

147

EFFECTOS GENOTOXICOS DEL PENTACLOROFENOL. (Genetics effects of Pentachlorophenol). Cofré, S.<sup>1</sup>, Fernández, J.<sup>1</sup>, Lafuente, N.<sup>2</sup> y Zamorano-Ponce, E.<sup>1</sup>  
Laboratorio de Citogenética, Universidad del Bío-Bío, Casilla 447, Chillán; Laboratorio de Citogenética Experimental, Universidad de Chile, Santiago.

El Pentaclorofenol, es un biocida organoclorado de múltiples aplicaciones y como consecuencia de ello empleado en gran parte del mundo. Desde el año 1906, en que el Bechold y Erlich demostraron las propiedades tóxicas de esta substancia, se han publicado numerosas investigaciones sobre su toxicidad y metabolismo de la misma. Sin embargo, existe en la actualidad información aislada respecto de su probable efecto sobre el genoma en sistemas animales. En este estudio se realizó una evaluación de su acción antimutagénica, mediante el ensayo de micronúcleo en eritrocitos policromáticos (EPCs) de ratón. Se emplearon 98 ratones de la cepa CF1 (Mus musculus), de ambos sexos. 50 de éstos fueron utilizados en determinar la dosis letal cincuenta a siete días (DL 50/7); y los 48 restantes fueron separados en 6 grupos mixtos (8 ratones cada uno) con el fin de evaluar la cinética de inducción de micronúcleos para PCF. A cuatro de ellos se le suministró PCF (44 mg/kg de peso corporal, 80% DL 50/7), disuelto en aceite de maíz (AM). Un grupo se inoculó sólo con AM (control negativo) y otro con metilmetanosulfonato disuelto en AM (control positivo). Los 4 grupos tratados con PCF fueron sacrificados a las 24-30-48 y 72 h. post-tratamiento y los controles a las 30 h. El recuento de EPCs micronucleados (EPCsM) se hizo contando 1000 EPCs. Se analizó, además, la razón entre el número de eritrocitos maduros (EMs) presentes entre 200 EPCs para evaluar la citotoxicidad. La DL 50/7 fue establecida en 55 mg/kg. p.c. Los resultados muestran una disminución significativa en el No. de EPCsM a las 24-48 y 72 h. y un aumento no significativo a las 30 h. en relación al control negativo. El análisis de las razones entre EPCs/EMs sugiere que el PCF no es citotóxico.

148

ELECTROFORESIS DE PROTEINAS TOTALES Y CITOGENETICA EN TRES ESPECIES DE Phycella (Amaryllidaceae). (Total proteins electrophoresis and cytogenetics of three species of phycella (Amaryllidaceae)).

Zepeda, S., C. Palma-Rojas y N. González, Departamento Biología y Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena.

Estudios previos han mostrado que Phycella scarlatina (2n=32) sería en alotetraploide originado probablemente de los ancestros de las actuales formas diploides Phycella ignea (2n=16) y Phycella sp (2n=16). Con el objeto de establecer nuevas relaciones de similitud y contrastarlas con la información citogenética y morfológica disponible se describen y comparan para estas especies, los patrones electroforéticos de proteínas solubles de migración aniónica en presencia y ausencia de SDS.

Utilizando sobrenadantes de homogeneizados obtenidos de bulbos, en buffer a pH 8., se realizó electroforesis en geles de Poliácrilamida en miniplagas con y sin SDS, basados en las técnicas de Laemmli (1970) y Davis (1964), respectivamente. Con las movibilidades electroforéticas de las bandas se construyó un dendrograma utilizando una matriz de datos elaborada en base a los índices de similitud calculados según Jaccard.

Las relaciones de similitud muestran que P. sp se separa de P. scarlatina y P. ignea, las cuales aparecen más cercanas entre sí.

Los resultados obtenidos difieren de los datos citogenéticos, pero concuerdan con los de morfología floral. Esto podría sugerir, que para estos caracteres, en P. scarlatina se expresarían preferentemente genes originarios del ancestro de P. ignea, por sobre aquellos provenientes del ancestro de P. sp.

## BIOLOGIA CELULAR

149

ANTIGENOS PEROXISOMALES EN CELULAS DE LA LINEA ESPERMATOGENICA DE HAMSTER (Peroxisomal Antigens in Hamster Spermatogenic Cells) Hidalgo, U., Kawada, M.E. Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile (Patrocinio: M.J. Santos)

Los peroxisomas son organelos subcelulares que participan en vías metabólicas esenciales, tales como la B-oxidación de los ácidos grasos, la síntesis de los plasmalógenos. Dado que las proteínas peroxisomales destinadas a la matriz y a la membrana del organelo, se sintetizan en ribosomas libres y son incorporadas postraduccionalmente al organelo, se ha postulado que los peroxisomas se originarían por división de organelos preexistentes, de un modo similar a lo que ocurre en mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, a diferencia de ellos, los peroxisomas no poseen DNA ni una doble membrana. Esta hipótesis biogénica supone que los peroxisomas se encontrarían presentes en espermatozoides, en huevos o en ambos.

No existen datos que muestren la existencia de peroxisomas en células gaméticas. Como primera aproximación a este problema, hemos iniciado la caracterización de peroxisomas en células de la línea espermatogénica de hamster. Utilizando técnicas de fraccionamiento subcelular e inmunofluorescencia indirecta hemos detectado la presencia de proteínas peroxisomales en estas células.

