosphorylation of the nucleotide (Melki, Carlier, Pantaloni and Timasheff, Biochemistry, 1989, in press). The recent important discovery by Carlier et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987, 84, 5257) of synchronous oscillations in microtubule assembly from pure tubulin can be understood in terms of the dynamics and relative kinetics of GTP-GDP exchange on tubulin, double ring assembly and disassembly and diffusional exchange of tubulin molecules at microtubule ends. (Supported by NIH grants CA-16707 and GM-14603).

THE DEFINITION OF THE ROLE OF MICROTUBULE IN PROTEIN SECRETION BY THE USE OF TMB, A COLCHICINE ANALOGUE WHICH BINDS REVERSIBLY TO TUBULIN. Gorbunoff, M., Herman, G., Busson, S., Mauduit, P. and Rossignol, E. Graduate Department of Biochemistry, Brandeis Univ., Waltham, MA U.S.A.; Labo. de Biochimie des Transports Cellulaire, CNRS, Univ. Paris-Sud, Orsay, France; Centre de Cytologie Experimentale, Ivry, France.

The role of microtubules in the secretion of ³H-labeled proteins in rat lacrimal glands was probed by the use of 2,3,4,4'-tetramethoxy-1-1'-biphenyl (TMB), which is a colchicine analogue that binds reversibly to tubulin. Immunofluorescence studies have shown that TMB at a 100 M level destroys in less than 10 minutes the microtubule network in acinar cells of rat ex-orbital glands. Removal of TMB led to the restoration of the microtubular system in less than 20 minutes, even after a 4 hour treatment with the drug. The protein-secretory process was examined by adding the drug at various stages. The results have shown that: a) the presence of TMB only during the phase of granule migration gives no inhibition of the discharge; b) the presence of TMB during granule maturation, and its subsequent removal for 60 minutes slows down the transport of newly synthesized proteins, but the granules keep their ability to be discharged; c) the presence of TMB during both the phases of granule maturation and migration; then removal from the incubation medium, renders impossible the discharge of the labeled proteins. The conclusions were: a) microtubules are involved during the maturation of the granules, but not their migration; b) inhibition of the discharge is of two types: during short incubations (70 min), it is transient; when the incubations are longer, the secretory granules are destroyed by lysosomes. (Supported by NIH grant CA-16707).

MICROTUBULES AND NEUROFILAMENTS: DETERMINANTS OF AXONAL STRUCTURE AND FUNCTION. D.W. Cleveland*, M.J. Monteiro*, H.C. Joshi*, J. Gearhart* and P.N. Hoffman*, Departments of Biological Chemistry*, Physiology* and Neurology and Ophthalmology*, The Johns Hopkins Univ. School of Medicine, Baltimore, MD 21205 USA.

Neurons are highly asymmetric cells whose cytoarchitecture is established principally by two components: microtubules and neurofilaments. Microtubules are rigid polymers that both support neurite elongation and form the linear tracks for particle transport into the axon. The principal components of microtubules, α and β tubulin, are each encoded by a small multigene family comprised of about 6 functional genes. For β tubulin, five of these (which encode 5 different β tubulin isotypes) are expressed in neurons. These isotypes are not biochemically equivalent since two are preferentially assembled and one is partially excluded from neurites. What role, if any, such isotype distinctions play in microtubule function is still unsettled, but double label immunogold electron microscopy reveals that axonal microtubules are assembled as nearly random copolymers of the axonal isotypes.

Neurofilaments (NF), the intermediate filament proteins of axons, are synthesized and assembled primarily after neurite elongation is completed. In myelinated axons there is a linear correlation between axonal cross sectional area and NF number. Further, following crushing (axotomy) of a peripheral nerve, a reduction in diameter that progresses from the cell body outward is accompanied by a reduction both in NF number and in newly synthesized NF subunits transported into the axon. In view of these findings we have proposed that NF are intrinsic determinants of axonal diameter. To test this proposal, we have used DNA transfection of cloned NF-L, NF-M and NF-H genes to identify domains of the mouse NF subunits necessary for filament formation. Not surprisingly, the 310 amino acid conserved α helical rod domain is essential for assembly. In transgenic mice that express additional wild type or mutant NF-L genes, we find that NF-L can be expressed and assembled at high levels (2% of cell protein) in non-neuronal cells without major effect. However, expression of a 20 fold excess of transgene RNA in neurons does not yield any increase in NF-L protein. This may be due to a translational or post-translational mechanism that restricts NF accumulation in neurons.

SIMPOSIO LA BIOLOGIA CELULAR EN IBEROAMERICA

Coordinadora: *Maria Inés Becker*

SIMPOSIO: LA BIOLOGIA CELULAR EN IBEROAMERICA (Cell Biology in Iberoamérica).
COORDINADOR: Maria Inés Becker. Bios Chile y Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

La Biología Celular es una de las áreas que mayor desarrollo ha tenido en la última década, debido a que es un punto de convergencia de casi todas las disciplinas biológicas.

El objetivo de este simposio es analizar el estado actual de la Biología Celular en Iberoamérica bajo tres aspectos: 1) Productividad científica en el período 1983-1987. Esta información permitirá una evaluación cuantitativa del nivel en que estamos. 2) Situación del post-grado en Argentina, Brasil, Chile, España, México y Venezuela. Esta actividad es fundamental para renovar los recursos humanos que son la base para generar y asimilar nuevos conocimientos. 3) Impacto del conocimiento básico de Biología Celular en el desarrollo de la Biotecnología en Iberoamérica. Este aspecto no podía quedar fuera del simposio porque representa uno de los desafíos más importantes a futuro para solucionar problemas regionales.

De este análisis se puede concluir que aunque en algunos países existen grupos de investigación con prestigio mundial, se han constituido Sociedades Científicas y programas de post-grado, la productividad científica en Iberoamérica es aún incipiente, puesto que aporta aproximadamente el 1% al total de las publicaciones mundiales en el área.

Patrocinio: RELAB y Laboratorio Chile S.A.

ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION CELULAR EN LA ARGENTINA. Burgos, M. IHIM. Univ. Nac. de Cuyo. Mendoza, Argentina.

En la Argentina no existe específicamente un doctorado en Biología Celular sino los clásicos doctorados relacionados a esta disciplina en Ciencias Médicas, Ciencias Agropecuarias, Ciencias Biológicas y Ciencias Químicas. Los licenciados que aspiran al título de doctor deben completar y aprobar una tesis de doctorado bajo la dirección de un director y con un aporte de investigación Científica original. Estos licenciados son apoyados durante este período por becas otorgadas por instituciones oficiales o privadas (Universidad, CONICET y Fundaciones). Tomando como ejemplo al CONICET, de los 2227 becarios que trabajan dentro del país, 287 corresponden a Ciencias Biológicas, 210 a Ciencias Médicas, 163 a Ciencias Agropecuarias y 218 a Ciencias Químicas. A estas hay que adicionar unas 130 becas externas.

Existen aproximadamente 27 centros equipados como para que estos licenciados puedan completar su formación y alcanzar el doctorado. Luego de completar el período de becario pueden ingresar a la carrera de investigador del CONICET o a posiciones de dedicación exclusiva en las Universidades. En la actualidad en las cuatro ramas del conocimiento mencionadas, el número de miembros de la Carrera del Investigador supera el millar. El total de investigadores de la carrera ascendió en los últimos 5 años de 1768 a 2376. Existe también una carrera para el personal técnico de apoyo a la investigación científica. La mayor parte de los fondos son aportados por el CONICET y las universidades, aunque es frecuente que en las becas externas se agreguen recursos provenientes de Fundaciones Extranjeras. Desde 1958 hasta la fecha el CONICET ha mantenido su continuidad como principal apoyo para el desarrollo y promoción de la Investigación Científica en la Argentina.

PRODUCTIVIDAD CIENTIFICA EN BIOLOGIA CELULAR DE LOS PAISES IBEROAMERICANOS: 1983-1987. (Scientific productivity in Cell Biology from Ibero-American countries: 1983-1987).

Becker, M.I. y Barros, C., Bios-Chile IG.SA y Lab. Embriología, Fac. Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Una manera de evaluar el desarrollo de un área del conocimiento científico en un país y su trascendencia en el contexto mundial de la investigación, es determinar el número de publicaciones en revistas internacionales con comité editorial.

Con este propósito, se determinó mediante una encuesta cuáles eran las revistas más importantes en Biología Celular y posteriormente, se hizo un catastro de los trabajos publicados en las revistas seleccionadas, en que al menos uno de los autores fuera de filiación iberoamericana, durante el período 1983-1987.

Se destaca en este estudio que: 1) De un total de 32 revistas seleccionadas, que incluyen *Nature* y *Science*, las de mayor impacto en esta área son: *J. Cell Biol.*; *Cell*; *PNAS*; *Eur. J. Cell Biol.*; *J. Biol. Chem.*; *Exp. Cell Res.* y *EMBO. J.* 2) Resultados preliminares muestran que la productividad iberoamericana es alrededor del 1% del total de publicaciones en las revistas analizadas. 3) Entre los países iberoamericanos, el país con mayor un número de publicaciones es España (48%), le siguen Chile (22%), México (9%), Argentina (7%), Brasil (4%) y Venezuela (4%). El resto de los países tienen una escasa contribución.

La baja productividad requiere un análisis de la comunidad de biólogos celulares iberoamericanos, a fin de tomar acuerdos que permitan impulsar el desarrollo de esta área mediante la destinación de mayores recursos y también mediante el fortalecimiento de los programas de Post-Grado.

