

9

INHIBICION DEL TRANSPORTE DE SODIO POR PENTACLOROFENOL EN UN EPITELIO TRANSPORTADOR DE IONES. (Inhibition of the sodium transport in an ion transport epithelium by pentachlorophenol). Quevedo, L., Montoya, G., Alarcón, J.M. Depto. de Ciencias Fisiológicas, Fac. Cs. Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

El pentaclorofenol o el pentaclorofenato de Na (PCF) es un agente químico usado ampliamente en Chile como pesticida para impregnar maderas de exportación. Es altamente tóxico, tanto para organismos acuáticos y terrestres como para el hombre. Con el objeto de contribuir al conocimiento del mecanismo de acción, se estudió la acción del PCF sobre un epitelio transportador de iones, usando como modelo experimental la piel de batracio. La cuantificación del transporte activo de iones se realiza midiendo la diferencia de potencial (Dp) y la corriente de cortocircuito (CCC) a través de la piel aislada del abdomen de *Pleurodema thaul*. La piel es montada en una cámara de lucita tipo Ussing, bañada en ambos lados con solución Ringer, pH 7,50. La Dp y la CCC se registra con electrodos de Ag-AgCl conectados a un registrador Cole-Parmer. Se utiliza el test de Isaacson que permite calcular la conductancia activa y el potencial de Na (ENa). Además se mide el consumo de oxígeno polarográficamente. Se demuestra que PCF mucosal a concentraciones molares de $3 \times 10^{-6}M$ a $4.3 \times 10^{-5}M$, produce un efecto inhibitorio dosis-dependiente de CCC y Dp y disminución de la conductancia activa y del ENa. El consumo de oxígeno (QO_2) de la piel aumenta en forma altamente significativa. La disminución de la CCC, la Dp y la disminución del ENa permiten concluir que el PCF inhibe el transporte activo de Na^+ en piel de batracio. Estos resultados unidos al aumento del QO_2 , permiten postular que el bloqueo del transporte de Na^+ se genera por disminución del aporte de ATP, provocado por el bloqueo de la fosforilación oxidativa.

Financiado por Proyecto FONDECYT 89-0625.

FISIOLOGIA Y NEUROBIOLOGIA

10

EFFECTOS ESTRUCTURALES DE LA CLORTETRACICLINA. HCl EN BICAPAS LIPIDICAS. (Structural effects of chlortetracycline.HCl on phospholipid bilayers). Suwalsky, M., Sánchez, I., Neira, F. y Saavedra, L. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

La clortetraciclina (CTC) es un antibiótico que presenta la característica de ser anfifílica dado a que posee grupos hidrofílicos unidos a los anillos hidrofóbicos. Estos compuestos son capaces de alterar la forma de los glóbulos rojos. En efecto, se ha informado que la CTC.HCl a través de interacciones con Ca^{2+} transforma células crenadas (equinocitos) en estomatocitos, posiblemente debido a una expansión de la monocapa interna de los eritrocitos en relación a la monocapa externa.

En el presente estudio, CTC.HCl se hizo interactuar en diferentes concentraciones molares con dos tipos de multibicapas. Una estaba constituida por la dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMFE) y la otra por dimiristoilfosfatidilcolina (DMFC), fosfolípidos que se ubican respectivamente en la monocapa interna y externa de la membrana de eritrocitos. Las muestras, recristalizadas de $CHCl_3:CH_3OH$ 3:1, se analizaron por difracción de rayos X a $17^\circ C$, en presencia y ausencia de agua. Los resultados obtenidos indicaron que en ausencia de Ca^{2+} la CTC.HCl produce perturbaciones estructurales significativas en las bicapas de DMFC siendo los efectos más moderados en la DMFE. Estos resultados se comparan con aquellos obtenidos de la tetraciclina.HCl en similares condiciones experimentales.

Financiamiento: Proyecto FONDECYT (0783/88) y de la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción (20.13.79).

11

EFFECTOS DE UN ANTIPSICOTICO (CLORPROMAZINA) SOBRE EPITELIO DE PIEL DE SAPO.

(An antipsychotic effect (Chlorpromazine) on the toad skin epithelia), (*) ALBORNOZ, J., CONCHA, J. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La piel abdominal de *Pleurodema thaul* semeja mucho a la existente a nivel de los túbulos renales del ser humano, entre otras características, por ser también un epitelio de alta resistencia, hecho que ha permitido utilizarla como modelo en el estudio de la acción de hormonas, drogas, neurotransmisores, etc.

Clorpromazina (CPZ) es derivado de las fenotiazinas ampliamente utilizada en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas. Al administrar CPZ, $10^{-5} M$ a la solución que baña la piel abdominal aislada de *P. thaul* se genera un aumento en la diferencia de potencial transepitelial (D.P.) y corriente de corto circuito (C.C.C.). El aumento de ambos parámetros no corresponde a una liberación de Noradrenalina de las terminaciones adrenérgicas de la piel inducida por CPZ, hecho que es constatado al bloquear los receptores adrenérgicos con Propanolol $10^{-6} M$ y Dibenamina $10^{-6} M$, ya que ambas no modifican el efecto de CPZ. La droga, CPZ, provoca una disminución en la acción estimulante de Noradrenalina $10^{-6} M$ y Angiotensina II $10^{-6} M$. Situación que puede responder a una inhibición de la calmodulina por acción de la CPZ. Al aplicar $BaCl_2$ (2 mM) y Amilorida ($10^{-4} M$) a los medios serosal y mucosal respectivamente causan una inhibición en el efecto de CPZ, esto sugiere que la droga actúa preferentemente aumentando la permeabilidad del epitelio a los iones Na^+ a nivel de la membrana apical y a los iones K^+ sobre la membrana basolateral.

(*) Proyecto 20.33.30 D.I.

12

INHIBICION DEL TRANSPORTE DE COLINA EN ERITROCITOS POR ANESTESICOS LOCALES. (Inhibition of choline transport in erythrocytes by local anesthetics). Angelo, S., Arévalo, L. y Devés, R. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El mecanismo a través del cual los anestésicos ejercen su efecto farmacológico es materia de controversia. La correlación entre la liposolubilidad y la potencia de estas drogas ha orientado la investigación hacia el estudio de la perturbación de las propiedades físicas de la bicapa, sin embargo, es posible que los anestésicos interfieran con la función de las proteínas de membrana a través de una interacción directa. Sólo un estudio detallado del mecanismo de inhibición de proteínas funcionales localizadas en la membrana puede resolver este problema.

En este trabajo se caracterizó cinéticamente la inhibición del transporte de colina en eritrocitos por anestésicos locales (lidocaína, procaína, tetracaína, clorpromazina, proclonina). Los cinco anestésicos inhiben el transporte en el mismo rango de concentración en que ejercen su efecto anestésico y compiten en su unión tanto con el sustrato colina como con el inhibidor competitivo decametanio. El efecto de los anestésicos es asimétrico y todos inhiben preferencialmente al transportador cuando su sitio de ligamen está expuesto al exterior (la afinidad por la conformación externa del transportador es 4-7 veces mayor que la afinidad por la conformación interna). Para resolver este problema hemos aplicado un método cinético nuevo que consiste en determinar el efecto de un inhibidor en la "razón de flujos" del sustrato (la razón entre el flujo de salida de sustrato radiactivo medido en condiciones control y en presencia de sustrato no radiactivo en el medio externo). El efecto del pH en la inhibición demuestra que la forma activa de la droga es la forma cargada. Esta conclusión se hace aparente sólo después de considerar que el pH también altera la distribución del transportador entre sus dos estados conformacionales afectando así indirectamente el acceso de la droga al transportador. Nuestras observaciones son consistentes con un efecto directo de los anestésicos locales sobre el transportador.

(Proyectos DTI B2674, FONDECYT 156/89).

14

EFFECTO DE INSULINA EN LOS FLUJOS DE POTASIO EN COLON (Effect of insulin on potassium fluxes in the colon). Jusakos, J. y Goecke, I. A. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: F. Orrego).