Financiado por Proyecto DIUC 89/8E

150

AISLAMIENTO DE PEROXISOMAS DE HIGADO HUMANO (Isolation of human liver peroxisomes). Alvarez, A., Couve, A. y Santos, M.J. Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Los peroxisomas son organelos subcelulares que cumplen roles metabólicos esenciales. Participan en la B-oxidación de ácidos grasos, en la síntesis de los plasmalógenos, en la síntesis de los ácidos biliares, etc. Los componentes proteicos peroxisomales se sintetizan en ribosomas libres y son incorporados al organelo en forma postraduccional. Por esto, se ha postulado que los peroxisomas se originarían de organelos preexistentes. Recientemente, se han descrito una serie de afecciones genéticas humanas que afectan el ensamblaje del organelo. El fenotipo molecular de estas mutaciones es desconocido.

Con el objeto de conocer la estructura y composición de los peroxisomas humanos, para compararlos posteriormente con los peroxisomas mutantes, se optimizó un protocolo de purificación de peroxisomas provenientes de biopsias quirúrgicas de hígado humano, en gradiente isopícnico de Nycodenz. Se obtuvieron membranas de los peroxisomas purificados, que se utilizaron como mezcla antigénica para producir anticuerpos policlonales en conejo. Estos anticuerpos permitirán la caracterización de las diferentes proteínas de la membrana peroxisomal en condiciones normales y patológicas.

Financiado Proyecto FONDECYT 718/90

151

DETECCION DE LA ACTIVIDAD SECRETORA DE TESTOSTERONA EN CELULAS DE LEYDIG INDIVIDUALES. (Detection of testosterone secretory activity from individual Leydig cells). Inostroza, H. y Pino, A.M. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: M. Perretta).

La célula de Leydig es el tipo celular testicular responsable de la función hormonal esteroidea; dicha actividad es regulada por los niveles circulantes de LH. Se ha propuesto que factores locales también influyen para determinar la heterogeneidad morfológica y funcional observada. Nos interesó estudiar si existe también heterogeneidad en la secreción de andrógenos. Para esto empleamos el ensayo de placa hemolítica reversa, como fue descrito por Neill y Frawley (Endocrinology, 112:1135, 1983), que permite detectar la secreción individual de productos metabólicos. Se usó una mezcla de concentraciones definidas de células de Leydig purificadas desde testículos de ratas maduras y eritrocitos de oveja cubiertos con proteína A. La mezcla se coincubió en cámaras especiales por tiempos convenientes en presencia de hCG, suero antitestosterona y/o medio M-199 según corresponda. Las células se tiñieron para la actividad 3 $\beta$ -Hidroxi-esteroide deshidrogenasa. Los resultados muestran que: 1.- Entre un 60-70% de las células purificadas disponen de la batería enzimática para producir esteroides; 2.- Que un 50% de estas células secretan testosterona; 3.- La secreción de testosterona es dependiente del tiempo y de la dosis de hCG, y 4.- No ocurre reacción en ausencia del antisuero o complemento, demostrándose la especificidad de la reacción. Se concluye que una población de células de Leydig purificadas tienen actividades esteroideogénicas y secretoras diferenciales.

Financiado por FONDECYT, Proyecto 973/88.

152

RECEPTORES PARA <sup>125</sup>I-MELATONINA EN CELULAS DE LEYDIG DE RATAS. (<sup>125</sup>I-Melatonin receptors in rat Leydig cells). Vera, H.\* y Moraga, P. Unidad de Biología de la Reproducción, INTA, Universidad de Chile. (Patrocinio: Dr. L. Valladares).

Es conocido que la melatonina altera la función reproductiva en los mamíferos. Previamente nosotros hemos demostrado que melatonina inhibe la función esteroideogénica testicular. En este estudio ampliamos esos resultados al demostrar la existencia de receptores específicos para melatonina en tejido intersticial. La obtención de tejido intersticial y células de Leydig purificadas se realizó con tratamiento con colagenasa en ratas prepúberes, las incubaciones se realizaron en presencia de melatonina <sup>125</sup>I a 0°C. Una rápida unión se alcanzó entre los 10-15 min. con un máximo a los 30 min.

Estudios de saturación demostraron que melatonina <sup>125</sup>I se unifica a un solo sitio de unión con una Kd de 20 pM y número de sitios unión de 3.55 x 10<sup>-12</sup> moléculas / 10<sup>6</sup> células. La especificidad quedó demostrada en experimentos de competición con melatonina, serotonina y N-acetil-serotonina donde se observó una disminución en la unión de melatonina marcada. En conclusión, por primera vez se detectan receptores para melatonina en tejido gonadal.

\* Becario FUNDACION ANDES  
Proyecto financiado por FONDECYT 1024-89.

153

DESENSIBILIZACION DE CELULAS DE LEYDIG. ACTIVIDAD METILTRANSFERASA DE FOSFOLIPIDOS (FMT). (Leydig cell desensitization. Phospholipid Methyltransferase Activity) Ronco, A.M. y Valladares, L.E. Universidad de Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) Santiago, Chile.

Las células de Leydig provenientes de animales tratados con una dosis única farmacológica de LH/hCG se desensibilizan, es decir pierden su capacidad de sintetizar testosterona. Estudios nuestros han demostrado que en este fenómeno no sólo está comprometido el número de receptores, la vía esteroideogénica y la síntesis de RNA sino que también la metilación de fosfolípidos. En este trabajo se estudió la actividad enzimática de la FMT en células de Leydig de ratas adultas y ratas desensibilizadas con una dosis única suprafisiológica de hCG (100 U.I.). Las células de Leydig fueron purificadas en un gradiente continuo de Percoll (10-80 %) y congeladas en N<sub>2</sub> líquido para su posterior determinación enzimática. Esta se determinó incubando el extracto celular en presencia de 3H-S adenosil metionina (3H-SAM) por 30 min. a 37°C. Posteriormente la fracción lipídica fue extraída con solvente orgánico y determinada la radiactividad presente en la fracción. Nuestros resultados indican una menor actividad FMT a los 3 días después de la inyección de hCG hecho que coincide con la internalización de los receptores para LH. Se observa una recuperación de la actividad enzimática a los 6 días de iniciado el tratamiento cuando comienza la recuperación de los receptores para LH.