A BIOLOGIA CELULAR NO BRASIL (Cell Biology in Brazil). De Souza, W., Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Apenas em poucos cursos a Biologia Celular é ministrada como tal no Brasil. O mais comum é ela estar dispersa entre os cursos de Histologia, Biofísica, Bioquímica, Biologia Molecular e Genética, o que dificulta a análise detalhada da situação da Biologia Celular no Brasil. Em que pese a nossa situação estar longe do ideal observa-se nos últimos anos um aumento no número de grupos atuantes, no número e na qualidade dos trabalhos que vêm sendo realizados. O fato de terem existido alguns Programas Especiais organizados pelas agências de financiamento, fizeram com que certas áreas se destacassem. No que ocorre, por exemplo, na área da Biologia Celular de Parasitos, com ênfase principalmente em *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* e *Schistosoma mansoni*. Tais parasitos têm sido utilizados intensamente como modelos experimentais para estudos morfológicos, bioquímicos e imunológicos. O número de doutores formados tem sido insuficiente para atender as necessidades das instituições universitárias. Esforços estão sendo feitos para aumentar os programas de formação de recursos humanos visando atendimento das necessidades dos polos de biotecnologia em fase de implantação. Todas as atividades nesta área, tem sido apoiadas pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

PROGRAMAS DE POSTGRADO EN CHILE. AREA BIOLOGIA CELULAR. (Postgraduate Programs in Chile. Field of Cell Biology). L. Izquierdo. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los programas chilenos en Biología conducen al Magister o Doctorado en Ciencias Biológicas, en general sin especificación de la disciplina; por lo tanto no es fácil precisar el área de Biología Celular. Las cifras sobre número de graduados indicadas en la columna 1 se refieren al conjunto de Biología Celular, Biología del Desarrollo, Biología Molecular, Bioquímica, Biotecnología y Fisiología; las cifras en columna 2 a Biología Celular exclusivamente.

La primera cifra es probablemente una sobreestimación, la segunda una subestimación y las conclusiones dependen de cuán restrictiva sea la definición de Biología Celular.

Universidad	Iniciación Programa	Graduados hasta 1988	1	2
MAGISTER				
U. de Chile	Fac. Ciencias	1978	30	9
	Fac. Medicina	1983	32	4
	Fac. Q. y Farm	1985	3	-
U. Concepción		1978	14	
U. Austral		1977	15	-
DOCTORADO				
U. de Chile	Fac. Ciencias	1966	42	1
	Fac. Q. y Farm	1985	4	1
P. U. Católica		1972	21	15

Se describe el desarrollo de los programas y se examina el destino de los graduados.

EL DESARROLLO DE LA BIOLOGIA CELULAR EN MEXICO (Development of Cell Biology in Mexico). Peña, A., Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado 70-600. México, D.F. México.

No sólo en el área de la Biología Celular, sino en la ciencia toda, México inició hace aproximadamente treinta años un esfuerzo que no ha sido constante, y que en los últimos años se ha vuelto más pequeño. Para intentar hacer una evaluación del estado de la Biología Celular en México, se tomó como base las cifras del Sistema Nacional de Investigadores, que representan la evaluación más formal de los investigadores mexicanos. Las cifras son difíciles de obtener, debido a que algunas áreas, como la Bioquímica y la Inmunología, representan en realidad una Biología Celular con ciertos enfoques de otro tipo. Prácticamente es más fácil hacer un análisis de este tipo en la Biología Experimental.

Las cifras muestran que para toda la Biología y la Medicina, completas, dan un total de 815 investigadores concentrados, en su gran mayoría en la ciudad de México, con sólo 49 en el nivel más alto. Para la Biología Celular se da una cifra de sólo 24 investigadores, pero muchos de otras áreas hacen en realidad Biología Celular. Tal vez una cifra aproximada sea alrededor de 50 investigadores en el área. En el área propiamente dicha de la Biología Celular hay sólo dos posgrados de buen nivel, que sin embargo, tienen una producción de egresados relativamente baja. En México no hay una Sociedad de Biología Celular, y los investigadores del área se asocian a las de Bioquímica e Inmunología principalmente.

Hay pues un grupo pequeño, pero sólido de Biólogos Celulares, agrupados alrededor de dos posgrados principalmente, que representan ya una base sólida para el desarrollo de esta disciplina.

APLICACIONES DE BIOLOGIA CELULAR EN BIOTECNOLOGIA (Cellular Biology and Biotechnology). Grau, O., Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata.

La Biología Celular conjuntamente con la Bioquímica, la Biología Molecular y la Ingeniería Genética constituyen el basamento del incipiente desarrollo de actividades biotecnológicas. En Latinoamérica ya existen ejemplos el empleo de técnicas modernas en salud humana y animal, en producción agropecuaria y en la industria. En el campo de la salud se utilizan anticuerpos monoclonales y proteínas clonadas para el diagnóstico de enfermedades humanas y animales y para la tipificación antigénica, como así también sondas de DNA y RNA para la detección de bacterias y virus. Se emplea RLFP para detectar diversas patologías genéticas y para el establecimiento de cosanguinidad. Mediante el cultivo de células eucariotas y de microorganismos se preparan vacunas virales y bacterianas. Las nuevas técnicas de fertilización in vitro y de división de embriones se están aplicando para resolver problemas de reproducción en humanos o para mejorar la calidad de animales productores de carnes. En producción agropecuaria se emplean inoculantes para favorecer la fijación de nitrógeno y el abastecimiento de minerales a las plantas. Se producen virus, bacterias e insectos que son empleados para combatir plagas. Se producen millones de plantas por micropropagación y se están iniciando las experiencias de transformación para obtener variedades resistentes a plagas y de mejor valor alimentario. Se emplean también sondas de DNA y RNA y anticuerpos monoclonales para diagnóstico de enfermedades y el RLFP para diferenciar variedades de cultivos. En el ámbito de la producción acuática se reproducen crustáceos en cautiverio para emplear las semillas en cultivos intensivos. En el campo alimentario se emplean enzimas saborizantes y enriquecedores producidos en cultivos o microorganismos modificados que permiten una mejor elaboración, conservación o aumentan la capacidad nutricional. En el campo industrial, en algunos países se han desarrollado programas de producción de combustibles por fermentación. Se está estudiando el mejor empleo de residuos agroindustriales mediante procesos biológicos y se emplean reactores con células o enzimas inmovilizadas para la producción de antibióticos y transformación de moléculas.

PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA APLICACION DEL CONOCIMIENTO BASICO DE BIOLOGIA CELULAR EN BIOTECNOLOGIA EN IBEROAMERICA. (The potential biotechnological applications of basic cell biology knowledge in Ibero-America).

Pablo Valenzuela. Chiron Corporation, Emeryville, California, USA y Bios-Chile IGSA, Santiago, Chile.

La gran mayoría de nuestros países iberoamericanos se caracterizan por la ausencia de un apoyo político prioritario a la ciencia y la tecnología. Somos exportadores de científicos y técnicos altamente especializados e importadores de tecnologías y de los productos derivados de ella. La biotecnología parece seguir el mismo camino. Esta presentación tratará sobre algunas de las causas y algunos remedios que, con el debido apoyo político, podrían ayudarnos a superar este destino. Entre los factores a analizar están: Planes nacionales, capitales e incentivos, apoyo a y rol de las universidades, áreas y productos, incorporación de tecnologías, convenios de manufactura y comercialización.

SIMPOSIO SINGER SYMPOSIUM

Coordinador: *Juan Fernández*

SINGER SYMPOSIUM. Juan Fernández, Coordinator (Faculty of Science, University of Chile, Santiago, CHILE).

1. Welcome speech, short biography and achievements of Dr. Marcus Singer.
2. Role of the cytoskeleton in early embryonic development. R. Maccioni will discuss the stabilization of the microtubule cytoskeleton by transglutaminase, during the early mammalian development and neuroblastoma differentiation. J. Fernández will present evidence that organelle translocation during ooplasmic segregation in leech eggs relies on organizational changes of the meiotic and interphase cytoskeletons.
3. Control of the organization and degradation rates of acetylcholine receptors. M. Salpeter will show that the degradation rates of acetylcholine receptors are modified in denervated and reinnervated mouse muscle. N. Inestrosa, on the other hand, will provide evidence that heparan sulfate proteoglycans appear to play an important role as organizers of the cholinergic synapse.
4. Role of neurotrophism and expression of oncogenes in developing peripheral structures. J. Mc Credie will analyze the effect of sensory neurotoxic agents on embryogenesis and the significance of neurotrophism in modern medicine. Finally, J. Géraudie will provide evidence that transcription of the oncogene c-myc may be turned on and off in cells of amphibia forelimb regenerates.
5. Concluding remarks and medals ceremony.

TRANSGLUTAMINASE IN EARLY DEVELOPMENT AND CELL DIFFERENTIATION (Transglutaminasas en el desarrollo temprano y la diferenciación celular) Maccioni, R.B. International Center for Cancer and Developmental Biology (ICC), Santiago, Chile.

The morphological changes of the embryo during early development are related to processes of intracellular reorganization of blastomers and cell-to-cell interactions. The cytoskeleton, implicated in maintenance of cellular shape provide the framework required for these processes in early embryos. Transglutaminase (TG), an enzyme that catalyze acyl transfer reactions producing crosslinking between proteins or covalent modifications by polyamines appears to play critical modulatory roles in preimplantational mouse embryogenesis and differentiation of neuroblastoma cells. The specific TG activity in the soluble cellular fractions increases 2-fold from 2-cell embryos to 8-cell morulae and 4-fold from 2-cell embryos to blastocysts. The same developmental profile was seen when either N,N'-dimethylcasein or endogenous substrates were used in the TG assay. Major acyl donor components were tubulin and a high molecular weight crosslinkage products. A pronounced increase in TG was also observed during morphological differentiation of neuroblastoma. TG does not reach maximal levels until extensive neurite formation has occurred. Using putrescine as acyl acceptor, endogenous acyl donors in neuroblastoma included proteins that co-migrated on SDS-PAGE with tubulin and actin. TG may mediate covalent crosslinking of microtubules to other cellular components. These studies indicate that TG is directly implicated in the cytoarchitectural changes mediated by stabilization of the microtubule cytoskeleton during early embryogenesis and neuroblastoma differentiation. (Supported by Council for Tobacco Research, USA, NATO and ADRDA)

DYNAMICS OF THE CHOLINERGIC SYNAPSE. N.C. Inestrosa, Molecular Neurobiology Unit, Department of Cell Biology, Faculty of Biological Sciences, Catholic University of Chile, P.O. Box 114-D, Santiago-CHILE.