Es conocido el hecho que el colon desempeña un rol en la homeostasis del potasio. Dado que la insulina favorece la entrada de potasio en células simétricas, se decidió estudiar su efecto en un tejido epitelial. Con este objeto se midieron los flujos de potasio, empleando ^{86}Rb como trazador, en mucosa de colon distal de ratas machos. El tejido mucoso se montó en una cámara de Ussing, modificada con termoregulación a 37°C , empleándose una solución de Krebs Ringer Bicarbonato y burbujeo de 95% O_2 /5% CO_2 . Los resultados mostraron un flujo unidireccional de potasio (Seroso-Mucosa) de $0,68 \pm 0,40 \mu\text{eq K/cm}^2/\text{hr}$ el que fue inhibido parcialmente por ouabaina (10^{-3}M , lado seroso) a valores de $0,47 \pm 0,27 \mu\text{eq K/cm}^2/\text{hr}$. La adición de insulina (100 mU/ml) en el lado seroso produjo un aumento significativo del flujo de potasio alcanzando valores de $1,51 \pm 0,25$, este efecto de la insulina en el transporte de potasio probablemente se debe a un efecto estimulador de la actividad Na, K-ATPase dado que en experimentos preliminares se encontró que dicho estímulo desaparece en presencia de ouabaina. Estos hallazgos abren la posibilidad que la insulina participe en el balance externo de potasio.

(Proyecto Fondecyt 0154/88).

13

CARACTERISTICAS DEL TRANSPORTE DE L-FENILALANINA A TRAVES DEL BORDE BASOLATERAL DE GLANDULAS OXINTICAS AISLADAS. (L-phenylalanine transport characteristics through the basolateral membrane of oxyntic isolated glands). Medina, Y., Sobrevía, L., y Bravo, J. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile.

Estudios previos (1) revelaron que en la interfase sangre-tejido del estómago operan sistemas de transporte similares a los que existen en células no-epiteliales. Posteriormente se demostró que sistemas tipo A y L (2) están presentes en la superficie basolateral de glándulas oxínticas aisladas. En este trabajo se informa sobre la cinética del transporte y la relativa especificidad del sistema involucrado en la captación de L-fenilalanina en glándulas oxínticas aisladas del conejo.

Las glándulas aisladas por digestión de la mucosa con colagenasa, siguiendo la técnica descrita por Berglund y Öbrini: (Acta Physiol Scand. 96: 150-159, 1976), fueron incubadas (37°C) con L-fenilalanina- ^3H ($\text{Phe-}^3\text{H}$) durante 15, 30, 60, y 300 segundos, para medir la fracción de ^3H captado por las células en el hidrolizado glandular (HNO_3 , 20%, 75°).

La captación inicial de $\text{Phe-}^3\text{H}$ medida en un medio con Na^+ [$226 \pm 0,6 \text{ pmol (mg} \times 30 \text{ seg}^{-1})$] no fue diferente de la obtenida en un medio carente de Na^+ [$2,18 \pm 0,61 \text{ pmol (mg} \times 30 \text{ seg}^{-1})$]. Tal similitud de valores se observó también cuando la captación fue medida en presencia de L-fenilalanina no marcada (1, 2, 5, 10, y 50 mM). La curva del influjo calculado para las diferentes concentraciones del amonóxido mostró un componente principal saturable ($K_t = 2,63 \text{ mM}$; $V_{\text{max}} = 3,35 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$) y otro, no-saturable, probablemente de difusión simple. Además, se observó inhibición recíproca entre Phe y Leu, pero no hubo interacción apreciable entre Phe y aminoácidos neutros de cadena lateral corta.

Los resultados indican que a nivel de la membrana basolateral glandular oxíntica, la Phe es transportada mediante un sistema Na^+ -independiente tipo L y que una fracción considerable lo hace por simple difusión.

1. Bravo et al. Cell Mol Biol. 334: 323-336 (1988).

2. Bravo, J. y Sobrevía, L. Biochim. Biophys. Acta, en prensa.

Proyecto: Dirección de Investigación. U. de Concepción N° 20.33.38

15

ANALISIS MULTIVARIADO APLICADO A ESTUDIOS DE EQUILIBRIO HIDRICO EN LARVAS DE Bufo arenarum. (Multivariate analysis applied to the study tadpoles). Ferrari, L. y Lombardo, R. (1) Lab. de Ecofisiología, Depto. de Cs. Básicas, Univ. Nacional de Luján. (2) Depto. de Biología, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, Univ. de Buenos Aires. (P. Dr. A. Salibián). Las modificaciones de los contenidos de agua de animales sometidos a stress osmótico, son el resultado de la respuesta de una serie de mecanismos metabólicos. Considerando a un organismo como una unidad integrada, donde los parámetros bajo estudio se encuentran interrelacionados en diferentes grados, es necesario considerar la interdependencia entre estos para no alterar la dimensionalidad de la variación. A tal efecto, se evaluaron los cambios del balance hídrico en larvas jóvenes de B. arenarum mediante MANOVA, comparaciones múltiples y análisis canónico discriminante. Los animales se expusieron a soluciones de elevada osmolaridad electrolítica hasta 270 mOsm , durante 160 hs con muestreo diario para cada solución, midiendo pesos húmedo y seco, contenido de agua y % de humedad. Del análisis efectuado se desprende que el principal parámetro de incidencia en la capacidad discriminante es el peso seco. Hay un período crítico de adaptación en las 24 hs iniciales y luego una tendencia compensatoria hacia las condiciones iniciales. La velocidad de compensación aumenta con la osmolaridad, pero cuando los valores de las larvas experimentales logran equipararse a los de control, sobreviene la muerte, en tanto que las larvas que se mantienen ligeramente distanciadas del control (70 mOsm) no muestran mortalidad. Se agradece al CONICET, a la CIC-Bs As y al Sr. R. Yoshihara.

16

ROL FISIOLOGICO DE LA TAURINA Y SUS DERIVADOS EN PROCESOS DE HIPOXIA Y REPERFUSION DE TEJIDOS. (Physiological role of taurine and its derivatives on tissue hypoxia-reperfusion process). Cañas, P.E., INTA, Universidad de Chile. Lab. Bioq. Farmacológica.

Con el objeto de estudiar el posible rol que tienen la taurina y sus derivados en procesos de hipoxia y posterior reperfusión de un tejido se propone un modelo que permita explicar la acción fisiológica de este aminoácido y sus derivados durante este proceso. El modelo basado en datos experimentales, propone que los derivados de la taurina, específicamente la hipotaurina, tienen una acción antioxidante durante el proceso de hipoxia y posterior reperfusión de un tejido. Además, durante este proceso se acumulan productos derivados de AMP, como xantina e hipoxantina, los que generarían la formación de radicales libres por la acción de xantina oxidasa. Esta enzima se generaría por el cambio de distribución de Ca⁺⁺ desde el espacio extracelular al intracelular, lo que provocaría un aumento de la actividad de proteasas dependientes de Ca⁺⁺. Esta acción produciría la formación de aminoácidos libres que se generarían por la acción de estas proteasas, las que provocarían la acumulación de intermediarios como los derivados de la taurina con capacidad antioxidante. La acción antioxidante de la taurina se ejercería por su rol modulador de los canales de calcio celular. Creemos, por lo tanto, que este modelo es especialmente útil para explicar la acción protectora ejercida por taurina y sus derivados en el cerebro y otros tejidos, durante estos procesos.

18

LA ENUCLEACION OCULAR (EO) CAMBIA LA VELOCIDAD DE MADURACION DE LA GLANDULA SUPRARRENAL FETAL EN LA OVEJA. (Ocular enucleation changes the speed of maturation of the fetal adrenal gland in sheep). Parraguez, VH; Garay, F; Riquelme, R; Llanos, AJ**. Lab. de Endocrinología, Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile; Lab. de Fisiol. y Fisiopat. del Desarrollo, Div. Cs. Médicas Oriente. Fac. de Medicina** y Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas*, Universidad de Chile.

En el feto ovino, los niveles de cortisol (F) aumentan con la edad gestacional (EG). Este aumento es responsable de la maduración de algunos órganos que permiten la adaptación del feto al ambiente extrauterino y gatilla el parto. En un trabajo previo, encontramos que fetos con EO bilateral presentan menos F plasmático que fetos controles, a los 135 días de EG. Con el objeto de determinar el efecto de la EO sobre el patrón de F plasmático desde los 135 días de EG hasta el parto, pusimos catéteres en la arteria y vena femoral en 8 fetos (4 controles y 4 con EO bilateral) entre los 115 y 125 días de EG. Tomamos muestras de sangre a las 0800 h y 2000 h, cada 4 días, hasta el día del parto, comenzando el día quinto después de la cirugía. Separamos el plasma y determinamos los niveles de F por RIA. Con los resultados obtenidos calculamos las ecuaciones de regresión para cada grupo:

Controles: $\ln F \text{ (ng/ml)} = (2.08 \times 10^{-3}) \text{ EG} - 0.89$

Enucleados: $\ln F \text{ (ng/ml)} = (5.54 \times 10^{-3}) \text{ EG} - 8.02$

Nuestros resultados indican que los fetos enucleados presentan un retardo en el aumento de F con la EG. Sin embargo, después de los 140 días de EG se alcanzan niveles de F similares a los del grupo control. Esto coincide con el hecho de que el parto no se retarda en los fetos enucleados. Estos datos sugieren que la percepción de la luz determina la velocidad de maduración de la secreción de F por la adrenal fetal al término de la gestación.