Estos resultados avalan nuestra hipótesis que la desensibilización es un fenómeno muy amplio que involucra una alteración de numerosos procesos metabólicos.

Financiado por Universidad de Chile B-2531 y Fondecyt 1024-89.

154

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA DE LA MUCOSA DE LA MOLLEJA EN AVES. (Comparative study of the avian gizzard mucosa). Núñez, P., Cambiazo, V., Villavicencio, M. y Ponce, C. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, y Facultad de Medicina Sur, Universidad de Chile. (Patrocinio: J. Garrido). La resistencia a la abrasión mecánica que posee la mucosa de la molleja en la aves depende de la presencia e integridad de una capa superficial de material amorfo que se origina por la secreción de sus glándulas. Dicha capa superficial, en el género *Gallus* está mayoritariamente compuesta por una glicoproteína de ~28kD, que hemos purificado parcialmente, produciendo luego anticuerpos policlonales dirigidos contra ella. Hemos empleado estos anticuerpos para detectar la presencia de epitopos comunes mediante inmunoblots realizados sobre extractos preparados de las capas superficiales de las mucosas de mollejas de representantes de varios géneros de Aves. Al mismo tiempo hemos estudiado la estructura de las mucosas con técnicas de rutina y mediante inmunocitoquímica. Nuestros resultados muestran un patrón estructural semejante en la conformación de las mucosas y también en la relación entre la mucosa y su secreción. Sin embargo, sólo algunas de entre las secreciones estudiadas poseen reactividad cruzada con el anticuerpo dirigido contra la glicoproteína de *Gallus*. Se analizan estos resultados en función de la organización general de la mucosa estudiada. (Financiado por Proyectos FONDECYT 346/88 y 528/89).

155

MECANISMOS DE CITOPROTECCION GASTRICA EN LA RATA. (Gastric cytoprotection in the rat). Garrido, J., Messen, L., y Gálvez, M. Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

A lo largo del proceso denominado citoprotección gástrica se ponen en juego múltiples y diversos mecanismos que protegen la integridad de la mucosa gástrica amenazada por noxas que forman parte de los alimentos ingeridos. Con el propósito de analizar mejor estos mecanismos, hemos desarrollado un modelo de cultivo organotípico de estómago de rata en el que, por las condiciones definidas del cultivo, los parámetros de tipo sistémico resultan más controlables. En este modelo, que consiste en cultivar explantes de mucosa gástrica de rata adulta sobre un sustrato de celulosa mantenido en la interfase medio de cultivo/atmósfera, hemos observado cambios en la forma y en la ubicación de las células del epitelio de revestimiento que resultan análogos a los descritos por otros autores luego de aplicación de noxas standard (etanol 100% o agua a 100 ° C) a estómagos de rata intactos *in situ* (Ito & Lacey, *Gastroenterology* 88:250,1985). En este sistema hemos intervenido sobre el metabolismo de las prostaglandinas ya sea estableciendo condiciones de inhibición de su síntesis o bien aumentando las concentraciones disponibles en el medio por adición exógena; los resultados hasta ahora obtenidos confirman la participación de prostaglandinas en la citoprotección, apoyando así el valor de este modelo para el estudio de la génesis de las ulceraciones de la mucosa digestiva. (Financiado por Proyecto FONDECYT 528/89).

157

INDUCCION DE SECRECION EN AUSENCIA DE CRECIMIENTO HIPERTROFICO EN GLANDULA PAROTIDA DE RATON (Induction of secretion in the absence of hypertrophic growth in mouse parotid gland). Peña y Lillo, S. y González, M.J. Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El crecimiento hipertrofico de las glándulas parótidas de ratón puede ser inducido mediante la administración crónica de una serie de catecolaminas sintéticas. La mayor parte de estos agonistas ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  o  $\beta_1\beta_2$ -adrenérgicos) son además secretagogos efectivos cuando se administran por primera vez. Con el objeto de determinar si la capacidad secretagoga e inductora de crecimiento están relacionadas, se analizó la respuesta secretoria de las glándulas parótidas durante la administración crónica de un agonista  $\beta_1$ -adrenérgico (dobutamina),  $\beta_2$ -adrenérgico (salbutamol) o  $\beta_1\beta_2$ -adrenérgico (isoproterenol). Estos tres agonistas, administrados en dosis equivalentes (40  $\mu$ g/ g peso corporal), fueron potentes secretagogos. respuesta definida por la notable disminución en el contenido de  $\alpha$ -amilasa o de polipéptidos secretorios de la glándula normal. La actividad total de  $\alpha$ -amilasa presente en estas glándulas disminuyó progresivamente en el transcurso de la administración crónica de dobutamina e isoproterenol y no fue significativamente alterada cuando el agonista fue salbutamol. Bajo estas condiciones de estimulación, isoproterenol y dobutamina provocaron crecimiento hipertrofico mientras que salbutamol no produjo este efecto. La respuesta secretoria de glándulas parótidas tratadas diariamente con cada uno de los agonistas mencionados se mantuvo inalterada al cabo de 7 días. Estos resultados sugieren que la hiperactividad secretoria producida por agonistas  $\beta_1$  o  $\beta_2$  adrenérgicos no es suficiente para la producción de crecimiento hipertrofico. Esta última respuesta parece más vinculada a la mediación de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos. PROYECTO FONDECYT 0793/89