The neuromuscular junction correspond to a small fraction (0.01%) of the muscle surface. At the junction, both the nerve terminal and the muscle surface are differentiated. In particular, the muscle presents synaptic macromolecules including, the acetylcholinesterase (AChE), the acetylcholine receptors (AChR) and heparan sulfate proteoglycans. The relationship between these macromolecules have been studied in genetic variants of muscle cells, defective in radioactive sulfate incorporation. These variants express normal levels of AChR on their surface, but the myotubes did not present clustered AChRs nor asymmetric AChE (as in wildtype myotubes), however, when these cells were co-cultivated with spinal cord explants the clustering defect was eliminated.

Besides the co-localization and specific interaction between HSPG, and AChR and AChE, these PGs also interacts with other component of the ECM, therefore because of its multiple specific interaction and well defined localization, it is possible to suggest that the HSPG acts as the "organizer of the cholinergic synapse". Studies in other systems have demonstrated that PGs are implicated in the assembly and deposition of ECM components. Hence, the accumulation of ECM-PGs may contribute to the establishment of a normal nerve-muscle contact and to participate in the anchoring of synaptic components.

ORGANIZATION OF THE CYTOSKELETON AND OPLASMIC SEGREGATION IN THE LEECH UNCLEAVED EGG. (Organización del citoesqueleto y segregación ooplásmica en el huevo indiviso de sanguijuela). J. Fernández, Department of Biology, Faculty of Science, University of Chile, Santiago, Chile.

Dramatic structural changes take place in the leech egg before initiation of the first cleavage division. Some of these changes are related to the establishment of polar cytoplasmic domains (teloplasms), which are later utilized in the manufacture of ectodermal and mesodermal founder cells. Teloplasms form by ooplasmic segregation, process that involves orderly translocation of numerous organelles across the egg surface. The role played by the cytoskeleton in this process has been studied by immunofluorescence, drug treatment, scanning and electron microscopy and scanning laser microscopy (confocal).

Ooplasmic segregation seems to be accomplished in two steps. Step I occurs by the end of the first meiotic division, when contraction of an actin lattice provokes discharge of the first pole cell and ooplasm accumulation at the top of the animal hemisphere. Step II occurs during the second half of the first interphase, when contraction of an actin network and rearrangement and shortening of microtubules lead to ooplasm concentration at the animal and vegetal poles. Step II ooplasmic segregation is thus bipolar, and appears to take place along certain microtubules put together into meridional columns by an earlier episode of actin contraction.

Results indicate that the organization and properties of the meiotic and interphase cytoskeletons allow differentiation of the leech uncleaved egg along its animal/vegetal axis (Supported by grant 89-1128 from Fondo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica).

NEUROTROPHISM AND CONGENITAL MALFORMATIONS (Neurotrofismo y malformaciones congénitas). J. McCredie. Department of Surgery. The University of Sydney. Sydney. Australia.

The role of sensory nerves in embryological development has been overlooked for too long. Electron microscopy has established the presence of nerves in embryonic limb buds, previously thought to be nerveless. Sensory neurotoxic agents such as thalidomide produce malformations in the distribution of dermatomes, myotomes and sclerotomes. The nature of transmission of the neurotrophic message, a biological secret, is of great potential importance to medical science. Examples of the medical application of sensory neurotrophism will be presented.

Degradation of Junctional Acetylcholine Receptors. Salpeter, M.M. and Shyng, S.L. Neurobiology & Behavior, Cornell University, Ithaca, New York.

Studies of the degradation rate of acetylcholine receptors (AChR) have identified two populations of junctional AChR at the neuromuscular junction (nmj) of mouse sternomastoid muscle. The first, (called original or slow AChR's), are present at the innervated junction, have a degradation half life ($t_{1/2}$) of about 8 to 10 days and accelerate after denervation to a $t_{1/2}$ of about 3 days. The second, (called new or fast AChR) are inserted at the nmj after denervation and have a $t_{1/2}$ of approximately 1 day at all times after denervation. Reinnervation has a different effect on the degradation rate of these two classes of junctional receptors. Reinnervation causes the accelerated degradation rate of the low AChR already in the membrane to revert to the $t_{1/2}$ of 8 d, characteristic of the innervated AChR's. However reinnervation causes no change in the $t_{1/2}$ of the fast (1 d) AChR's once they are in the post-synaptic membrane. These results suggest that structural differences, dependent on the state of innervation at the time of synthesis, may determine both the inherent degradation of the junctional AChR's and whether that rate can be modified by reinnervation after the AChR is in the plasma membrane. The possible nature of the neural control will be discussed.

ONCOGENE C-MYC EXPRESSION DURING BLASTEMA FORMATION OF FORELIMB REGENERATE IN THE FROGLET, *Xenopus laevis*. (Expresión del oncogen C-MYC durante la formación del blastema de regeneración del miembro anterior de *Xenopus laevis*). J. Géraudie, J. Hourdry, S. Vríz, M. Singer and M. Mechali. Laboratoire d'Anatomie comparée Université Paris VII, Laboratoire d'Embryologie moléculaire, Institute Jacques Monod, Paris and Department of Anatomy, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, U.S.A.

Analysis of c-myc expression has been carried out in the forelimb regenerate of the albinos froglets *Xenopus laevis*. Northern blots analysis has shown c-myc expression especially in the regenerate when compared to stump tissues. *In situ* hybridization confirmed and emphasized at the level of the tissue the results obtained above. Grain densities were observed in the wound epidermis while the superficial ones were label free. Labelling of the mesenchymal cells of the blastema was evenly distributed. The observations suggest that transcription of c-myc maintains the cells in the cell cycle and is turned off, in the epidermis of the limb of *Xenopus*, when cells are already highly differentiated in keratinocytes and susceptible to sloughing.

SIMPOSIO PAABS. RESPUESTAS MOLECULARES DE LOS ORGANISMOS FRENTE A ESTIMULOS EXTRACELULARES

En homenaje a Alberto Sols García (Q.E.P.D.)

Coordinador: *Alejandro Venegas*

Simposio "Respuestas Moleculares de los organismos frente a estímulos extracelulares". Coordinador: Dr. A. Venegas, P. Universidad Católica de Chile.

El simposio se enfoca sobre el efecto de diversos estímulos externos, como cambios de osmolaridad, temperatura, pH y luz, en la respuesta adaptativa tanto de organismos procarióticos como eucarióticos y los mecanismos involucrados.

Del análisis de diversos modelos biológicos descritos en este simposio, se visualiza una cadena de eventos, siguiendo el flujo: señal → transductor → mensajero → modulación de la expresión génica → respuesta final.

Así, incorporando en microorganismos genes ya caracterizados, se analiza la respuesta por variaciones de osmolaridad y temperatura, (expresión de genes de porinas de *S. typhi*).

Como modelo de transductor se discuten la estructura y la equivalencia funcional del complejo adenilato ciclasa en hongos y protozoos.

En relación a la naturaleza de la respuesta, se presentan estudios comparativos frente a "stress" térmico y de bajo pH, en diversos organismos lixiviantes, los que sugieren que la respuesta a nivel proteico es semejante.

La evolución a preservado también la estructura de los genes representativos de la respuesta, así como la interacción de sus productos entre diversas especies (similitud de genes *dnaK* y *hsp70* de *C. crescentus* y *Drosophila*; similitud y equivalencia funcional entre adenilato ciclasas y entre proteínas G y Ras de diversas especies).

Finalmente, esta serie de eventos que consolidan la respuesta frente al estímulo, son más complejos en eucariotes, ya que involucran interrelaciones y supeditan la expresión génica a otros procesos (reprogramación de la expresión génica en el proceso de aclimatación de la carpa).

En resumen, las diferentes señales que gatillar las diversas respuestas, utilizan mecanismos transductores semejantes, generan productos similares para respuestas adaptativas relacionadas y modular armónicamente la expresión génica de varios procesos. Así se mantiene una respuesta adaptativa que asegure la supervivencia del individuo frente a cambios del medio.

RESPUESTA ADAPTATIVA DE LA EXPRESION GENICA DE LAS BACTERIAS FRENTE AL STRESS TERMICO Y DE pH. (Adaptative response of bacterial genetic expression towards thermal and pH stress). Alvarez, S., Toledo, H., Varela, P., Chanorro, D., Peirano, I. y Jerez, C.A., Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Cuando los organismos se someten a un cambio brusco de temperatura por un corto tiempo (shock térmico), responden inhibiendo la síntesis global de las proteínas, induciendo simultáneamente la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del shock térmico o HSPs. En las faenas de biolixiviación de minerales las temperaturas pueden variar entre 0°C y 50°C o más. Estudiamos la respuesta a los cambios de temperatura de las bacterias mesofílicas *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (de 30°C a 40°C), la cepa termofílica moderada LM2 (de 50°C a 60°C) y la arqueobacteria termofílica *Sulfolobus acidocaldarius* (de 70°C a 85°C). Las bacterias se crecieron en presencia de Na₂¹⁴CO₃ y los productos radiactivos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y fluorografía.

Todos los microorganismos mostraron una respuesta típica al shock térmico. Por otro lado, *T. ferrooxidans* no mostró respuesta a un shock frío (30°C a 10°C). Sin embargo, esta bacteria adquiere termotolerancia frente a un shock letal de 50°C cuando se la somete a un shock previo a 40°C. Frente a un cambio de pH (3.5 a 1.5) y en presencia de etanol (4%), el *T. ferrooxidans* mostró una respuesta muy similar al shock térmico, induciendo aparentemente las mismas proteínas. Estos resultados indican una posible interrelación entre estas respuestas a diferentes tipos de stress.