Financiado por Proyectos Fondecyt 0321/88, Rockefeller 88077 y 86/CHI/LID1.

17

CADMIO COMO AGENTE HIPERTENSOR. EFECTO SOBRE LA NATRIURESIS EN RATAS. (Cadmium as hypertensor agent. Effect on natriuresis in the rat). Peña, A., Iturri, S.J. y Beltrami, M. Depto. Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Universidad Metropolitana Cs.Educac.

Cadmio es un metal pesado capaz de inducir hipertensión en animales expuestos a concentraciones variables del ión. Posibles cambios en la homeostasis de electrolitos y agua podrían explicar el alza de la presión arterial inducida por Cd. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de Cd sobre la natriuresis y su relación con la hipertensión en ratas.

Ratas hembras adultas Sprague-Dawley con un peso promedio de 210 g se utilizaron en este estudio, separadas aleatoriamente en 4 grupos: control, Sham + Cd (2 μ moles en 0,1 ml de suero salino (s.s.) i.p., adrenalectomizadas (ADX) + s.s. (0,1 ml i.p.) y ADX + Cd (2 μ moles en 0,1 ml s.s. i.p. Se determinó presión arterial (PA) en la arteria caudal, utilizando un método indirecto, 48 hrs después de la inyección. El volumen sanguíneo se determinó a partir del volumen plasmático utilizando dilución de colorante (T-1824). Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ se midieron por fotometría de llama y Cl⁻ por titulación coulométrica.

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la PA sistólica final de un 20% para el grupo Sham + Cd y de un 11.4% para el grupo ADX + Cd con respecto al control. Además hay un aumento de la natriuresis equivalente a 12.3 veces (ADX + Cd) y 4.6 veces (ADX + s.s.) y una disminución del volumen sanguíneo en los grupos ADX con respecto al grupo control. Estos resultados parecen indicar la producción de daño renal por efecto del Cd.

19

PRESENCIA DE UNA SUBSTANCIA QUE ANTAGONIZA LA ACCION BIOLOGICA DE LH EN EL PLASMA DE MUJERES LACTANDO. (Presence of a substance which antagonizes the biological action of LH in lactating women plasma). Vergara, M., Salvatierra, A.M., Díaz, S., Serón-Ferré, M. Lab. Endocrinol.; F.CC.BB., P. U. Católica de Chile e Instituto Chileno de Medicina Reproductiva*.

Durante la lactancia, la mayoría de las mujeres presenta inhibición de la función ovárica que podría explicarse por una menor actividad gonadotrófica. Para estudiar la bioactividad de LH durante la lactancia, medimos LH bio e inunoreactiva en el plasma de 5 mujeres en amenorrea y lactancia exclusiva (22-62 días post parto) y en 6 mujeres no lactando durante la fase folicular del ciclo. La actividad biológica (LH-BIO) se midió por bioensayo en células de Leydig de ratón. La LH inunoreactiva (LH-I) se midió por RIA. Nuestros resultados fueron los siguientes ($\bar{X} \pm \text{SE}$, test de t):

	n	LH-BIO (UI/1)	LH-I (UI/1)	BIO/I
Lactancia	5	11.2 \pm 3.6	5.6 \pm 1.5	2.1 \pm 0.3
F.folicular	6	27.7 \pm 6.9	7.2 \pm 1.1	4.3 \pm 0.9
		p=0.028	ns	p=0.019

Debido a que en las mujeres lactando observamos una disminución en la concentración de LH bioactiva pero no en la medida por RIA, analizamos la posible existencia de un antagonista de la acción de LH. Para esto agregamos una concentración conocida de LH standard a 13 muestras de plasma de las 5 mujeres lactando y medimos la bioactividad con y sin LH standard. Observamos entre 12 y 72 % de inhibición de la actividad de la LH agregada en 10 de las muestras. Nuestros resultados demuestran que durante la lactancia la bioactividad de LH es menor que durante la fase folicular. Postulamos que esta disminución en la bioactividad se debe a la presencia de una sustancia que antagoniza la acción de LH.

Financiado por 86/CHI/LID y RF/GAPS 9008.

20

CALICREINA HIPOFISIARIA: LOCALIZACION CELULAR Y REGULACION (Pituitary kallikrein: Cellular localization and regulation). Roa, J., Loyarte, N. Laboratorio de Fisiología y Patología Celular, Unidad Regulación Neurohumoral, Fac. Cs. Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

La Callicreína tisular (EC 3.4.21.35) (CAL) es una proteasa de 38 Kd que es capaz de activar varios péptidos y enzimas. Se ha detectado actividad cinogenasa en extractos de hipófisis anterior de rata y la expresión del mRNA de CAL en este tejido. Usando una combinación de métodos de morfología convencional a nivel óptico y ultraestructural logramos demostrar la presencia de CAL colocalizada con PRL e identificamos algunos factores que regulan su presencia en estas células.

Para el estudio se utilizaron ratas hembras castradas tratadas con solventes, diferentes dosis de estrógeno (E_2) (5, 10, 50 ug/rata durante 10 días) o Haloperidol (H) (2.5 mg/kg durante 8 días) y una combinación de E_2 y H. Las hipófisis fueron procesadas para microscopía óptica y electrónica y la tinción inmunocitoquímica se realizó usando anticuerpos anticallcreína.

El análisis microscópico de las hipófisis tratadas con E_2 reveló un aumento dosis dependiente en la cantidad de CAL y en el número de células inmunoreactivas. Según el estudio morfométrico, con dosis de 5, 10 y 50 ug de E_2 contenían CAL el 37, 42 y 55% del total de las células, respectivamente. El bloqueo del receptor de dopamina con H potenció el efecto de las diferentes dosis de E_2 y, en ausencia de éste, contenían CAL solo el 16% de las células. Independientemente del tratamiento CAL estuvo restringida a los lactotrofos. El estudio con microscopía electrónica confirmó la distribución subcelular de CAL en el lactotrofo y demostró su presencia en los gránulos que contienen PRL. La actividad proteolítica de CAL, la colocalización celular y la presencia en los mismos gránulos que PRL sugieren una participación de esta enzima en el procesamiento intracelular de la hormona.

Financiado por Fondecyt 346/89 y 32/90.

22

ALTERACIONES HEPATICAS EN RATAS SOMETIDAS A SHOCK POR TORNIQUETE (Hepatic alterations in rats subjected to tourniquete shock). Maldonado, M., Ward, P.H., Günther, B., Vivaldi, E. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile.

A objeto de explicar la letalidad que se observa en animales sometidos a shock por torniquete, hace varios años comenzamos el estudio de posibles alteraciones bioquímicas producidas, como consecuencia de la aplicación de torniquetes, en órganos alejados de la zona injuriada. Hemos observado una disminución significativa del glutatión (GSH) hepático durante la permanencia de los torniquetes (5 hrs), que se acentúa luego de dos horas de perfusión de las extremidades.

En esta comunicación informamos acerca de la producción de malondialdehído (MDA) en estos mismos periodos, así como de la protección significativa que se observa en la caída de los niveles GSH al pretratar los animales con alopurinol (40 mg/Kg), o con una combinación de superóxido dismutasa (40 mg/Kg)—catalasa (20 mg/Kg)—DMSO (0.5 ml). Además, en ambos periodos se observa un aumento significativo de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina en la sangre de estos animales.

Estos resultados apoyan la tesis de la participación de los oxidantes derivados del oxígeno en el daño hepático que se observa en ratas sometidas a shock por torniquete.

Proyecto Fondecyt 89-695.

21

DESCRIPCION DE UNA CONDUCTANCIAS ANIONICA ACTIVADA POR TENSION (SA) EN CELULAS CON FIBROSIS QUISTICA (FQ) PANCREATICAS HUMANAS INMORTALIZADAS. (A stretch-activated (SA) anion selective channel in immortalized human pancreatic CF cells). Boulicourt, A., Hidalgo, J., Caviedes, R. y Stutzin, A. Departamento de Medicina Experimental y Departamento de Fisiología y Biofísica Facultad de Medicina Universidad de Chile, y Centro de Estudios Científicos de Santiago (CECS). (Patrocinio: G. Riquelme).