156

MECANISMOS CELULARES DE LA SECRECION VESICULADA DE LIPIDOS BILIARES. (Cellular mechanisms involved in vesicular biliary lipid secretion). Garrido, J.A., Covarrubias, C. y Nervi, F. Departamentos de Gastroenterología, Facultad de Medicina y de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

El colesterol biliar se encuentra normalmente solubilizado en liposomas unilamelares de lecitina y en micelas mixtas con lecitina y sales biliares. El mecanismo responsable de la secreción se desconoce aun cuando el origen de los lípidos biliares se ha asignado al retículo endoplásmico (RE). El objetivo de este trabajo fue estudiar las interrelaciones morfo-funcionales de la secreción de lípidos a la bilis en condiciones de proliferación del RE liso provocada por simvastatin, un inhibidor de la HMGCoA reductasa, enzima reguladora de la síntesis de colesterol. Al administrar 20 mg de simvastatin y 0,5 mg de diosgenina/100 g de alimento molido por 4-7 días, se produjo un aumento > 300% en la secreción biliar de colesterol y > 200% en la de fosfolípidos. En la bilis recolectada de estos animales se demostró que > 60% del colesterol biliar se encuentra en la fracción vesicular. El examen ultraestructural mostró la presencia en la luz de los canalículos biliares de numerosas vesículas, las que en algunos casos forman acúmulos. En el citoplasma de los hepatocitos se observa una importante proliferación del RE liso, el que se presenta ordenado y ocupa extensas zonas en forma exclusiva. Esta evidencia apoya la relación entre RE liso y secreción vesiculada de lípidos biliares. (Financiado por Proyectos FONDECYT 53/89, 833/90 y 528/89).

158

5-AZACITIDINA (5-AZAC) ESTIMULA LA DIFERENCIACION CELULAR POR HIPOMETILACION DEL DNA, EN RAICES DE A. cepa L. (5-AzaC stimulate cell differentiation by DNA hypomethylation in A. cepa L. roots). Merquidich, D.; Ferrada, D. y Sans, J. Dpto. Biol. Cel. y Gen. Fac. de Medicina, Universidad de Chile.

El crecimiento radicular esta sustentado por la proliferación celular que ocurre en la zona meristemática y elongación celular (diferenciación) que ocurre en la zona de maduración de la raíz. En estudios previos, hemos visto, que tratamientos con 5-AzaC (análogo de la citidina) incrementa el crecimiento radicular, debido fundamentalmente a una estimulación del proceso de elongación celular.

En el presente trabajo, se estudia si este fenómeno provocado por 5-AzaC se correlaciona, por una parte, con hipometilación del DNA y por otra, con cambios en la actividad transcripcional, traduccional y metabólica de estas células. Con este fin, se estudió mediante HPLC el contenido de citosina y 5 metil citosina en el DNA, como así también, la incorporación de uridina y leucina  $^3$ H, y consumo de oxígeno, en la zona madura de la raíz, después de distintos tratamientos con el análogo.

Los resultados muestran que en el DNA extraído de la zona madura de la raíz, presenta metilado el 70% de los residuos de citosina. 5-AzaC provoca una disminución del contenido de 5 metil citosina, que fluctúa entre 8 y 64%, dependiendo de la concentración del análogo utilizada. Por otro lado, el análogo estimula significativamente la incorporación de uridina y leucina  $^3$ H, sin que se observen cambios significativos en el consumo de oxígeno, en esta zona de la raíz, después de 96 hrs de tratamiento.

En conclusión, los resultados sugieren que 5-AzaC estimularia el proceso de diferenciación celular, en raíces de A. cepa L., por hipometilación del DNA.

Proyecto FONDECYT 89/812

159

DEFICIENCIA DE LA ACTIVIDAD CITOLITICA NATURAL (NK) EN PACIENTES CON SEPSIS. (Deficiency in natural killer cell activity in patients with sepsis). Carvajal, T.<sup>1</sup>, Miranda, D.<sup>1</sup>, Gaggero, A.<sup>2</sup>, Sepúlveda, C.<sup>3</sup>, Puente, J.<sup>1</sup> Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Quím. y Farmacéuticas<sup>1</sup>; Depto. Microbiología<sup>2</sup> y Lab. Inmunología Hospital Clínico<sup>3</sup>, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: M.A. Valenzuela).

No hay muchos estudios relacionados entre respuesta inmune y sepsis, aún cuando se ha observado una inmunodepresión general en este estado. En el presente trabajo se ha estudiado la actividad citolítica natural (ACNK) de individuos normales y de pacientes con sepsis de diferente origen, abordándose además la acción *in vitro* de diferentes activadores de la citolisis: ionóforos de calcio (Io), ésteres de forbol (TPA)  $\alpha$ -interferón ( $\alpha$ -IFN) y  $\beta$ -endorfina (BE).

Se utilizaron linfocitos sanguíneos periféricos como células efectoras y células K-562 marcadas con <sup>51</sup>-Cr como células blanco. En el caso de la acción de los activadores de la citolisis Io (10<sup>-7</sup> - 10<sup>-6</sup> M); TPA (5-200 ng/ml); IFN (600-6000 UI); y BE (10<sup>-8</sup> - 10<sup>-12</sup> M), las células efectoras se pre-incubaron por 30 min a 2 h y posteriormente se efectúa el ensayo de citolisis.