Financiado por Proyectos FONDECYT 88-0074, PNUD/UNESCO CHI/ 88-003 y Universidad de Chile.

CONSTRUCCION DE MINIGENES DERIVADOS DEL GEN *ompC* DE *Salmonella typhi* Y ESTUDIOS SOBRE EL CONTROL DE LA EXPRESION EN *E. coli*. (Construction of minigenes derived from the *Salmonella typhi ompC* gene and studies on expression in *E. coli*). Venegas, A., Alvarez, A., Gómez, L., Martínez, A., Lira, P., Hinrichsen, J.P. y Jarro, L., Unidad de Microbiología y Genética Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago, Chile.

Entre las proteínas de la membrana externa de las bacterias gram negativas están las llamadas porinas, capaces de formar poros que permiten el paso de solutos pequeños. En *Salmonella typhi*, agente causal de la fiebre tifoidea, se han detectado dos porinas *OmpC* (36 kDa) y *OmpF* (35 kDa).

El gen de la porina *OmpC* de *S. typhi* ha sido clonado y secuenciado previamente por nosotros. El objetivo de este trabajo es subclonar y expresar secuencias de esta porina que sean características de ella, y que al mismo tiempo correspondan a zonas expuestas al exterior, es decir, epítopos específicos de *S. typhi*.

Analizando la secuencia del gen *ompC* de *S. typhi* y comparándola con su *simil* de *E. coli*, se encuentra una homología de 74%. Sin embargo, a pesar de esta alta homología, es posible encontrar dos zonas en la secuencia aminoácídica que no se encuentran en la porina de *E. coli*, y que según modelos de plegamiento de la proteína en la membrana, serían zonas expuestas. Estas dos zonas están comprendidas entre los aminoácidos 160-167 y 252-259. Ambas están contenidas en un fragmento de restricción *PvuII* y *PstI* del gen *ompC*, que corresponde a la zona entre los aminoácidos 30 a 258.

Del clon pSTPEV (plásmido con gen *ompC* de *S. typhi* completo, clonado en el sitio *EcoRV* de pBR329), se obtuvo el fragmento *PvuII/PstI*, el cual fue clonado en el vector de expresión pNompH. Con este tipo de construcción se obtiene una proteína híbrida que posee en el extremo amino terminal el péptido señal de *OmpH* (lo que hace que ella atraviese la barrera de la membrana plasmática), más 10 aminoácidos correspondientes a la secuencia "linker" usada en la construcción, y en el carboxilo terminal, 7 aminoácidos extras. Este vector consta además, de dos promotores en tandem, *lpp* y *lac*, lo que permite una alta expresión y a su vez, regulable mediante el inductor de *lac*, IPTG. El clon obtenido (pSTPM), expresa una proteína de aproximadamente 27kDa que no existe en *E. coli* y que es reconocida por anticuerpos anti *OmpC* de *S. typhi* y al parecer se incorpora en la membrana externa. Otro minigen obtenido (pSTP2K2) carece de los 9 primeros aminoácidos y de los últimos 109 del extremo carboxilo terminal. Se presentan estudios comparativos de regulación de la expresión por osmolaridad, concentración de glucosa y temperatura, con respecto al gen completo.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 2026/87.

O GENE DE CHOQUE TÉRMICO *dnaK* É REGULADO PELO DESENVOLVIMENTO EM *Caulobacter crescentus*.

(Heat shock gene *dnaK* is developmentally regulated in *Caulobacter crescentus*. Gomes, S.L. & Shapiro, L. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo & Department of Developmental Biology, Stanford University School of Medicine.

O gene de choque térmico *dnaK* de *Caulobacter* foi isolado utilizando-se como sonda o gene *hsp70* de *Drosophila*. O fragmento Bam HI de 3,5kb clonado foi sequenciado e mostrou conter dois quadros abertos de leitura. O primeiro codifica uma proteína 66% idêntica a *DnaK* de *E. coli* e 54% idêntica à *Hsp70* de *Drosophila*. A sequência de aminoácidos deduzida do outro quadro aberto de leitura, que não termina dentro do clone, mostrou 59% de identidade com outra proteína de choque térmico de *E. coli*, a proteína *DnaJ*. Análise em "Northern blots" do RNA de células submetidas ou não a choque térmico, demonstrou a presença de um transcrito de 4.0kb, indicando que *dnaK* e *dnaJ* formam um operon. Ensaios de proteção com nuclease S1 e experimentos de extensão de "primer" indicaram que a transcrição se inicia em dois pontos diferentes, a 5' do gene *dnaK*. Um único início de transcrição foi identificado durante o choque térmico. A temperaturas normais um outro início de transcrição foi determinado que mostrou ser regulado pelo ciclo celular. Ensaios de proteção com S1 assim como ensaios com gene *dnaK* fundido com os genes reporteres de transcrição *neo* e *lux* mostraram que a expressão do gene *dnaK* ocorre imediatamente antes da iniciação da replicação do DNA em *Caulobacter*.

EL SISTEMA ADENILATO CICLASA Y LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN EUKARIOTES INFERIORES Y PLANTAS (Adenylate cyclase system and the signal transduction in lower eucaryotic and plants) M.M. Flawiá; J. Muschietti; H. Martinetto; D. Altschuler y H.N. Torres) Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas-Universidad de Buenos Aires, Argentina.

La regulación hormonal del sistema Adenilato ciclasa (AC) es el resultado de la interacción de tres entidades proteicas: Receptor hormonal (R); proteínas reguladoras que unen GTP (Gs, Gi) y subunidad catalítica (C). El hongo ascomicete *Neurospora crassa* posee solamente el componente C que puede interaccionar, en reconstituciones heterólogas, con el componente Gs y el receptor para el glucagón o β adrenérgico. La enzima, en presencia de ATP-Mg²⁺ como sustrato, es estimulada por hormonas, GTP, toxina del cólera, etc. Se clonaron y secuenciaron genes del tipo ras en *Neurospora*, cuyo papel regulatorio está aún en estudio.

La AC de *Trypanosoma cruzi* es similar, en cuanto a su comportamiento bioquímico, a la de *Neurospora* pero se encuentra asociada a una proteína del tipo Gs de PM 52000, que se ADP ribosila en presencia de toxinas bacterianas.

El componente C de ambos organismos puede interaccionar con el sistema rodopsina-transducina de membranas de retina bovina donde la luz, actuando como hormona, permite la producción de AMP cíclico en los sistemas fusionados. La mayor actividad enzimática corresponde a la longitud de onda de la rodopsina fotolizada.

Otro sistema importante de transducción de señales ambientales es el relacionado a fotoseñales y sus respectivos sensores: los fitocromos. Relacionado a este segundo tipo de mecanismo se caracterizó una proteína que une GTP en *M. sativa*. Por el gráfico de Scatchard se determinó un Kd de 8nM. Esta interacción se correlaciona con variaciones en los niveles de fitocromos (luz roja 660nm, roja lejana 730nm, oscuridad, etc.). A partir de un extracto de membranas se purificó parcialmente la proteína a través de DEAE celulosa y Ultrogel ACA34. La fracción que une GTP coincide con un PM de 48000. En presencia de NAD, las toxinas de *V. cholerae* y *B. pertussis*, inhiben la unión específica del GTP, indicando un bloqueo en el sitio de unión o de disociación, producido por la ADP ribosilación, similar a lo que ocurre con las proteínas Gi en eucariotes superiores.

ASPECTOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA COMPENSATORIA EN LA CARPA FRENTE A VARIACIONES DE TEMPERATURA. (Molecular aspects of the compensatory response to temperature changes in the carp). Krauskopf, M., Ambauer, R., Concha, M., Hernández, L., Inostroza, J., León, G., Romero, F., Vera, M.I. y Villanueva, J. Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

Los organismos ectotermos son capaces de mantener sus funciones esenciales cuando son sometidos a variaciones térmicas estacionales. Nuestro grupo ha postulado que un mecanismo fundamental en la estrategia de la respuesta compensatoria lo constituye la reprogramación de la expresión génica.

Estudios ultraestructurales del hígado de la carpa han revelado profundos cambios a nivel citoplasmático y nuclear asociados al proceso de aclimatación. Consistente con estas observaciones, se ha encontrado que en carpas adaptadas a invierno, la síntesis de RNA está reprimida y la de proteínas totales disminuida esencialmente por efecto de la temperatura. Sin embargo, el patrón de proteínas sintetizadas por el hepatocito, es diferente en ambas estaciones. La síntesis de apolipoproteína A-I, utilizada como marcador de expresión durante aclimatación, se encuentra aumentada en carpas adaptadas a invierno con respecto a lo esperado por efecto del Q₁₀. Se ha construido una biblioteca de cDNA de hígado de carpa en λ gt10 para aislar una sonda que permita estudiar la transcripción de apo A-I.

Paralelamente hemos investigado la inducción de vitelogenina por β -estradiol en carpas machos durante aclimatación. Los resultados demuestran que existe una respuesta diferencial a la hormona que depende de la temperatura de aclimatación del pez.

Proyectos FONDECYT 0933/88, DIC-UACH S-86-29 y programa de graduados OEA.

SIMPOSIO TRANSPORTE DE IONES Y SU REGULACION EN ENFERMEDADES HUMANAS

Coordinadores: M. Isabel Behrens, Cecilia Vergara, Daniel Wolff

SIMPOSIO

TRANSPORTE DE IONES Y SU REGULACION EN ENFERMEDADES HUMANAS.

Introducción.

En este simposio tendremos una visión actual de los mecanismos involucrados en cinco patologías hereditarias importantes, tanto por la incidencia que tienen en la población general (diabetes, hipertensión), como por los efectos dramáticos que producen en los individuos afectados (distrofias musculares, hipotermia maligna, fibrosis quística).