Se ha especulado que los canales iónicos activados por tensión (SA) pueden estar involucrados en la transducción mecánico-sensitiva y probablemente también en la regulación del balance de agua a través de las membranas. En consecuencia, hemos investigado la presencia de corrientes de canal único SA en células pancreáticas humanas immortalizadas normales y afectadas por fibrosis quística (FQ). Los resultados preliminares demuestran que las células epiteloides del páncreas exocrino humano afectadas por la FQ presentan un canal SA selectivo a aniones que es activo espontáneamente en la configuración de 'cell-attached'. La identificación positiva como canal aniónico se obtuvo en la configuración de 'inside-out'. La aplicación de pulsos de succión al parche de membrana entre 14 y 56 mmHg (equivalentes a diferencias osmóticas de 0.77 y 3.11 mosM, respectivamente) incrementó la probabilidad de apertura (Po) del canal. La Po era dependiente además del potencial de membrana; potenciales despolarizantes aumentaban la Po. La relación corriente-voltaje en salino normal simétrico mostraba una rectificación de salida. La conductancia del canal es de 87 pS y el potencial de inversión en 'cell-attached' era de -17 mV, cercano al potencial de equilibrio estimado del cloruro. La cinética del canal podía ser descrita por un modelo de tres estados, dos cerrados y uno abierto. Sólo la transición Cl-O era sensible a la succión. La frecuencia relativa de estos canales era 30% en las células FQ con un promedio de 3 canales por parche. El papel que esta conductancia puede tener en el contexto fisiopatológico de la FQ esta por demostrarse. Financiado por FONDECYT 0448-88 y Cystic Fibrosis Foundation (USA).

23

INFLUENCIA DEL SURFACTANTE PULMONAR SOBRE LA LIBERACION DE RADICAL SUPEROXIDO POR MACROFAGOS ALVEOLARES DE CONEJO. (Influence of lung surfactant on the release of superoxide radicals from rabbit alveolar macrophages). Aller, F., Díaz, P. y Qyarzón, M.J. Depto. Ciencias Preclínicas, Div. Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El macrófago alveolar (MA) es fundamental en los mecanismos defensivos del tracto respiratorio inferior. Mantiene un estrecho contacto con el surfactante pulmonar (SP), complejo lipoproteico, cuya función más conocida es disminuir la tensión superficial alveolar a bajos volúmenes.

A fin de estudiar el efecto del SP sobre la liberación de radical superóxido (RS) por MA de conejo, se incubó fracciones tensoactivas (P3 y P4) y fosfolípidos constituyentes del SP con MA en reposo o estimulados con zymosan opsonizado. Los MA y las fracciones del SP se obtuvieron por centrifugación diferencial del lavado broncoalveolar de conejo. La liberación de RS se determinó mediante espectrofotometría (550 nm) por la reducción del citocromo c.

La incubación de MA estimulados o en reposo con las fracciones P3 ó P4 (0.25 a 1 mg PL (fosfolípido)/ml) solo produjo inhibición significativa ($p < 0.01$) de la liberación de RS con 1 mg PL/ml en los MA estimulados. Este efecto se reprodujo al incubar MA estimulados en presencia de P3, reconstituida con PL aislados, pero carente de proteínas. La incubación de cada uno de los 4 PL predominantes en P3 con MA, demostró que sólo fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG) en concentración de 1 mg/ml disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) la liberación de RS.

Se concluye que el SP inhibe la liberación de RS por MA estimulados. Este efecto radica en PC y PG y podría proteger al pulmón al inhibir la liberación de RS por el MA en respuesta a diversas noxas.

(Proyectos FONDECYT: 387-88 y DTI: M-2709, U. Chile.)

24

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE TRES INHIBIDORES DE LA COLINESTERASA EN EL DESARROLLO DE GLANDULA MAMARIA DE RATA.

Cabello G., Quaa A., Vilaxa A., Hrepic N., Durán V. y Araya P. Depto. de Biología y Salud y Depto. de Química Facultad de Ciencias, Universidad de Tarapacá.

La glándula mamaria de rata crece por brotamiento de numerosos conductos terminados en una expansión (TEB) que llegan al máximo a los 21 días de edad y luego disminuyen hasta los 84 días por diferenciación a brotes alveolares (AB).

Cuando se administra DMBA (7,12 dimetilaminobenzeno (a)-antraceno) a ratas de 55 días, el número de TEB permanece más alto y son más grandes.

El sulfato de eserina, es un inhibidor de la colinesterasa, estimula la síntesis de ADN y aumenta el tamaño de la glándula submandibular de rata. Este estudio analiza el efecto de Eserina, Parathion y Malathion, que también son inhibidores de la colinesterasa, en el desarrollo de la glándula mamaria de rata.

15 horas después de la última inyección del tratamiento se extrajo suero para determinar la inhibición de la colinesterasa. Se extrajeron las glándulas y se procesaron para análisis "in-toto" y para histología.

Los resultados indican que tanto el sulfato de eserina como Parathion y Malathion, en dosis que provocan una inhibición de la colinesterasa del 50% aceleran el desarrollo de la glándula mamaria en ratas de 21 días y provocan un estancamiento del proceso de diferenciación de los brotes terminales, en ratas de 44 días de edad.

Financiamiento U. de Tarapacá.

26

EFFECTO DE LA CONCENTRACION Y TIEMPO DE INGESTA DE ACEITE DE ROSA MOSQUETA SOBRE LIPIDOS BILIARES EN RATA. (Effects of Rose Hip oil concentration and period of intake on biliary lipids in rats). González, I., Torres, M., Carreño, P. y Lutz, M. ¹Escuela de Medicina, ²Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. (Patrocinio: M. Roncagliolo).

Estudios epidemiológicos indican que la ingestión de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados promueve la colestiasis. El aceite de semilla de rosa mosqueta (*Rosa moschata* Mill) se caracteriza por poseer un elevado índice de poliinsaturación y constituye una fuente potencial de materia grasa alimentaria. En este estudio se evaluó el efecto de la concentración y el tiempo de ingesta de este aceite sobre la excreción de lípidos biliares. Ratas macho Sprague Dawley, de 90 ± 23 g de peso corporal se alimentaron con dietas semipurificadas al 5% ó 15% de aceite durante 15, 30, 45 ó 60 días (n=6). Al término de cada período se midió flujo biliar y concentración de lípidos biliares. La concentración de aceite en la dieta y el tiempo de ingesta no modificaron el flujo biliar en ninguno de los grupos experimentales. La concentración de ácidos biliares fue más baja con dietas elaboradas al 15% de aceite (p<0,05). El tiempo de ingesta disminuyó la concentración de colesterol, fosfolípidos y ácidos biliares con ambas dietas (p<0,001). La excreción de lípidos biliares no fue afectada por la concentración de aceite ingerido; sin embargo, se redujo al prolongarse el tratamiento con ambas dietas (p<0,001). Se concluye que al aumentar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados ingeridos no se incrementó la capacidad litogénica biliar. La concentración y excreción de lípidos biliares disminuyó con el tiempo de ingesta de aceite, manteniéndose inalterada la relación colesterol/fosfolípidos.

Financiamiento: FONDECYT Proy. 2025 y COESAM.

25

EFFECTOS DE LA CONCENTRACION Y DEL TIEMPO DE INGESTA DE ACEITE DE ROSA MOSQUETA EN LA FLUIDEZ Y ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE MEMBRANAS DE HEPATOCITOS Y ERITROCITOS DE RATAS. (Effects of rose hip oil concentration and time of dietary treatment in the fluidity and enzymes activities of rat hepatocytes and erythrocytes membranes). Montalari, Y., Valenzuela C.L. y Celedón, G. Depto. de Fisiología y Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso. (P: G. Farias).

Estudios anteriores indican que el aceite de rosa mosqueta (ARM) disminuye la fluidez de membranas de hepatocitos y de eritrocitos y, aumenta las actividades específicas de NaK ATPasa y de 5'nucleotidasa (5'Nu) en membranas de hepatocitos. En este trabajo se estudia, comparativamente con aceite de maíz (AM), como afecta el tiempo de ingesta y la concentración de ARM en los efectos descritos.