De acuerdo a nuestros resultados, la ACNK en sepsis disminuye significativamente y sólo es estimulada parcialmente *in vitro* por la acción conjunta de Io + TPA o por  $\alpha$ -IFN, alcanzando en ambos casos aproximadamente un 30% de la respuesta observada en las muestras normales con estos mismos activadores. B.E. no tuvo efecto en las muestras patológicas. La baja ACNK observada en la sepsis y el hecho que no pueda restaurarse la actividad normal con los activadores estudiados, se enmarca dentro de la inmunodepresión propuesta para diversas condiciones extremas como trauma, shock y sepsis.

Proyecto Fondecyt 90-1115

161

EFFECTO DE EXTRACTOS HIPOTALAMICOS EN LA CAPACIDAD RESTAURADORA DE MEDULA OSEA EN RATONES IRRADIADOS. (Effect of hypothalamic extracts on the restoring capacity of bone marrow cells in irradiated mice). Barria Miguel, Marianela Mena, Patricio Esquivel. Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

En el último tiempo nuestro laboratorio ha estado analizando el efecto que extractos hipotalámicos (EH) tienen sobre la respuesta autoinmune a tiroglobulina (Tg). Ahora presentamos el efecto de EH sobre células de médula ósea, usada como población restauradora y su acción en la respuesta a Tg.

Ratones RK jóvenes fueron irradiados letalmente, repoblados con médula ósea singeneica incubada o no *in vitro* con EH de ratón e inyectados a diferentes tiempos con EH singeneica, para luego ser inmunizados con Tg + LPS y la respuesta medida en las semanas siguientes.

Los resultados demuestran que la administración de EH es capaz de recuperar en mejor forma la respuesta cuando se administra 14 días después. Por otra parte, la preincubación con EH de las células de médula usadas en la repoblación y luego tratados como en el caso anterior, produce una importante depresión de la respuesta cuando se inyecta 7 días después de la irradiación.

Los resultados se discuten en relación al rol de los factores hipotalámicos en la diferenciación de células de médula ósea.

(Proyectos FONDECYT 89-71 y UACH S-88-35).

160

EVOLUCION DE SUBPOBLACIONES DE CELULAS ACINARES DE GLANDULAS PAROTIDAS DE RATON DURANTE EL CRECIMIENTO ESTIMULADO POR ISOPROTERENOL (Evolution of acinar cell subpopulations along the isoproterenol-induced growth in mouse parotid glands) Alliende, C., Diaz, H. y Lopez Solís, R.O. Dpto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

La administración crónica diaria de isoproterenol provoca proliferación celular y crecimiento hipertrófico durante los primeros 5 días y luego sólo crecimiento hipertrófico en las células acinares de las glándulas parótidas de ratón. Entre estas células es posible distinguir células mononucleadas 2C, mononucleadas 4C y binucleadas 2C. En el presente estudio se analizó la evolución de estas subpoblaciones y el tamaño de las células acinares correspondientes durante la administración crónica de isoproterenol. Las células acinares fueron tipificadas mediante morfometría (tamaño celular) y citofluorometría de proteínas (sulfoflavina) y DNA (Faulgen).

En el periodo de estudio, las células acinares incrementaron constante y notablemente su tamaño, presentando una gran varianza en esta respuesta. Los tamaños de las células acinares mononucleadas y de las binucleadas, semejantes entre sí, se incrementaron evidentemente sólo hasta la quinta estimulación. La varianza en ambos casos también fue alta. La subpoblación de células mononucleadas disminuyó y la subpoblación de células binucleadas aumentó significativamente durante el tratamiento. Subgrupadas de acuerdo al contenido de DNA nuclear, la subpoblación de células acinares mononucleadas 2C disminuyó progresivamente hasta la décima estimulación. La frecuencia de células binucleadas 2C disminuyó inicialmente, recuperando y superando su frecuencia original después del quinto día. La subpoblación de células mononucleadas 4C se duplicó en los primeros 3 días, estabilizándose en ese nivel. Subpoblaciones de células binucleadas 4C aparecieron e incrementaron progresivamente a partir de la primera estimulación, células mononucleadas 8C a partir de la tercera estimulación y células binucleadas con núcleos 8C en la décima estimulación. Un diagrama de flujo sugiere que en la hipertrofia de las glándulas parótidas, las células acinares evolucionan a través de la secuencia mononucleadas 2C, binucleadas 2C, mononucleadas 4C, binucleadas 4C, mononucleadas 8C y binucleadas 8C. De éstas, las subpoblaciones mononucleadas 2C, mononucleadas 4C y binucleadas 2C experimentan sólo ligeros aumentos en el contenido total de proteínas, mientras que este parámetro de tamaño celular se incrementa notablemente en las subpoblaciones de células binucleadas 4C y mononucleadas 8C.

PROYECTO FONDECYT 0793 / 89

162

LOCALIZACION INTRANUCLEAR DE COMPLEJOS REPLICATIVOS Y DEL ANTIGENO TUMORAL MAYOR EN CELULAS TRANSFORMADAS POR SV40. (Intranuclear location of replicative domains and large tumor antigen in SV40-transformed cells). Perez, I.; Ordóñez, G.E.; Sanhueza, L. y Santos, M. Depto. de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las células transformadas por SV40 expresan el antígeno tumoral mayor (ag-T), de origen viral, que se ubica mayoritariamente en el núcleo celular. Se ha demostrado previamente que la distribución intranuclear del ag-T se modifica según el estado proliferativo de las células, lo que muy probablemente se relaciona con la(s) función(es) que el ag-T podría estar cumpliendo en cada caso particular. Así, se ha postulado que esta proteína viral podría participar en la replicación del DNA celular, lo que haría esperable encontrar que al menos una subpoblación del ag-T se encuentre localizada en los sitios de síntesis de DNA. La existencia de tal co-localización puede ser investigada citoquímicamente, dando un pulso con bromodeoxiuridina (BrdU) a las células en cultivo y luego detectando, por inmunofluorescencia doble indirecta, la distribución intranuclear del ag-T y de los sitios de incorporación de la BrdU en las mismas células. Este tipo de análisis se realizó en células en cultivos asincrónicos y en células sincronizadas con afidicolina (inhibidor de la DNA polimerasa alfa). Se estableció la dosis y tiempo de tratamiento óptimos para una inhibición máxima y reversible de la síntesis de DNA. Las células reinician la replicación del DNA una vez eliminada la droga del medio de cultivo. Un 95% se encuentra en etapa S a las 2 h y en etapa G2 a las 6 h de recuperación. Las zonas de incorporación de BrdU por lo general coinciden con zonas en que el ag-T está presente. Una fracción de células en etapa S presentan una co-localización total de ambos. Así, se confirma lo esperado y se sustancia la probable participación del ag-T en la síntesis de DNA y tal vez en el control de la proliferación de las células transformadas por SV40.