El común denominador de estas patologías parece ser un defecto en una población de membrana que, en los casos en que su función ha sido identificada, es además un sistema de transporte de iones (canal o transportador).

El Dr. Eric Hoffman nos presentará el elegante trabajo del grupo del Children's Hospital de Boston que llevó a la identificación del gen defectuoso en la distrofia muscular de tipo Duchenne/Becker y de su producto, la distrofina, una proteína cuya secuencia se conoce pero cuya función es todavía una incógnita. Los trabajos presentados por los Drs. Jaimovich y cols., López, Wolff y Stutzin, Canessa y Atwater y cols. se centran en la fisiología celular en sistemas modelos y, al menos en los 4 últimos, en la identificación de el canal o transportador deficitario o alterado.

Todos estos trabajos son una muestra de la importancia del uso de diversas técnicas de biología celular, electrofisiología, biofísica de transporte, genética y biología molecular en lo que constituye una verdadera explosión en el conocimiento de los mecanismos moleculares de las patologías hereditarias humanas.

CANALES DE CLORURO EN EPITELIOS SECRETORES: ALTERACIONES EN LA FIBROSIS QUISTICA. (Chloride channels in secretory epithelia: alterations in cystic fibrosis).

Wolff, D. y Stutzin, A. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

En las células de los epitelios secretores, la salida de Cl⁻ se hace a través de canales aniónicos que presentan estimulación B adrenérgica y están ubicados en la membrana apical. En la fibrosis quística (FQ) se observa una impermeabilidad de la membrana al Cl⁻, que se ha atribuido a una falla en la activación B adrenérgica de los canales de Cl⁻. En estudios de flujos de salida de 36 Cl en células de polipos nasales en cultivo de sujetos normales y con FQ hemos encontrado que el dibutiril cAMP y la toxina del cólera estimulan el flujo conductivo en las primeras pero no en las segundas. Usando la técnica de patch clamp, Frizzell y cols. y Welsh y cols., han encontrado canales de Cl⁻ en epitelio traqueal de perro que se activan por agonistas B adrenérgicos y por el potencial. Canales semejantes también se encuentran en epitelios secretores humanos y se activan en células de sujetos normales pero no en pacientes con FQ. Al registrar la actividad de canales en pedazos aislados de membranas celulares de epitelio traqueal, los canales de Cl⁻ de paciente con FQ no se activan al agregar directamente proteína quinasa A, lo que se ha atribuido a una falla en un sitio de regulación de la proteína-canal. Sin embargo, experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio usando la técnica de patch clamp en células en cultivo de páncreas de paciente con FQ muestran que hay actividad de canales de Cl⁻, lo que podría indicar que en estas células epiteliales se expresa una variedad de canales de Cl⁻ con diferentes vías de regulación.

Financiado por los proyectos FONDECYT 0448-88 y Cystic Fibrosis Foundation I078 9-01.

REGULACION DEL CONTRATRANSPORTE DE Na^+/H^+ EN LA HIPERTENSION ESENCIAL. (Regulation of the Na^+/H^+ exchanger in essential hypertension). Mitzy Canessa. Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Ma, USA

Ten years ago, we initiated studies of the genetic variation of Na^+ transport systems in the human population as an approach to the genetics of hypertension. Two of these biochemical phenotypes, the Na^+/H^+ exchange and the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport are found abnormal in red cells of a sizable proportion of the essential hypertensive population. Both transport systems are altered in families of hypertensive patients, in the genetic rat models of hypertension and expressed in target tissues such as renal tubular epithelium, vascular smooth muscle and adrenal glomerulosa cells. In these cells, the Na^+/H^+ exchanger is modulated by vasoconstrictor agonists such as Angiotensin II and growth factors such as EGF and PDGF which mobilize Ca^{++} .

In human red cells and lymphocytes of hypertensive patients, the antiporter exhibit elevated V_{max} and reduced Hill coefficient for activation by cell pH. The abnormal regulation of the Na^+/H^+ exchanger may lead to: (a) increased vascular reactivity, because it potentiates vasoconstrictor effects and favors vascular hyperplasia; (b) abnormal Na^+ reabsorption in the early proximal tubule modulated by Angiotensin II; and (c) abnormal aldosterone secretion because it modulates the Ang II-stimulated pathway.

These abnormalities might be associated to post-translational modifications such as Ca^{++} dependent phosphorylation or by genetic variation in the antiporter gene as defined by RFLP analysis.

DUCHENNE vs. BECKER MUSCULAR DYSTROPHY: DEFICIENCIES vs. ABNORMALITIES OF A PERIPHERAL MEMBRANE CYTOSKELETAL PROTEIN. Eric P. Hoffman, Alan H. Beggs and Louis M. Kunkel. Division of Genetics, Children's Hospital, Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, MA USA.

The lethal and common human Duchenne muscular dystrophy is caused by the absence of 'dystrophin', a component of the membrane cytoskeleton in muscle cells of all vertebrates. The milder Becker muscular dystrophy is caused by internal deletions of amino acid sequence of the dystrophin protein. Using powerful molecular genetic techniques and the international medical network, we have identified a large number of Becker muscular dystrophy patients, and have defined the precise amino acid sequences which are missing from the 3,600 amino acid dystrophin. By correlating biochemical data, genetic data, and clinical data for these patients, a structure/function map of the dystrophin protein is beginning to be assembled. Such analyses give a great deal of insight into the normal function of dystrophin on the plasma membrane, and also shed light on the consequences of its absence (Duchenne) or abnormalities (Becker) in human disease.

Other recent work in Duchenne/Becker dystrophy has focused on the identification of true animal models for the disease. Dystrophin-deficient mice, cats and dogs have all been identified, and all have striking similarities and dissimilarities. The study of these animals is telling us a great deal about the reasons for the progression of human Duchenne dystrophy. Finally, much progress has been made concerning improved diagnosis of these disorders in humans. Both prenatal and post-natal diagnoses can now often be made with 100% accuracy, even before the onset of clinical symptoms.

In conclusion, human molecular genetics was responsible for the identification of dystrophin, and will probably continue to play an important role in the determination of dystrophin function.

MUSCULO ESQUELETICO HUMANO EN CULTIVO. UNA APROXIMACION AL ESTUDIO DE DISTROFIAS MUSCULARES. (Human skeletal muscle in culture. An approach to the study of muscular dystrophy). Jaimovich, E., Liberona, J.L., Tascón, S., Hidalgo, J., Cifuentes, F., Carrasco, M.A., Sánchez, X., y Caviedes, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las distrofias musculares constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades hereditarias que se caracterizan por una debilidad muscular progresiva, producto de defectos bioquímicos intrínsecos del tejido muscular. La mas común de estas enfermedades es la distrofia tipo Duchenne, en donde el gen defectuoso ha sido identificado y su producto, la distrofina, es una proteína de membrana cuya función se desconoce (Hoffman y cols. Cell 51, 919, 1987). Este defecto puede estar relacionado con los procesos de excitación y contracción muscular.

Nuestra aproximación al problema consiste en generar líneas celulares humanas en cultivos permanentes a partir de biopsias quirúrgicas de músculo esquelético normal y de pacientes con distrofia muscular Duchenne.

Las células fueron transformadas por incubación con medios condicionados de células tiroideas y se establecieron numerosos clones que crecen en forma indefinida. Además de los marcadores habituales de músculo esquelético como miosina y creatinfosfoquinasa, hemos estudiado sistemas importantes en los procesos de excitación y contracción muscular, que incluyen receptores a dihidropiridinas y alfa bungarotoxina, canales iónicos sensibles a acetilcolina y el metabolismo de fosfatidil inositoles e inositoles fosfato. Los estudios preliminares apuntan a las variaciones en estos parámetros con la diferenciación celular y con condiciones de potencial de membrana que simulan estímulos fisiológicos para el músculo.

Financiado por NIH GM35981, MDA, FONDECYT 896 y 1340 y DTI 2123.

EFFECTO DEL HALOTANO Y DEL DANTROLENO SOBRE LA LIBERACION DE CALCIO EN FRAGMENTOS DE RETICULO SARCOPLASMICO DE PORCINOS SUSCEPTIBLES A HIPERTERMIA₂ MALIGNA. (Effects of halothane and dantrolene on Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum fraction in susceptible swine to malignant hyperthermia). López, J. R. y Sánchez, V. Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, Caracas, Venezuela.

La hipotermia maligna (HM) es un síndrome farmacogenético del músculo esquelético, que se observa en humanos o porcinos susceptibles cuando estos son expuestos a agentes anestésicos volátiles tipo halotano y/o relajantes musculares despolarizantes tipo succinilcolina. Hemos estudiado el efecto del halotano y del dantroleno sobre el proceso de liberación de calcio por parte del retículo sarcoplásmico (RS).

La fracción cruda de RS fue preparada según método descrito previamente (Sánchez et al., Muscle Nerve en prensa), de músculos provenientes de porcinos controles (PC) e hipertérmicos (PH). Los experimentos fueron realizados a 25°C, usando Arsenazo III como indicador de calcio.

En la presencia de 400 μM de halotano la liberación de calcio siempre fue superior en las vesículas de PH que en aquellas obtenidas de PC independientemente de la precarga de calcio. Cuando la concentración de halotano se incrementó de 0 hasta 170 μM , el valor umbral del fenómeno de liberación de calcio inducida por halotano en las vesículas de RS de PH fue menor que el valor observado en los PC. La presencia de 30 μM de dantroleno produjo una inhibición total del fenómeno de la liberación de calcio inducida por halotano. Estos resultados demuestran que en las fibras musculares HM existen alteraciones importantes a nivel del RS en relación al proceso de liberación de calcio. Además se demuestra el efecto del dantroleno, lo cual podría explicar su eficacia en el manejo preventivo y curativo de las crisis de HM. (Proyecto financiado por MDA y CONICIT de Venezuela SI-1277).