Se utilizaron ratas machos Sprague Dawley. Las concentraciones estudiadas fueron de 5 y 15% y los tiempos de ingesta de 14, 28, 42 y 56 días. Se observó que la fluidez (anisotropía de fluorescencia de DPH) de hepatocitos es menor para ARM al 15% (p<0.02). Ingestas de hasta 42 días de ambos aceites aumentan las actividades específicas de la NaK ATPasa (p<0.001) y de la 5'Nu (p<0.05) a tiempos mayores, ARM disminuye la actividad de la NaK ATPasa (p<0.001). ARM 15% aumenta la actividad de la 5'Nu (p<0.01); este aceite aumenta progresivamente esta actividad hasta los 42 días a diferencia de AM en que este aumento se observa entre 28 y 42 días (p<0.05). Ambos aceites disminuyen la fluidez de membranas de eritrocitos si se ingieren durante más de 28 días (p<0.01), siendo mayor esta disminución si las concentraciones son de 15% (p<0.001). Las concentraciones y el tipo de aceite no modificó la relación molar de colesterol/fosfolípidos en membranas de hepatocitos y eritrocitos. Estos resultados indican que, en general, los efectos de ARM distintos de AM se observan a concentraciones de 15% y requieren de un tiempo de ingesta de 42 días para su máximo efecto. (FONDECYT 2025/87 y COESAM)

27

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE HEXACHLAMYS EDULIS ("YVAHAI"). Hypoglycemic activity of *Hexachlamys edulis* ("Yvahaí") Rodríguez, J.A.; Loyola, J.L.; Schmeda-Hirschmann, S. Departamento de Ciencias Biológicas; Universidad de Talca.

Hexachlamys edulis (Berg) Kausel et Legr. ("Yvahaí") es un árbol de la familia Myrtaceae, empleado en medicina popular en Paraguay y NE de Argentina. Las hojas en decocción, se recomiendan para tratar diabetes y gota. El presente estudio se realizó para corroborar la supuesta actividad hipoglucemiante, de un extracto etanol:agua 7:3, de hojas de *H. edulis*, en ratas normoglicémicas y diabéticas por tratamiento con aloxano. Se determinó la toxicidad aguda y subaguda del extracto, por administración oral a ratas, hasta dosis de 5g de extracto/Kg peso. El extracto, administrado oralmente durante 7 días, en dosis de 100 mg/Kg peso, redujo significativamente la glicemia en animales normales (p<0.02) y diabéticos (p<0.05) ante un sobrecarga oral de glucosa (1.5 g glucosa/Kg. peso). El efecto máximo se observó entre las 1.5 y 2.5 h. de la sobrecarga de glucosa, en ratas normoglicémicas, y a la 1 h. en ratas diabéticas. Al tratarse ratas normoglicémicas con una dosis única de 500 mg extracto/Kg. 1h. antes de la sobrecarga de glucosa, se observó una reducción significativa (p<0.01) del porcentaje de glicemia inducida, comparado con los mismos animales tratados anteriormente con el vehículo (agar 0.25 %). El extracto no afectó la glicemia basal en animales normales. No se observó mortalidad ni daño aparente en las necropsias, en los ensayos de toxicidad aguda y subaguda, a dosis de hasta 5 g/Kg a +1 y +15 días de finalizar los experimentos.

Los resultados obtenidos validan el empleo de *H. edulis* para tratar diabetes en medicina popular. Los niveles de seguridad y la actividad biológica comprobadas ameritan mayores estudios, tendientes al aislamiento de los principios activos y la elucidación de sus mecanismos de acción.

Financiamiento: IFS 928-2 ; DIUT - Myrtaceae.

32

EFFECTO DIRECTO DEL ACETALDEHIDO SOBRE ACTIVIDAD RESPIRATORIA MITOCONDRIAL DE SNC. (Acetaldehyde direct effect on CNS⁺ mitochondrial respiratory activity). Egaña, E. & Ramirez, M.T. Universidad de Chile; Facultad de Medicina; Instituto de Medicina Experimental; Laboratorio de Neuroquímica - Santiago 7 - Chile. El metabolismo del etanol lleva a la formación de acetaldehído (ALCHO), compuesto muy tóxico y al que se atribuye implicancia en la signosintomatología de la intoxicación alcohólica. Se ha demostrado que el ALCHO está presente en SNC como resultado de varios procesos metabólicos. Basados en estos hechos y en hallazgos experimentales en ratas de generación alcohólica (Egaña et al. 1988), nos interesó conocer el efecto directo del ALCHO sobre el transporte mitocondrial e incorporación de Ca^{2+} en SNC. Ratas ♂ y ♀ albino Wistar; Normal (Control) y acetaldeshizadas; ratas sometidas a la inyección intraperitoneal (i.p.) 200 mg/Kg rata/24 h ALCHO, toda su vida (incluida preñez y lactancia en ♀) por 8 generaciones. Los adultos se sacrificaron y se obtuvo mitocondria de 5 áreas de SNC: corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo, cerebelo y mesencefalo. Transporte mitocondrial e influjo de Ca^{2+} estudiado en polarógrafo, con electrodo de oxígeno y selectivo de Ca^{2+} . Cámara de 4.5 ml a 25° C. Medio reaccional Böhme et al. modificado. Substratos Sitio I. Adición de 276 nmoles ADP para inducir ADP/O y pulsos sucesivos de Ca^{2+} hasta saturación mitocondrial. Se analizaron diversos parámetros y sus razones; respiración activada, fosforilación oxidativa, incorporación de Ca^{2+} , velocidad de incorporación de Ca^{2+} , etc. Los resultados demostraron que la administración i.p. diaria de ALCHO afecta los índices estudiados de SNC, comparados con normal. Esto indicaría que el ALCHO inyectado por vía i.p. llega a nivel de SNC alterando la disponibilidad de energía, los procesos de neurogénesis y conducción del impulso nervioso que son mediados parcialmente por Ca^{2+} .

34

EVOLUCION ESTRUCTURAL Y MICROSCOPICA INDUCIDA POR ESTIMULACION POLISENSORIAL.

Fernández V., Pascual R, Cortés P. y Adaro L. Dpto. Fisiología y Biofísica. Fac. Medicina, U. de Chile. U. Católica. Sede Maule.

Existen evidencias respecto a los efectos positivos de la estimulación sensorial sobre la estructura y electrofisiología cortical. La información disponible respecto a la influencia de la estimulación polisensorial sobre el desarrollo de la estructura corporal es escasa y relativamente desconocida. En el presente estudio se aplica estimulación sensorio-motora durante el curso temporal del periodo crítico. Los cambios de distribución y expansión dendrítica en la neocorteza fueron analizados por medio de la técnica de Golgi-Cox-Sholl que permite realizar estudios cuantitativos. La determinación de la ganancia de peso corporal se realizó mediante mediciones consecutivas en los días postnatales 4,7,10,13,16,19 y 21. Los resultados obtenidos demuestran que la estimulación polisensorial se expresa a nivel cerebral, incrementando la expansión territorial de los campos dendríticos y acelerando la maduración de los perfiles somáticos. Además, se observó que dicha estimulación produce una mayor ganancia de peso corporal. Niveles adecuados de estimulación sensorio-motriz incrementaron notablemente el desarrollo corporal y neuronal de los sujetos ($p < 0.01$, ANOVA-test). Estudios previos realizados en animales experimentales y seres humanos revelan que las modificaciones del peso corporal y desarrollo se correlacionan con efectos hormonales, así como con importantes cambios neuroquímicos en el entorno celular.

Proyecto FONDECYT 0185-88 y D.T.I. 2675-8935.

33

EFFECTO DIFERENCIAL DE MARCACION HISTOQUIMICA DE CITOCROMO OXIDASA EN CORTEZA CEREBRAL DE RATA, DURANTE LA MADURACION POST-NATAL. Ruiz G., Gorgollón P., Niklander G. Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso.

Mediante histoquímica de citocromo-oxidasa se estudiaron las modificaciones de la corteza cerebral en ratas, normales y deprivadas durante el desarrollo (7, 15, 30, 60 D.P.N.)

Los efectos de deprivación temprana por enucleación ocular, permitieron comprobar las variaciones de trazado histoquímico en las cortezas somato sensorial y visual a Microscopía Óptica-Electrónica. (M. Wong-Ryler 1987,88).

Este crítico período del desarrollo muestra una cierta plasticidad en la actividad neuronal. En animales deprivados se observa una disminución selectiva de reactividad en capas corticales de aferencias específicas. II, IV, VI.