FINANCIADO POR : PROYECTO FONDECYT 1183/90.

163

ROL DE LA PKC Y PKA EN MUERTE PROGRAMADA DE TIMOCITOS. (Rol of PKC and PKA in thymocytes programmed death). Maldonado, C., Ojeda, F., Guarda, M.I., Folch, H. Instituto de Física, Facultad de Ciencias e Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

La apoptosis o "muerte programada" permite en el timo la selección de clones autoreactivos. La apoptosis es un proceso metabólicamente activo que requiere de síntesis de proteína, elevación del calcio intracelular, activación de una endonucleasa y la fragmentación de ADN nuclear. Se ha postulado que la apoptosis en el caso de los linfocitos está asociada con la estimulación incompleta o desbalanceada de segundos mensajeros.

En este trabajo se estudia la posible participación de proteína quinasa en la apoptosis inducida en timocitos, tratados o no con inhibidores de PK. Timocitos de ratón se suspendieron en solución de Hank con 0,2 % de BSA ( $10^6$  cel/ml). Las suspensiones celulares fueron alternativamente irradiadas, tratadas con hidrocortisona o sin tratamiento adicional e incubadas 6 h a  $37^\circ\text{C}$  para permitir la evolución de apoptosis. Durante la incubación se usaron los inhibidores de PK H-7 y HA-1004. Terminada la incubación, el ADN de las células se marcó con naranja de acridina, y el contenido de ADN en los núcleos se determinó por citofluorimetría de flujo.

Los resultados demuestran que el proceso de apoptosis inducido tanto por irradiación como por hidrocortisona puede ser inhibido por H-7, que inhibe preferentemente la PKC y no así por HA-1004, inhibidor de la PK dependiente de c-AMP, lo que sugiere que la PKC juega un rol importante en estos procesos.

Financiado por Proy. FONDECYT 89-0074, DID-UACH 5-89-9 y CITZ, RFA 782503.3-01.300.

165

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL CARTILAGO EN EL PROCESO OSTEOARTRITICO. (Extracellular components of osteoarthritic cartilage). González, E., Adames, H. y Frelles, F. Departamento de Cs. Biológicas Animales, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Chile.

Colágeno tipo II y proteoglicanos (PG) son las macromoléculas cuantitativamente más importantes de la matriz extracelular (MEC) de los tejidos articulares; de estos últimos, el cartilago es uno de los más afectados en la osteoartritis, considerada como un proceso degradativo. En la Medicina Veterinaria se presenta esta patología, especialmente en los equinos fina sangre de carrera, como consecuencia del trauma continuo en las articulaciones móviles de las extremidades. A fin de caracterizar los eventos moleculares asociados a la degradación de la MEC del cartilago se ha analizado el colágeno y los glicosaminoglicanos (GAG's) de los PG, de cartilago proveniente de articulaciones normales y osteoarthriticas obtenidas de equinos de matadero.

En el cartilago se caracterizó la integridad estructural del colágeno a través de la reacción con el MBTH (N-metil benzotiazolidon hidrazona) así como su grado de extracción con solventes no desnaturizantes. En los extractos se determinó proteínas por el método de Lowry y aldehídos como grupos químicos típicos del colágeno. Los GAG's se cuantificaron determinando el ácido urónico y se identificaron por su migración electroforética en acetato de celulosa.

El análisis comparativo entre los valores obtenidos con ambos cartilagos muestra que el colágeno se presenta alterado estructuralmente, a nivel de sus entrelazos, lo que posibilita una mayor extracción. Los GAG's corresponden a condroitín y keratán sulfato, observándose disminuidos alrededor del 40% en la osteoartritis.

Se discuten los resultados, representativos de un proceso degradativo, que debería reflejarse como productos en el líquido sinovial, abriendo así la posibilidad de un diagnóstico precoz de esta patología.

164

INTERACCIONES EPITELIO-MESENQUIMA DURANTE LA DIFERENCIACION DE GLANDULAS GASTRICAS DE AVE. (Epithelial-mesenchymal interactions during differentiation of avian gastric glands). Dabiké, M., Núñez, R., Belmar, M., Brandon, E. y cols. Dpto Biología Celular, Fac. Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