LA SECRECIÓN DE INSULINA SENSIBLE A GLUCOSA EN ISLOTES DE LANGERHANS DE RATÓN ES INDEPENDIENTE DEL POTENCIAL DE MEMBRANA. (Glucose sensitive insulin secretion is independent of membrane potential in mouse islets of Langerhans). Atwater, J., Brouwer, A. y Carroll, P.E. LCBG, NIDDK, NIH, USA.

Generalmente se acepta que el metabolismo de la glucosa bloquea los canales de K^+ , lo cual depolariza la membrana, activa canales de Ca^{2+} dependientes del voltage y desencadena la liberación de insulina. Intentamos estudiar la secreción de insulina sensible a glucosa en la condición de un potencial de membrana (V_m) depolarizante y constante (25 mM KCl) y compararla con la situación en la que la glucosa depolariza (5 mM KCl). El estudio fue realizado en islotes disecados y periferfudidos. En la fase aguda, fueron expuestos por 10 minutos a cambios escalonados de la glucosa desde 5.6 a 33 mM. La liberación secundaria se estudió exponiendo los islotes a glucosa 27 mM por una hora. RESULTADOS: 25 mM KCl aumentó significativamente la secreción basal (con respecto a 5 mM): 220 ± 21 vs 326 ± 21 pg/min/6 islotes ($p < 0.05$). La fase aguda de secreción fue normal. La fase secundaria también fue sensible a glucosa. Además, al fijar V_m bloqueando los canales de K^+ sensibles a ATP con glyburida o tolbutamida, nuevamente se obtuvo secreción glucosa-dependiente. CONCLUSIONES: El efecto depolarizante de la glucosa en la membrana no regula la secreción de insulina glucosa-dependiente. Los datos son compatibles con la activación de canales de Ca^{2+} por la glucosa vía un mecanismo independiente del voltage.

SIMPOSIO METODOS MOLECULARES Y CLADISTICOS EN LA BIOGEOGRAFIA Y SISTEMATICA

Coordinadora: *Mary Kalin*

SIMBIOSIS Y DIFERENCIACION EN LA CELULA EUCARIONTE. (Symbiosis and differentiation in the eucaryotic cell). Medina, C. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Se postula que la diferenciación celular en eucariontes es una posibilidad creada por la historia evolutiva que originó a los eucariontes unicelulares. Esta historia consistió en una serie de asociaciones entre distintos procariontes, los que se fueron constituyendo en simbioses de un mosaico evolutivo. La diferenciación celular sería una segregación de la expresión de las diversas herencias que dieron origen al protista ancestral.

Para fundamentar esta interpretación, se realizaron comparaciones ortólogas entre estructuras primarias de proteínas pro y eucariontes, construyéndose cladogramas en los cuales la posición de ambos grupos y la distancia relativa que los separa indican el linaje de origen de los componentes eucariontes. Establecido este origen, se observa que las proteínas eucariontes de filiación común con frecuencia muestran relación en sus patrones de expresión, en concordancia con la hipótesis propuesta.

PARALELISMO POR HETEROCRONIA EN LA SISTEMATICA DE LOS CRICETIDOS SUDAMERICANOS (Parallelism through heterochrony in the systematics of South American cricetids). Spotorno, A. Departamento Biología Celular y Genética, F. de Medicina, U. de Chile.

La concordancia entre dos "arquetipos morfológicos" (simple y complejo), su distribución (Norte y Sur) y el intercambio faunístico pliocénico ha sido la base para la separación de los cricétidos del Nuevo Mundo en las subfamilias Neotominae y Sigmodontinae. La ocurrencia de excepciones sudamericanas (*Nyctomys*, *Abrothrix* y *Punomys*) sugiere que la morfología, por ser epigenética, no siempre es un buen estimador de los componentes cladísticos y temporales de la filogenia, en contraste con los métodos moleculares.

Los análisis de electroforesis de proteínas (30 loci) en 19 especies permitió definir a los taxa sudamericanos por tres alelos únicos, separados de los norteamericanos por 1.1 D Nel ($r^2 = .61$ con datos de hibridización de DNA), sugiriendo tiempos miocénicos y cladados compatibles con el registro fósil. La red Prim de similitudes de Gower colocó a *Andinomys* en la base de la radiación akodontina-filotina.

El análisis extra-grupo (algoritmo de Maddison et al.) de componentes morfológicos claves mostró que el báculo tridigitado (complejo) es ancestral, y que evolucionó paralelamente (método de Ridley) en las especies excepcionales, asociándose a modificaciones del tamaño corporal y de las glándulas accesorias. El análisis ontogenético de tales caracteres mostró algunas especies de báculo simple con estadios tridigitados que involucionan. El estudio de varias trayectorias ontogenéticas muestra frecuentes cambios en los tiempos de inicio del crecimiento y diferenciación de varios órganos, asociados con efectos fenotípicos notables. Tales heterocronías pueden ser adaptaciones de la ontogenia a particulares condiciones ecológicas. Proy. DTI 2689/8823, U. de Chile y FONDECYT 88-1013.

LOS CROMOSOMAS APORTAN AUN A LA SISTEMÁTICA. Martínez, A. Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios Naturales (CEFAPRIN), Buenos Aires, Argentina.

Se discuten técnicas modernas que se usan actualmente en citotaxonomía. A partir de la década del 70, se produce un cambio significativo en el estudio de los cromosomas con fines sistemáticos. Mientras que en la década del 50 se hicieron aportes importantes interpretativos debido a la gran contribución del Neodarwinismo, en especial la definición y descripción del Sistema Genético, en la década del 70 el avance se produce en el campo de las técnicas. Dentro de las técnicas no moleculares podemos enumerar: 1.- Medición del contenido de ADN nuclear in situ. 2.- Estudio de la distribución y cantidad de heterocromatina constitutiva mediante varias técnicas de bandeo. 3.- Localización de los organizadores nucleolares y nucleolos activos por medio de técnicas de impregnación con plata. 4.- Identificación de componentes de ADN satélite y su relación con bandas de heterocromatina por hibridación in situ. 5.- Empleo de métodos numéricos en el análisis de los cariotipos. Estas técnicas no sólo han contribuido a la diferenciación más precisa de especies como es el caso de las mediciones de contenido ADN, sino también las técnicas de bandeo han sido muy útiles para la definición de variedades o razas geográficas desde un punto de vista infragenérico. El estudio de su origen y naturaleza de su variación ha sido de gran relevancia.

EL FINAL DEL ARCO IRIS: LA BÚSQUEDA DE LOS MÉTODOS ÓPTIMOS EN LA SISTEMÁTICA Y LA BIOGEOGRAFÍA (Rainbow's end: the quest for optimal methods in Systematics and Biogeography). Crisci, J. V. Laboratorio de Sistemática y Biología Evolutiva. Museo de La Plata. La Plata, Argentina.

La Sistemática se halla en la actualidad en una fecunda ebullición de ideas. Existe una febril búsqueda, no exenta de apasionada controversia, del método óptimo. Desde los distintos enfoques (Cladismo, Feneticismo y Evolucionismo) se ha tratado de demostrar la validez del método propio y la deficiencia del ajeno. Sin embargo, la reciente utilización de caracteres taxonómicos producto de la tecnología del ADN recombinante, coloca a esta controversia bajo una nueva perspectiva: la naturaleza del carácter taxonómico utilizado condiciona el método de análisis. En el contexto del Cladismo se han propuesto modificaciones a las técnicas conocidas a fin de adecuarse específicamente a estos nuevos caracteres moleculares.

Por otra parte, y en estrecha relación con el devenir de la Sistemática, la Biogeografía Histórica, también se plantea la búsqueda de su método óptimo. La Biogeografía de la Vicariancia es, con sus diversas vertientes (análisis de componentes, simplicidad cuantitativa, compatibilidad de componentes), una fuente de controversia y al mismo tiempo de orientación en esa búsqueda.

ESTUDIOS MOLECULARES Y CLADÍSTICOS EN PLANTAS CHILENAS (Molecular and cladistic studies in Chilean plants). Steussy, T. and Crawford, D. Department of Botany, Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.

Análisis cladísticos de datos sistemáticos han sido aplicados, durante más de una década, para construir hipótesis filogenéticas en diferentes grupos de plantas. Los caracteres morfológicos han sido los más frecuentemente usados en este tipo de estudio. Durante los últimos cinco años, datos moleculares se han aplicado frecuentemente para inferir relaciones evolutivas entre plantas. Parte de estos datos se han usado en grupos que habían sido previamente analizados cladísticamente. Presentamos brevemente la teoría y métodos de la cladística, las categorías moleculares usadas frecuentemente (principalmente alozimas y sitios de restricción de ADN cloroplastidial), y aplicaciones de estos datos a varios grupos de plantas presentes en el archipiélago Juan Fernández. Se dará énfasis en el género endémico *Dendroseris* (Asteraceae) y en las especies endémicas de *Wahlenbergia* (Campanulaceae).

SIMPOSIO TAMAÑO CORPORAL Y ECOLOGIA: IMPLICACIONES Y PERSPECTIVAS

Coordinadores: *Rodrigo Medel, Fabián Jaksic*

TAMAÑO CORPORAL: UN NUEVO MARCO DE REFERENCIA PARA ESTUDIOS DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA. (Body size: a new framework for studies of biological diversity). Medel, R.G. Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Durante los últimos años se ha originado una línea de investigación centrada en la búsqueda de relaciones entre el tamaño corporal de las especies con sus atributos de abundancia y distribución. Si bien es cierto que históricamente el tamaño corporal ha formado parte de algunas teorías ecológicas (e.g., competencia, depredación) y de problemáticas fisiológicas; sólo recientemente se ha reconocido su carácter de elemento común a estas disciplinas. En consecuencia, se ha comenzado a definir un nuevo marco de referencia que integra mediante una misma moneda de intercambio (el tamaño corporal) a fenómenos tratados en forma independiente tanto por especialistas del ámbito ecológico (e.g., diversidad) como fisiológico (e.g., tasas metabólicas). En el contexto de esta aproximación, es posible distinguir: i) Estudios que exploran las relaciones entre los atributos mencionados sobre diferentes escalas espaciales (local, regional, continental) y ii) Estudios que exploran relaciones entre atributos sobre diferentes escalas temporales (ecológica y evolutiva). En este simposio se expondrán tanto trabajos que nutren esta nueva aproximación así como los que reflejan esta nueva forma de abordar los problemas ecológicos.