Las imágenes ultraestructurales, ponen en evidencia alteraciones en mitocondrias de neuronas piramidales degenerativas, pero con crestas internas marcadas.

El trazado diferencial de actividad de capas corticales, con citocromo-oxidasa, solo se hace estable a los 30 D.P.N., y la intensidad de reacción continua en aumento, estabilizándose a 60 D.P.N.

Financiado: Fondos de Investigación. 13/90
Universidad de Valparaíso.

35

ACTIVIDAD NEURONAL PRETECTAL BILATERAL ASOCIADA CON MOVIMIENTOS OCULARES VERTICALES EN EL GATO. (Bilateral pretectal neuronal activity related to vertical eye movements in the cats). Claudio Infante y Juan Leiva. Departamento de Preclínicas, División Oriente, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La participación del Pretectum en funciones visuo-motoras ha sido ampliamente documentada sin embargo, electrofisiológicamente, su rol en los movimientos oculares verticales, es poco conocida.

Gatos adultos de ambos sexos, anestesiados con éter fueron intubados y sometidos a una sección del tronco del encéfalo por delante del Trigémino (preparación pretrigeminal). El registro de los movimientos oculares verticales se efectuó a través de electrodos ubicados en los cantos superior e inferior de la órbita. La actividad neuronal extracelular en ambos Pretectum, fue registrada a través de electrodos de Tg de 2-4 MΩ. Los registros oculográficos y de la actividad unitaria, fueron inscritos en forma continua en un electroencefalógrafo. Finalizado los experimentos, la ubicación de los electrodos, se determinó histológicamente.

Se registró un total de 25 pares de unidades oculomotoras; en 14 pares sus frecuencias de descarga neuronal estaban inversamente relacionadas, mientras que en 11 pares, las unidades presentaron un comportamiento neuronal sinérgico diferente, aumentando y/o disminuyendo su frecuencia. De éstos, 6 pares aumentaron su frecuencia frente a movimientos hacia abajo; 3 pares aumentaron su frecuencia frente a movimientos hacia arriba y 2 pares, aumentaron y disminuyeron su frecuencia frente a movimientos verticales en ambas direcciones.

La existencia de un funcionamiento bilateral en ambos Pretectum asociada con movimientos oculares verticales, apoya nuestra hipótesis de una interacción interhemisférica en la generación de los movimientos oculares.

36

SUEÑO ACTIVO Y REGULACION HOMEOSTATICA DE LA ESTRUCTURA DEL CICLO SUEÑO-VIGILIA. (Active sleep and homeostatic regulation of sleep-wake cycle). Ocampo, A., Wynneken, U. y Vivaldi, E.A. Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se analizó la estructura del ciclo sueño-vigilia en seis ratas considerando tres días consecutivos de cada una. Durante el registro en ciclo luz-oscuridad 12:12, un sistema computarizado detectaba y cuantificaba los elementos relevantes del CSV (actividad delta y sigma cortical, theta hipocámpal y electromiográfica) y los almacenaba en matrices de bins de quince segundos, las que posteriormente se reducían adjudicando cada bin a un estado: sueño activo (SA), sueño quieto (SQ) o vigilia (VG). Se definió como un ciclo de SA la alternancia de un episodio de SA de al menos .75 minutos precedido y seguido por intervalo sin SA mayor de 2.5 y menor de 25.0 minutos.

Se detectaron 446 ciclos, o 24.7 ciclos/día (rango por rata 18-33). Un 81% de los episodios ocurrió en la fase de luz. La duración promedio de los episodios fue de 2.4 minutos (rango 2.1-3.0) y la de los intervalos de 11.7 minutos (rango 10.2-13.2). Hay una distribución de duraciones de episodios bimodal con máximas en 0.75 y 2.5 minutos.

La correlación entre la duración de cada episodio de SA y la duración del intervalo previo es de 0.052 ($p < 0.2$), mientras que con el siguiente es de 0.240 ($p < 0.001$). Esta última era altamente significativa en cuatro ratas consideradas individualmente. Al correlacionar separadamente por duración de SQ y VG al interior del intervalo anterior y siguiente, la variable crítica para la correlación era duración de SQ en intervalo siguiente. En ratas individuales la correlación entre duración de episodio de SA y duración de SQ en intervalo siguiente podía alcanzar un coeficiente de 0.5. Las correlaciones también se cumplían al interior de las dos fases de la distribución de episodios de SA mencionadas (duración menor o mayor de 1.5 minutos).

Estos resultados sugieren que en la regulación de la estructura del CSV, la duración de un episodio de SA es independiente del intervalo sin SA previo, pero ella determina permisivamente el intervalo que el animal podrá permanecer sin un nuevo episodio de SA.

Proyecto FONDECYT 966-90.

38

TRASTORNOS DEL EEG Y SUEÑO EN RATAS MUTANTES NEUROLOGICAS (taiep) CON EPISODIOS DE INMOVILIDAD: UN MODELO DE NARCOLEPSIA-CATALEPSIA. (Sleep and EEG disturbances in a rat neurological mutant (taiep) with immobility episodes: a model of narcolepsy-cataplexy). Prieto, G.J., Urbá-Holmgren, R., y Holmgren, E. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Instituto de Ciencias, Universidad Autónoma de Puebla, México.

Se estudiaron los patrones electroencefalográficos del sueño de ratas mutantes neurológicas (taiep), durante periodos cortos de 3 horas. Esta rata exhibe, entre otros síntomas, episodios de inmovilidad que son similares a los observados en narcolepsia. Describimos hallazgos de estudios electroencefalográficos prolongados en 9 ratas mutantes y 5 controles. Las ratas mutantes presentan trastornos EEGráficos y conductuales que consisten en: a) trenes de ondas corticales sincrónicas (6 a 7 Hz) durante estados de somnolencia, b) acortamiento de la duración de los episodios de sueño de ondas lentas, c) sueño paradójico notablemente reducido y fragmentado, d) episodios de inmovilidad, y e) actividad electrográfica semejante a la del sueño paradójico sin atonia durante los episodios de inmovilidad. Estos hallazgos muestran que el mutante 'taiep' presenta varios aspectos de la narcolepsia y puede constituir un modelo experimental para el estudio de esta patología.

CONACYT P228CCOX891856, MEXICO.

37

ONTOGENIA DE LAS RESPUESTAS EVOCADAS DEL TRONCO CEREBRAL EN RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA NEONATAL. (Development of brain stem responses in a model of perinatal hypoxia). Roncagliolo, M., Benítez, J., Martínez, M., Novas, H., y Rojas, F. Dep. de Fisiología, Fac. de Medicina, U. de Valparaíso.

La hipoxia perinatal constituye uno de los mecanismos patogénicos más importantes que pueden originar trastornos funcionales y daños permanentes en el SNC. En la búsqueda de indicadores objetivos de daño cerebral, evaluamos aquí la maduración postnatal de las respuestas auditivas del tronco cerebral (RATC) en ratas sometidas a hipoxia perinatal moderada.

Se trabajó con 5 camadas controles (CC) (N=34), y 4 camadas 'hipóxicas' (N=47). A la edad de 7 días, las camadas hipóxicas divididas en 2 subgrupos (HA y HB), fueron sometidas durante 2 horas a ambientes hipóxicos: 10% de oxígeno (HA) y 8% oxígeno (HB). A partir del día 10 se registraron las RATC cada dos días, cuantificándose: umbral de audición, latencias absolutas, latencias interondas, y amplitud de sus componentes.

Los primeros indicios de respuesta se observan hacia el final de las 2 primeras semanas de vida, con un umbral elevado. Los días siguientes, constituyen un periodo de rápida maduración. Se produce un aumento significativo de las amplitudes, así también como una reducción de las latencias. El intervalo I-IV sigue una reducción exponencial en función de la edad. No se encuentran diferencias significativas entre los 3 grupos estudiados.

Se propone la evaluación de un modelo hipóxico-isquémico más severo.

FONDECYT 0317-89

39

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS PORCENTAJES DE ELICITACION DE ONDAS DEL EEG: DIFERENCIANDO CUATRO ONDAS CEREBRALES ESPECIFICAS EN DOS ESTADOS DIFERENTES EN SUJETOS NORMALES. (Comparative study of percentile elicitation of EEG waves: Differences among four specific types of brainwaves in two different states in non-anomalous subjects). Lee, C., Cea, J. y Milla, E. Laboratorio de Psicología Experimental, Departamento de Psicología, Brooklyn College of the City University of New York. (Patrocinio: R. Godoy-Herrera).