En glándulas gástricas de ave en desarrollo se estudiarán las relaciones entre modificaciones en el grado de diferenciación de los tubos glandulares, organización del mesénquima asociado a estos tubos, y los cambios de composición en la matriz extracelular que los rodea. La asociación entre los esbozos glandulares y las células del mesénquima, durante el desarrollo, se estudió por microscopía de luz y electrónica; las modificaciones de los componentes de la matriz extracelular mediante técnicas histoquímicas para polisacáridos e inmunocitoquímicas para fibronectina y laminina. A partir del día 8 los esbozos glandulares se asocian estrechamente a una corona de células mesenquimáticas que se mantiene durante el desarrollo. La matriz extracelular rica en ácido hialurónico hasta el día 14, modifica su composición molecular hacia el día 18, hecho que se manifiesta en una reacción positiva intensa para polisacáridos ricos en grupos OH vecinales, similar a la del adulto. A partir de los 14 días la célula oxintica presenta una inmunorreactividad granular débil para laminina en el citoplasma apical e infranuclear. La lámina basal se ve discontinua. La fibronectina delimita el borde basal del epitelio con reacción positiva en elementos del conjunto interglandular. En glándulas más desarrolladas la reacción apical granular para laminina se acentúa, la reacción infranuclear desaparece y la lámina basal se hace continua, con una distribución equivalente a la del adulto. La fibronectina muestra una inmunorreactividad más intensa, sin modificar su distribución. Esto difiere con el adulto en que la reactividad para fibronectina hacia la base de los tubos glandulares es débil.

Se concluye que hacia el día 18 de desarrollo prenatal el patrón de los componentes del mesénquima asociados a los tubos en diferenciación, se asemejan a los de la glándula del adulto. Financiado: Proyecto FONDECYT 769/90.

166

ESTUDIO DEL RECEPTOR DE FIBRINOGENO EN PLAQUETAS HUMANAS MEDIANTE EL ANTICUERPO MONOCLONAL 3C10 (Human platelets fibrinogen receptor characterization using the monoclonal antibody 3C10). Aranda, L.A.\*, Pereira, J.\*\*., Mezzano, D.\*\*., y De Ioannes, A.E.\*. \*Unidad de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas; \*\*Banco de Sangre, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile.

El receptor (rcp) de fibrinógeno en plaquetas humanas lo constituye un dominio del complejo formado por las glicoproteínas de membrana IIb y IIIa. La formación del complejo y su función como rcp son dependientes de calcio, pero para su expresión se requiere la activación plaquetaria por algún agonista, como por ejemplo ADP.

Desarrollamos un anticuerpo monoclonal (AMC) 3C10 de isotipo IgG2a, y demostramos, por medio de bioensayo de agregación, ELISA de competencia, columna de afinidad Sefarosa-4B-AMC-3C10 y radioinmuno-electroforesis cruzada (CRIE), que su epitopo es el rcp de fibrinógeno en plaquetas humanas.

Con el AMC 3C10 marcado con  $^{125}\text{I}$  hicimos estudios de unión a plaquetas humanas lavadas en condiciones de activación y de no activación.

Nuestros resultados preliminares muestran que: (a) la unión máxima del AMC se establece a los dos minutos y se mantiene estable por lo menos 90 minutos (cinética); (b) la saturación se alcanza con  $5 \mu\text{g/ml}$  del AMC 3C10 marcado (isoterma y gráfico de Klotz); (c) por análisis de Scatchard determinamos un  $B_{\text{max}}$  de aproximadamente 28.000 sitios por plaqueta y un  $K_d$  de aproximadamente 11 nM.

Se debe hacer notar además que la unión del AMC marcado se puede desplazar con 50 veces más AMC frío, y que la unión del anticuerpo es igual en plaquetas activadas que sin activar.

Hemos analizado un paciente con Trombastenia de Glanzmann, enfermedad en la cual las plaquetas carecen del complejo GP IIb/IIIa sobre su membrana, y la unión del AMC 3C10 es igual a la unión no específica con exceso de AMC frío.

Aunque aún falta por caracterizar la unión del AMC 3C10 en su dependencia del calcio, de la temperatura y de otros agonistas de agregación, contamos con una herramienta de diagnóstico y de estudio, que tiene grandes potencialidades.

Financiado parcialmente por FONDECYT y P.U. Católica.

167

CITODIFERENCIACION DE CELULAS OXINTICAS DURANTE LA MORFOGENESIS DE GLANDULAS GASTRICAS DE AVE. (Cytodifferentiation of oxyntic cells during avian gastric glands morphogenesis). Koenig, C., Munizaga, A. y cols. Depto. Biol. Celular, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Para analizar cómo ocurre la expresión fenotípica de la célula oxintico-péptica, secretora de HCl y pepsinógeno gástrico, se estudiará la citodiferenciación de las células oxinticas de ave durante la morfogénesis embrionaria de las glándulas gástricas.

Se usarán embriones de 10, 14, 18, y 20 días y pollitos de 1 día de edad. Se analizarán los cambios en: forma celular; organización del citoesqueleto de actina; y expresión de 3 marcadores funcionales de estas células: mitocondrias, sistema de membranas que contiene la bomba de protones gástrica; y producción de pepsinógeno. El proceso de citodiferenciación se analizará por: cuantificación bioquímica de marcadores enzimáticos: Mg-ATPasa, K-NPPasa, citocromo-oxidasa y pepsinógeno; tinción histoquímica para estos marcadores y para microfilamentos de actina; y análisis de la ultraestructura de las células en diferenciación al microscopio electrónico.

Los primeros signos de diferenciación son la formación de un polo luminal prominente y la expresión de Mg-ATPasa y citocromo-oxidasa, concentradas en el polo luminal de las células. Hacia el día 14, el citoesqueleto de actina delimita los bordes laterales de las células y se concentra en el polo luminal; y la actividad K-NPPasa se detecta en el borde luminal de las células de los túbulos glandulares secundarios. Hacia el día 18, las células oxinticas presentan un sistema tubular bien desarrollado, con alta actividad del Mg-ATPasa y K-NPPasa y se ha establecido la síntesis de pepsinógeno. Estas características se mantienen hasta el nacimiento, similares a la célula oxintica diferenciada.