TAMAÑO CORPORAL, USO DE ENERGÍA Y LA REGLA DE BERGMANN: UNA NUEVA EVALUACIÓN. (Body size, Energy Use and the Bergmann's Rule: A New Appraisal). Bozinovic, F. Depto. Cs. Ecológicas, Fac. Ciencias, Universidad de Chile.

Uno de los esfuerzos pioneros más estimulantes para el estudio de las consecuencias fisiológicas y eco-geográficas del tamaño corporal fue la regla de Bergmann. Esta regla postula que: "razas de vertebrados de sangre caliente de climas fríos tienden a ser más grandes que razas de climas cálidos". Independientemente de las evidencias a favor y en contra de esta regla, es claro que un aumento en tamaño provoca bajas tasas metabólicas peso-específicas. Sin embargo, cuando se considera el individuo completo ellas son mayores. Es decir, un gran tamaño requiere un mayor volumen de alimento, lo cual implica que la tasa de gasto de energía ecológicamente relevante es la tasa total.

Luego, dado que el tamaño corporal determina la magnitud con que los organismos interactúan con su ambiente, y dado que un endotermo pequeño posee bajos gastos y requerimientos totales de energía en comparación a uno grande, propongo que, contrariamente a los postulados de la regla de Bergmann, es teóricamente esperable que entre razas geográficas de endotermos, un tamaño pequeño se encuentre en ventaja respecto del uso de energía en un ambiente frío y poco productivo. Usando aspectos ecofisiológicos de uso de energía pretendo evaluar esta proposición en razas geográficas de roedores.

Parcialmente financiado por FONDECYT 0813.

LA RELACION ENTRE EL TAMAÑO CORPORAL Y LA DENSIDAD POBLACIONAL EN COMUNIDADES DEL INTERMAREAL ROCOSO: UNA APROXIMACION ECOLOGICA. (Scaling population density to body size in rocky intertidal communities: An ecological approach). Marquet, P.A. & Navarrete, S.A. Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La relación existente entre el tamaño del cuerpo de los organismos y su densidad poblacional ha sido investigada primariamente en ambientes terrestres y con un fuerte sesgo taxonómico. Se ha sugerido que su forma específica depende de la intensidad de procesos ecológicos como son depredación y competencia. En este trabajo documentamos esta relación para sistemas intermareales, considerando comunidades locales e incluyendo organismos filogenéticamente disímiles. Adicionalmente, a través de dos experimentos de larga duración, de tipo presión, se evalúa el efecto que drásticos cambios en la estructura y trama de interacciones ecológicas ejercen sobre el "scaling" tamaño corporal-densidad poblacional. Nuestros resultados muestran que a) La densidad poblacional disminuye con el tamaño corporal con una pendiente igual a -1.0; b) La relación de scaling no es afectada por alteraciones dramáticas en la red de interacciones ecológicas. Esto permite concluir que a) las explicaciones para esta relación, que se basan en el uso diferencial per capita de la energía que realizan organismos de distinto tamaño corporal no es totalmente satisfactoria; b) la relación tamaño corporal-densidad poblacional es independiente de los cambios en los procesos ecológicos que actualmente operan en el seno de comunidades locales.

Financiamiento: FONDECYT F-1100, 0432/88, 0585/89.

TAMAÑO CORPORAL DEL HOSPEDADOR Y PATRONES DE DISTRIBUCION DEL TAMAÑO CORPORAL DE SUS PARASITOS EN TRES NIVELES COMUNITARIOS JERARQUICOS. (Host body size and patterns of body size distribution of parasites in three hierarchical community levels). George-Nascimento, M. & J. L. Iriarte. Departamento de Biología Marina. Area BIOTECMAR, P. Universidad Católica de Chile.

Se indaga acerca de la importancia que tendría el tamaño corporal de la especie de hospedador (en mamíferos, peces de agua dulce y marinos) sobre las variaciones en la riqueza de especies de helmintos endoparásitos que los habitan. Se considera además, las variaciones ontogenéticas del tamaño corporal del hospedador sobre la riqueza de especies ecto y endoparasitarias encontradas en 10 especies de peces marinos colectados en Chile. Se discute la importancia que sobre lo expuesto, tendría el hecho de ser un animal ectotermo y endotermo.

Desde los parásitos se explora, describe y analiza estadísticamente, los patrones de distribución de la biomasa parasitaria de 90 taxa a nivel infracomunitario (en el individuo hospedador), a nivel de comunidad componente (población, especie) y a nivel de comunidad compuesta (redes tróficas de hospedadores).

Financiado por proyecto FONDECYT 0226/88.

TAMAÑO CORPORAL DE PREDADORES COMO PREDICTOR DE RELACIONES TROFICAS. (Predator body size as predictor of trophic relationships). Jaksic, F. Departamento de Ecología, Universidad Católica de Chile.

Las diferencias de tamaño corporal entre consumidores (predadores) simpátricos han sido usadas como evidencia de la existencia de competencia. Se han propuesto "reglas" que predicen cuál es el cociente de tamaño que debiera darse entre predadores para permitir su coexistencia. El proceso subyacente al fenómeno se supone es el de similitud límite en el uso de recursos (presas). El mecanismo causal que se invoca es que distintos tamaños corporales imponen el uso de presas que también difieren en tamaño; en concreto, que predadores más grandes consumen presas más grandes que predadores pequeños. Es decir, diferentes tamaños corporales indicarían una conducta de selección de presas (en contraste a uso indiscriminado). En este caso, el tamaño corporal del predador se supone que determina cuál debiera ser el tamaño óptimo de presa consumida, dependiendo de si el predador optimiza el tiempo de caza o la calidad de la presa. En consecuencia, se ha postulado que el tamaño corporal de predadores es un buen predictor de: (1) El cumplimiento de las relaciones de similitud límite en el uso de recursos; (2) indirectamente, de la invasión de ensambles; (3) el tamaño de presa seleccionado; (4) indirectamente, el tamaño promedio de presa consumida; (5) la amplitud de nicho trófico. Yo pongo a prueba el valor predictivo del tamaño corporal en las cinco acepciones mencionadas, usando como organismos modelos a las aves rapaces diurnas y nocturnas. Mis datos provienen de una gran variedad de localidades que representan distintas regiones biogeográficas y situaciones de hábitat.

SIMPOSIO NEUROPEPTIDOS Y RESPUESTA INMUNE

Coordinador: *Javier Puente*

HEADACHE, NEUROPEPTIDES AND THE IMMUNE RESPONSE.

Mosnaim, A.D., Wolf, M. and Puente, J. Dept. of Pharmacology and Molecular Biology, U.H.S. The Chicago Medical School and Department of Psychiatry, Loyola University Stritch School of Medicine and North Chicago V.A. Medical Center, N. Chicago, Il. U.S.A.

A number of physical and psychological events, perceived by individuals as stressful can modify the immunological response. Some of these stimuli also produce changes in the processing and/or disposition of endogenous neuropeptides, especially those with opioid-like activity. This apparent relationship between changes in the immune system and variations in peptide availability has led some investigators to suggest a role for these substances in the modulation of the immune response. The observed significant and persistent increases in circulating methionine-enkephalin associated with the occurrence of the acute phase of a migraine attack and the dramatic and rapid changes in plasma peptide levels accompanying the different phases of a cluster headache provides with a model to test this hypothesis. Studies of blood samples from these patients and sex-matched, age-comparable drug-free controls shows an important number of individuals with NK cell activity significantly higher than the corresponding controls average. In order to elucidate MET mechanisms of action we are conducting in vitro cell-mediated cytotoxicity experiments using mouse spleen cells and YAC-1 mouse lymphoma target cells. Preincubation (4hr) of single cell mouse spleen suspensions with different MET concentrations (range 10^{-11} to 10^{-3} M), prior to the addition of target cells results in modulation of NK activity, which appears to be dependent on peptide concentration. The effect of a number of other peptides with biological activity will also be discussed. Supported, in part by The National Headache Foundation.

BRAIN, BEHAVIOR AND THE IMMUNE SYSTEM.

Wolf, M.E. and Mosnaim, A.D. Department of Psychiatry, Loyola University Stritch School of Medicine and North Chicago Veterans Administration Medical Center, and Department of Pharmacology and Molecular Biology, University of Health Sciences/ The Chicago Medical School, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A.

Psychoneuroimmunology is a rapidly developing field which addresses the bidirectional interactions between the central nervous system and the immune system. An increasing body of research suggests that endogenous opioid-like peptides play a critical role in the mediation of these interactions. At the biochemical level it has been shown that these neuropeptides bring about the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity and that stress related peptides and neurohormones modulate the macrophage tumoricidal activity. At the clinical level it has been shown that emotional "hardiness", a constellation of personality traits and coping mechanisms linked with health status, correlates with B-endorphin and IL-2 stimulation of NK cell activity. It is also well documented that emotional distress alters the incidence, severity, and course of illnesses which are immunologically resisted such as cancer, or associated with aberrant immunological function i.e., AIDS. Recent studies indicate that the length of survival in AIDS patients is correlated with psychological factors. The integration of genetic, endocrine, immunological and psychological research may provide a better understanding of the relationships between the brain, behavior and the immune system, operating in health as well as in various pathological conditions.