Se observaron las ondas delta, theta, alfa y beta obtenidos de registros de EEG, de doce sujetos normales en dos estados, ojos abiertos y ojos cerrados. Agregándose tres estímulos diferentes, contar, música y evocación placentera, los datos fueron obtenidos con un polígrafo computarizado y usando diecinueve electrodos. Se observaron los porcentajes de variación de cada una de estas ondas permitiendo cuantificar en parte las fluctuaciones de la actividad cerebral cuando se comparaba entre estados y estímulos.

40

ESTUDIOS DE LIBERACION DE COLECISTOQUININA DESDE MINICORTES DE CEREBRO DE RATA: DISEÑO DE UN METODO DE CONCENTRACION DEL PEPTIDO. (Release of cholecystokinin from rat brain minislices. A method to concentrate the peptide).

Andrés, M.E. Lab. Farmacología-Bioquímica, Depto. Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: **F. Torreilba**).

Los estudios de liberación de neuropéptidos como la colecistoquinina (CCK) desde minicortes cerebrales, se encuentran limitados por no contar con métodos suficientemente sensibles para detectar el péptido liberado. La solución para este problema es concentrar el superfusado. Sin embargo, los métodos tradicionales como la liofilización también concentran las sales de los medios fisiológicos, lo que impide la cuantificación del péptido por radioinmunoensayo (RIA). El objetivo de este trabajo es el diseño de un método que concentre CCK y que a su vez elimine las sales que interfieren con su posterior determinación.

Se utilizó un sistema de HPLC consistente en una columna C18 (Biophase ODS) con agua destilada como fase móvil. Las muestras se inyectaron en este sistema y 10 min después se inyectó 1 ml de acetonitrilo puro con lo cual se eluye el péptido retenido en la columna. En experimentos iniciales se colectaron fracciones cada 1/2 min desde el momento de la inyección de acetonitrilo, para determinar el período en que eluye CCK, luego se secaron con nitrógeno y se determinó CCK por un RIA específico. En las fracciones correspondientes a los minutos 2 y 3 se encontró el total del CCK de las muestras. Se estudió la recuperación de CCK en el rango de 10 a 50 pg, siendo esta de 80 %. Este procedimiento nos permite concentrar 20 a 30 veces respecto a la determinación directa del superfusado.

Se ha aplicado este método de concentración para estudiar la liberación de este péptido desde minicortes de regiones específicas del cerebro de rata. Por ejemplo, es posible medir la liberación de CCK a partir de un solo corte de estriado o hipocampo.

El procedimiento descrito permite concentrar CCK presente en las muestras eliminando el contenido de sales proveniente del medio de superfusión. Eventualmente este método podría servir para la concentración de otros péptidos cerebrales.

(Financiado por proyectos FONDECYT 624/87 y 820/90).

42

EFFECTOS DE LA OVARIECTOMIA Y DE HORMONAS ESTEROIDALES SOBRE LA LIBERACION DE 3H-NORADRENALINA DESDE CORTES DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA. (Effects of ovariectomy and steroidal hormones on the release of 3H-noradrenaline from the rat cerebral cortex slices).

Parada, S., Galleguillos, X., Forray, M.L., Díaz, A., y Belmar, J. Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Recientemente hemos encontrado evidencias de que el ciclo estral, modifica los niveles de noradrenalina (NA), en la corteza cerebral (CC) de la rata y la liberación de 3H-noradrenalina (3H-NA) desde cortes de esta región. Esta información sugiere la posibilidad de una modulación endocrina sobre la neurotransmisión química (NTQ) noradrenérgica. A fin de avanzar en el desarrollo de esta hipótesis, se estudió en este trabajo el efecto de la ovariectomía y de la implantación de progesterona (P) sobre la liberación de 3H-NA desde cortes de CC de la región occipital (CO). Además, se controlaron los niveles de catecolaminas durante el ciclo estral y el efecto de diferentes tipos de estímulos sobre la liberación de 3H-NA.

De animales con 7 días de ovariectomía (OVX-7), 27 días de ovariectomía (OVX-27), o OVX-7 implantados durante 7 días con tubos de silastex capaces de liberar P (OVX7-implantados), se obtuvo cortes de CC, los cuales se cargaron con 3HNA y fueron posteriormente estimulados (K^+ , veratridina o estímulos eléctricos), para inducir liberación de 3HNA. Los niveles de CA se midieron por HPLC con detección electroquímica.

Tanto la NA como la dopamina (DA) parecen variar durante el ciclo estral. La liberación de 3HNA inducida por estímulos químicos y/o eléctricos fue mayor en D₂ que E. En los animales OVX-7 y 27 días de ovariectomía la liberación neta no varió. Esta liberación tampoco varió por implante con Estradiol pero sí aumentó en los animales implantados con P. La Yohimbina, no modificó la liberación neta de 3HNA en animales OVX, ni en OVX implantados con estradiol. Los resultados sugieren a la P como posible modulador de la liberación de 3HNA.

(Apoyado por Proyecto Fondecyt 490/86).

41

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON YOHIMBINA SOBRE LA LIBERACION DE 3H-NORADRENALINA Y SOBRE LOS NIVELES DE NORADRENALINA EN CORTEZA CEREBRAL DE RATAS NORMALES Y SOMETIDAS A DESNUTRICION TEMPRANA. (Yohimbina treatment effect on 3H-noradrenaline release and on noradrenaline levels in the malnourished and normal rat cerebral cortex). **Carreño, P.,** Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: **J. Belmar**).

Se ha encontrado que la desnutrición temprana (DNT) durante el período crítico del desarrollo del sistema nervioso, induce una alteración persistente de la liberación de 3H-noradrenalina (3HNA) recién incorporada, en cortes de corteza cerebral (CC) de la rata. Este hallazgo coincide con la situación de hipernoradrenergia (HNA) descrita en los animales adultos que sufren este tipo de desnutrición. Se ha planteado la hipótesis (Soto-Moyano y cols. 1989) de que en dicha situación estarían comprometidos autorreceptores noradrenérgicos y de que su manejo farmacológico contrarrestarían los efectos de la DNT. En este trabajo se estudia si el tratamiento con Yohimbina (YOH) modifica en animales hasta 56 días de edad el efecto de la DNT sobre la liberación de 3HNA desde la región frontal (CF) de la CC descrita en ratas adultas.

Animales malnutridos y controles fueron tratados con YOH entre los 5 y 16 días de edad. Entre los 17 y 56 días de edad se les midió los niveles de NA (HPLC) en la CF y la liberación basal (LB) e inducida (LI) (K^+ 40 mM) de 3HNA desde cortes de la CF. También se midió el efecto de la droga *in vitro*.

Los niveles de NA en la CF se encontraron disminuidos sólo en los animales normales tratados con YOH. En los animales normales la LB de 3HNA no se modificó ni con la edad ni con el tratamiento con YOH. La droga no aumentó la LB en los animales malnutridos. Con la edad la liberación aumentó en los animales normales y malnutridos. Los malnutridos jóvenes liberaron menos que los normales. En ellos la YOH aumentó la liberación de 3HNA, pero en los animales de más edad la liberación resultó significativamente disminuida respecto a los animales normales tratados y a los normales malnutridos que recibieron vehículo. Los resultados apoyan la participación de autorreceptores alfa 2 y la posibilidad de modificar con drogas la DNT. (Proyecto Fondecyt 29/88).

43

POSIBLE PAPEL DE ADENOSINA EN LA MODULACION DE LA ACTIVIDAD MOTORA DE VEJIGA DE RATON (Possible role of adenosine in the modulation of the motor activity of the mouse urinary bladder). **Acevedo, C.G., Escalona, J., Villar, M., Huidobro-Toro, J.P., Contreras, E.** Departamento de Ciencias Fisiológicas, Universidad de Concepción y Departamento de Ciencias Fisiológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Tanto la adenosina 5'trifosfato (ATP) como la acetilcolina (AC) parecen ser los agentes responsables de la neurotransmisión en la vejiga de ratón. Se sabe que la adenosina (AD) actúa como modulador en diferentes sinapsis, por lo que nos interesó estudiar si ella tiene algún papel en la regulación de la respuesta ATP en la vejiga. Para el estudio se utilizaron diferentes análogos estables de AD como la N-etilcarboxamida adenosina (NECA), cloroadenosina (CADO), R- y S- fenilsipropil adenosina (R-PIA y S-PIA) y ciclohexil adenosina (CHA).