Se concluye que los factores que modulan la expresión de los caracteres fenotípicos básicos que definen a la célula oxintica operan entre los días 8 a 18 de vida fetal.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 769/90.

168

ESTUDIO DEL CITOESQUELETO ECTOPLASMICO EN HUEVOS DE LA SANGUIJUELA *T. ruda*, MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y BARRIDO CONFOCAL (Study of the ectoplasmic cytoskeleton in eggs of the leech *T. ruda*, as revealed by fluorescence and scanning confocal microscopy). Fernández, J., Stuart, D., Olsa, N. y Téllez, V. Fac. Ciencias, U. de Chile y Dept. Mol. and Cell Biol. UC, Berkeley, USA.

La redistribución de organelos ectoplasmicos en el huevo indiviso de sanguijuela conduce al establecimiento de 2 prominentes dominios citoplasmáticos polares, o teloplasmas, que son más tarde utilizados en la construcción de células blasticas ecto y mesodérmicas. El proceso de segregación ooplásmica se acompaña de ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos (mts) y del reordenamiento de una red de actina (ac). El conocimiento detallado de como se forman los teloplasmas, y sus relaciones con el citoesqueleto, permitirá comprender mejor el acentuado mosaicismo del embrión de sanguijuela. Los mts de huevos completos fueron revelados por inmunofluorescencia y los filamentos de ac mediante rodamina-faloidina. Se construyeron proyecciones del citoesqueleto y análogos de imágenes estereoscópicas a partir de series focales. La distribución de mitocondrias (mit) se estudió en huevos vivos cargados con rodamina 123. Numerosos manojos de mts ectoplasmicos se dirigen desde el ecuador hacia cada uno de los polos del huevo, formando una capa superficial y otra profunda. Entre estas capas se encuentra ac, mit y una delicada red de mts. Hacia el final de la primera interfase han desaparecido la mayoría de los mts, mientras la red de ac se ha congregado en los teloplasmas animal y vegetal. Los resultados indican que los mts probablemente juegan un papel fundamental en la diferenciación del huevo a lo largo del eje animal-vegetal. Cada hemisferio ovular parece incluir dominios independientes de citoesqueleto, que asegurarían la segregación bipolar de organelos. La retención de extensos dominios de citoesqueleto de ac en los teloplasmas podría relacionarse con el anclaje de determinantes morfogénéticos. (Financiado por FONDECYT, proyecto 89-1128)

169

PROTEINA RELACIONADA CON TAU MEDIA LA INTERACCION ENTRE MICROTUBULOS Y FILAMENTOS DE ACTINA EN CELULAS TUMORALES. (A "tau-like" protein mediates the interaction between microtubules and actin filaments in tumor cell lines). Cross, D. 1, Martínez, J. 2 y Maccioni, R. B. 1 ICC, Casilla 70111, Santiago 7, 2INTA Universidad de Chile.

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la interacción entre tubulina y MAPs tiene un rol regulatorio. Usando anticuerpos monoclonales y policlonales de naturaleza idiótípica y anti-idiótípica, obtenidos por inmunización con péptidos sintéticos de la región C-terminal de  $\beta$ -tubulina, hemos determinado los dominios de interacción de MAPs en la tubulina y su rol regulatorio. Mediante inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección ("western blots") con el monoclonal anti-idiótípico MTB6.22 que reacciona con MAP-2 y Tau, hemos analizado preparaciones de citoesqueleto de diferentes células tumorales. En todos los casos se observa que el anticuerpo reconoce un conjunto de proteínas de 55-68 Kd, las cuales comparten características similares a las Tau de bovino. Tanto Tau como las proteínas de células tumorales son marcadas de la misma forma por MTB6.22. Estas proteínas son fácilmente liberadas del pellet resultante de la extracción de citoesqueleto al agregar 5 mM  $Ca^{2+}$ . Las microfotografías de inmunofluorescencia muestran una co-localización de fibras de actina visualizadas por doble tinción con "phalloidina"-rodamina y las proteínas reconocidas por MTB6.22. Estas últimas muestran un patrón de localización discontinuado en la red de filamentos de actina. Los datos sugieren fuertemente que estas proteínas de 55-68 KDa interconectan microtúbulos con filamentos de actina. Estos estudios abren nuevas vías hacia la comprensión *in vivo* de la función de Tau y componentes análogos. (Financiado por Council for Tobacco Research, USA, CONYCI-Chile y NATO).

170

EFFECTO DE LA DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LOS MICROTUBULOS AXONALES (Effects of dihydrotestosterone upon axonal microtubules). José Manuel López. Unidad de Neurobiología Molecul-Tar. P. Universidad Católica. (Patrocinio: Jaime Alvarez).

En el nervio periférico, los microtúbulos axonales son regulados por claves locales, probablemente dependiente de la célula de Schwann. En general, los andrógenos tienen efectos anabólicos que son mediados por el DNA. Aplicamos localmente dihidrotestosterona para estudiar un posible efecto indirecto de la célula de Schwann sobre el axón.

Alrededor de nervios surales de rata se implantó un manguito de silicona de 4 mm de longitud cargado con la hormona. Los nervios se estudiaron 7 días más tarde con el microscopio electrónico.

La apariencia del tejido era normal tanto al microscopio de luz como electrónico. El estudio morfométrico reveló que los axones amielínicos tenían un calibre discretamente disminuido, que el contenido microtubular estaba aumentado, y que la densidad era el doble que axones normales de igual calibre.

Concluimos que el citoesqueleto del axón es afectado por la dihidrotestosterona. Proponemos que el efecto es indirecto, puesto que el blanco de la hormona, el DNA, existe en la célula de Schwann pero no en el axón.