PEPTIDOS OPIOIDES Y ACTIVIDAD CITOLITICA NK. (Opioid peptides and cytolytic NK activity). Javier Puente Piccardo. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

La interrelación entre el sistema inmune y el sistema nervioso se basa en la directa innervación del parénquima de tejidos tales como timo, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y otros tejidos linfoides. Además la presencia en las células inmuno competentes de receptores para diversas hormonas y neurotransmisores, como también la propiedad de éstas células de producir múltiples señales, en muchos casos compartidas con el sistema neuroendocrino, han establecido claramente una vasta inter-comunicación que ha permitido avanzar en el entendimiento de diversas situaciones fisiológicas y patológicas.

Esta comunicación bidireccional ha sido estudiada a muchos niveles y, en el presente caso, nuestro interés se ha centrado en la actividad citolítica mediada por células NK y su modulación por péptidos opioides.

Hemos estudiado la regulación ejercida sobre esta actividad por los péptidos, metionina-enkefalina, leucina-enkefalina y β -endorfina, tratando de correlacionar la estimulación observada con la existencia y propiedad de los receptores para péptidos opioides tanto en muestras normales como patológicas. Es un hecho establecido que los péptidos opioides influyen en diversas funciones del sistema inmune, como la síntesis de anticuerpos, proliferación de linfocitos y citólisis NK. Sin embargo, las características de los receptores involucrados y el mecanismo general de acción de estos péptidos en el sistema inmune no han sido hasta ahora aclarados.

Proyecto Fondecyt 88-0874

INTERACCIONES ENTRE SISTEMA INMUNE Y NEUROENDOCRINO (Immune - Neuroendocrine Network). Sepúlveda Cecilia. Departamento de Medicina Hospital Clínico Universidad de Chile.

Aunque el sistema inmune posee sus propios mecanismos de regulación, actualmente está bien establecida la inmunorregulación neuroendocrina. Esta tiene su base en una compleja red de interacciones bidireccional entre sistema inmune, sistema neuroendocrino, y estructuras autonómicas.

Las linfocinas, monoquinas y Ac producidos durante la respuesta inmune afectan mecanismos neuroendocrinos. El sistema neuroendocrino puede o no responder emitiendo señales reguladoras que limiten su expansión excesiva, previniendo enfermedades autoinmunes y linfoproliferativas.

La sobreestimulación del sistema neuroendocrino puede ser uno de los factores mediadores de la inmunosupresión que se observa en la fase aguda de enfermedades infecciosas, shock séptico, trauma, quemaduras, cáncer, y otras condiciones patológicas.

La inmunomodulación puede contribuir a restablecer la función inmune en estos individuos.

Proyecto Fondecyt 88-0874

SIMPOSIO GENOMA Y EVENTOS FISIOLÓGICOS EN CELULAS VEGETALES

Coordinador: Jorge Sans

SIMPOSIO

GENOMA Y EVENTOS FISIOLÓGICOS EN CELULAS VEGETALES (Genome and physiological events in vegetal cells).

Sans, J. (Coordinador).

Durante la vida celular ocurren una infinidad de eventos fisiológicos, que de una u otra manera, dependen de la expresión de genes en momentos, muy particulares.

Se han utilizado diversas estrategias experimentales en células vegetales mantenidas en un tejido *in toto*, para tratar de vincular eventos celulares a sectores del genoma. Una de estas estrategias ha sido la producción de células multinucleadas con núcleos homo y heteroploides para asociar eventos propios del ciclo celular con la presencia, en estos núcleos, de determinados cromosomas. Otra metodología utilizada con este mismo fin, ha sido el incorporar al DNA nucleótidos que bajo determinadas condiciones pueden alterar la expresión del genoma. De esta manera, la broca-sustitución del genoma e irradiación posterior con luz de 313 nm., por una parte y la incorporación al DNA de un análogo de la citidina (5-azacitidina) que provocan hipometilación del DNA, por otra parte, han permitido asociar algunos eventos a sectores del genoma que replican en momentos particulares del periodo S.

Por último, mediante experimentos en que se utiliza el estrés térmico, se ha podido detectar sectores del genoma que confieren propiedades de terno tolerancia en semillas de árboles autóctonos chilenos.

En este Simposio se analizan estas estrategias y los logros con ellas alcanzados como así las perspectivas futuras de nuevos abordajes metodológicos en este tipo de estudios.

LA INDUCCIÓN DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y SU EMPLEO EN EL ESTUDIO DE EVENTOS DEL CICLO PROLIFERATIVO (The induction of multinucleated cells and its usefulness in the study of events in the proliferative cycle).

Siménez-Martín, G. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, 28006-Madrid, España.

La inducción experimental de células homocarióticas poliploides 8n en *Allium cepa* L. puede llevarse a cabo por inhibición de dos citocinesis sucesivas. Así se pueden formar células binucleadas (4n-4n), trinucleadas (2n-4n-2n) o tetranucleadas (2n-2n-2n-2n), dependiendo de la proximidad de los grupos cromosómicos en metafase y de su inclusión o no en un único núcleo al cursar la telofase.

Si simultáneamente se emplea un agente multipolarizante, las células 8n pueden distribuir su genoma en varios núcleos de ploidías muy diferentes y decididamente aneuploides en su composición génica.

Tanto las primeras, homocarióticas, como las segundas, heteroploides y aneuploides, se han utilizado para determinar el grado de autonomía de cada núcleo en la replicación y culminación de las etapas interfásicas y mitóticas, así como el papel de ciertos cromosomas (como el cromosoma NDR) en dicha autonomía nuclear, proporcionando una metodología útil para la disección cromosómica del ciclo celular.

GENOMA Y REGULACION DE EVENTOS DEL CICLO CELULAR (Genome and regulation of events the cell cycle).

De la Torre, C., Sans, J., Merquidich, D., Salenti, N., González-Fernández, A., Giménez-Abian, M. y Alier, P. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España y Departamento Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La replicación secuencial del genoma permite alterar la funcionalidad de segmentos de éste por bromación durante fracciones del período S y posterior irradiación, en anoxia, de las células con su DNA parcialmente bromado.

Esta metodología ha permitido, en meristemas de la raíz de *Allium cepa* L., determinar el momento de replicación de secuencias del genoma relacionados con cada uno de los cuatro puntos de transición (TPs) donde se requiere síntesis de proteínas para la progresión de la célula a etapas más avanzadas de su ciclo celular. La replicación de las secuencias implicadas en los dos TPs para síntesis de proteínas situadas en el temprano y tardío G1 están en el temprano y tardío S respectivamente. Las secuencias implicadas en el TP situado en G2 lo hacen en el centro del S, mientras que secuencias dispersas por todo el genoma parecen ser responsables del TP situado en profase.

METILACION DEL DNA Y EVENTOS RELACIONADOS CON DIFERENCIACION Y DIVISION CELULAR. (DNA methylation and events related to cell differentiation and cell division). Sans, J., Leyton, C. and Merquidich, D. Departamento Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha postulado que la metilación de citosina en secuencias dinucleotídicas C-G del DNA, sería un mecanismo mediante el cual se controlaría la expresión génica. Se ha comprobado, en una gran variedad de células, que la administración de 5-azacitidina (5-AzaC), análogo de la citidina, y poderoso agente hipometilante del DNA, produce activación génica.

En nuestro laboratorio, con el fin de asociar, desde un punto de vista morfológico, sectores del genoma con eventos celulares involucrados con el proceso de división o diferenciación celular hemos usado como estrategia experimental el efecto hipometilante del DNA DE 5-AzaC en raíces de *Allium cepa* L.

Nuestros resultados muestran que la administración de 5-AzaC provoca: a) un aumento significativo en la elongación celular que ocurre en la zona de diferenciación de la raíz, b) una aceleración de la reorganización nucleolar que se lleva a cabo al final de la mitosis y c) una alteración en el grado de condensación de la cromatina durante la mitosis. Los dos últimos eventos son particularmente evidentes cuando el análogo se administra durante la primera mitad del período replicativo.

Estos resultados sugerirían que los eventos estudiados estarían controlados por genes cuya expresión se regularía por el grado de metilación del DNA. (Proyecto FONDECYT 894812).

EXPRESION DE GENES DE RESISTENCIA AL ESTRES TERMICO EN DOS ARBOLES NATIVOS DE CHILE, *Araucaria araucana* y *Prosopis chilensis*. (Gene expression of resistance to heat shock in two native trees of Chile, *Araucaria araucana* and *Prosopis chilensis*). Cardemil, L. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Araucaria araucana constituye bosques relictuales templados de alta montaña en la Región Austral de Chile, donde existen diferencias de temperatura entre día y noche y entre estaciones de 20°C. *Prosopis chilensis* en cambio, es una leguminosa, fijadora de nitrógeno de la región árida y semi árida del Norte y Centro de Chile. En estas regiones la temperatura llega a más de 60°C en los días de Verano.

Membrado investigado como las semillas y plántulas de estos dos árboles responden a una exposición a altas temperatura, a través de experimentos de estrés térmico y como las semillas y plántulas adquieren termotolerancia, cuando son expuestas a temperaturas subletales.

En verdad, el principal objetivo de esta investigación es probar la hipótesis de que "Árboles nativos están adaptados a su medio natural porque ellos muestran un alto grado de expresión de los genes de resistencia para soportar condiciones extremas ambientales. El alto grado de expresión puede deberse ya sea a mecanismos de regulación de la función del gen, o a un mayor número de copia de los genes de resistencia".

Electroforesis en poliacrilamida SDS, de las proteínas sintetizadas durante el estrés de temperatura y en presencia de S-metionina, como también hibridación Northern usando dos sondas de proteínas de estrés térmico, nos ha permitido evaluar esta hipótesis. PROYECTO FONDECYT, 0160/89; AID GRANT# DPE-5542-G-SS-8073-00; PROYECTO de Desarrollo, Universidad de Chile # 178501-4.