Se utilizaron vejigas de ratón suspendidas en un baño de órgano aislado en solución Ringer-Krebs a 37°C burbujeada con O₂(95%) y CO₂(5%), estimuladas eléctricamente (pulsos de 1 msec, frecuencia de 0.1 a 5 Hz, voltaje supramáximo). La tensión basal fue de 0.5 g y el registro se efectuó en forma isométrica.

Los resultados mostraron que los agonistas de adenosina utilizados inhibieron la respuesta contráctil inducida por ATP con una potencia relativa NECA>CADO>R-PIA>CHA >S-PIA. En cambio, el orden de potencia inhibitoria relativa frente a la estimulación transmural del tejido fue R-PIA>CHA>NECA>AD>S-PIA. Se comprobó además que la AD y análogos resistentes a la desaminación antagonizan contracciones inducidas por AC, serotonina e histamina.

Los resultados permiten suponer que la AD tendría una acción moduladora en la neurotransmisión en la vejiga de ratón, acción que se ejercería en forma tónica, ya que la administración del antagonista de AD, la 8-fenilteofilina, produce un aumento de la respuesta neurogénica.

Proyectos Fondecyt 0699-89 y 0767-90 y Dirección de Investigación de Universidad de Concepción 20.33.52.

44

LIBERACION EVOCADA DE DOPAMINA, GLUTAMATO Y ASPARTATO ENDOGENOS EN CORTES DE SUBSTANTIA NIGRA: MODULACION POR LIGANDOS DE RECEPTORES DOPAMINERGICOS Y DE AMINOACIDOS EXCITATORIOS. (Release of endogenous dopamine, glutamate and aspartate in substantia nigra slices: modulation by ligands of dopamine and excitatory amino acids receptors).

Ábarca, J. Lab. de Farmacología-Bioquímica, Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. (Patrocinio: **G. Bustos**).

Se ha demostrado en Substantia Nigra (SN) la liberación tanto de dopamina (DA) como de aminoácidos excitatorios (GLU y ASP) bajo condiciones fisiológicas. Este hecho, sugiere una probable interacción funcional entre sistemas neuronales que liberan estos mediadores químicos en SN. En el presente trabajo hemos explorado esta posibilidad estudiando el efecto de ligandos específicos de receptores dopaminérgicos y de receptores de aminoácidos excitatorios sobre la liberación endógena de DA, y de GLU y ASP respectivamente, desde cortes de SN.

Cortes de SN se colocaron en cámaras de superfusión y se superfundieron con Krebs-Ringer-Hepes (KRH). La liberación fue evocada por exceso de iones K^+ (40-55 mM). La DA endógena liberada se cuantificó mediante HPLC acoplada a detección electroquímica; y el GLU y ASP endógenos liberados mediante HPLC acoplado a detección fluorométrica.

La liberación de DA endógena evocada por K^+ resultó ser dependiente de Ca^{2+} extracelular y fue bloqueada selectivamente por Amino-Fosfónico-valerato (APV); un antagonista de receptores de aminoácidos excitatorios del subtipo NMDA. La estimulación por K^+ produjo además una liberación significativa de ASP y GLU. Apomorfina (agonista mixto de receptores dopaminérgicos) facilitó la liberación por K^+ de GLU endógeno, pero no la de ASP. Este efecto a su vez fue bloqueado selectivamente por SCH-23390 (antagonista de receptores DAérgicos subtipo D_1). Por otro lado, SKF-38393 (agonista de receptores D_1) generó efectos opuestos sobre la liberación de ASP endógeno, dependiendo de la concentración utilizada.

Los resultados obtenidos son compatibles con la existencia de una interacción recíproca funcional entre sistemas neuronales que liberan DA y aminoácidos excitatorios, a nivel de SN. (Apoyado por FONDECYT 433/88 y 744/90).

46

ASPECTOS FARMACODINAMICOS DEL NEUROPEPTIDO TIROSINA (NPY) EN LA NEUROTRANSMISION DEL CONDUCTO DEFERENTE (CD) DE LA RATA. (Pharmacodynamic aspects of NPY on the rat vas deferens neurotransmission). **Torres, G.** Unidad de Regulación Neurohumoral, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile (Patrocinio: **J. Lewin**).

NPY inhibe la contracción muscular inducida eléctricamente en el CD con una potencia 50 a 200 veces mayor en el extremo prostático (P) que en el epididimario (E). Para conocer las bases de este efecto y su diferencia regional, se estudió en segmentos E y P del CD: a) contracción isométrica inducida eléctricamente en presencia de NPY y análogos, agonistas α -2 adrenérgicos, opiáceos y de adenosina. b) acumulación de AMPc en presencia y ausencia de NPY. c) contenido endógeno de NPY medido por radioinmunoanálisis. NPY inhibe la contracción muscular en P, con una potencia 8 veces mayor que Pro34-NPY y 25 veces mayor que NPY13-36, agonistas Y1 e Y2, respectivamente. Clonidina (C), B-endorfina (B-EP) y ciclohexiladenosina (CHA), inhiben la contracción neurogénica tanto en E como en P, con un orden de potencia relativa $C > B-EP > CHA > NPY$ en P y $C > B-EP > CHA >>> NPY$ en E. La potencia de C y B-EP es similar en E y P. CHA es 3 veces más potente en P que en E. NPY inhibe la acumulación de AMPc inducida por forskolina tanto en E como en P. E y P poseen altos niveles de NPY, los que son 50% mayores en P que en E. 6-OHDA reduce en un 80% y 73% el contenido de NPY en E y P, respectivamente, los que no son afectados por reserpina. Se sugiere que la diferencia regional de sensibilidad es específica para NPY, cuyo efecto parece involucrar receptores Y1 e Y2. La participación del AMPc en la acción de NPY es aún poco clara.

Proyecto FONDECYT #0767-90.

45

EFFECTO DE COCAINA SOBRE DOPAMINA EXTRACELULAR EN NUCLEO ACCUMBENS DE RATA: ESTUDIOS *IN VIVO* MEDIANTE MICRODIALISIS CEREBRAL. (Extracellular dopamine in rat nucleus accumbens after cocaine: studies with dialysis perfusion). **Bustos, G., Bradberry, Ch.W. y Roth, R.H.** Lab. de Farmacología-Bioquímica, Depto. de Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile, Santiago y Deptos. de Farmacología y Psiquiatría, Univ. de Yale, New Haven, U.S.A.

La cocaína (Coc) estimula conductas psicomotoras y facilita la adquisición de conductas de recompensa en animales de experimentación. La adquisición de estas conductas se facilitan por tratamientos previos y repetidos con Coc. Los efectos conductuales se han relacionado con el hecho de que Coc estimula la liberación de dopamina (DA) desde neuronas del sistema DAérgico mesolímbico. Mediante microdialisis cerebral acoplada a HPLC se estudió *in vivo*, los niveles extracelulares (EC) de DA en el núcleo accumbens (NAc), región cerebral rica en terminales mesolímbicos.

Sondas de microdialisis se implantaron en ratas normales y además, luego de 5 días, en ratas tratadas previamente durante 3 días con Coc (20 mg/kg; i.p.) y/o salino. Las sondas se perfundieron a un flujo de 2 μ l/min y la DA liberada se cuantificó por HPLC y detección electroquímica.

Coc administrada ya sea *vía i.v.* (1 mg/kg) o *vía i.p.* (20 mg/kg) produjo un marcado aumento de DA EC, de 2-3 y 10-15 veces, respectivamente. Sin embargo, luego de administración *i.v.* de Coc, la DA EC decae rápidamente a niveles basales. Aumentos de DA EC en respuesta a Coc (20 mg/kg; i.p.) en ratas tratadas repetidamente con Coc, no difieren con aumentos que Coc *i.p.* produce en controles tratados con salino.

Los resultados son consistentes con una acción presináptica de la Coc, bloqueando la recaptura de DA liberada por terminales meso-accumbens. Además, plantean la posibilidad de que la "sensibilización" conductual observada luego de administración repetida de psicoestimulantes como la Coc, pudiera estar mediada por cambios en la función DAérgica presináptica.

(Apoyado por FONDECYT 744/90 y por NIH grants, MH-14276 y DA-05119).

47

DESARROLLO INTRAUTERINO DEL ORGANOSUBCOMISURAL DE RATA. ESTUDIO INMUNOCITOQUIMICO. (Intrauterine development of the rat subcommissural organ. Immunocytochemical study). **Garrido, O.** Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Se estudió el desarrollo del órgano subcomisural (OSC) en embriones y fetos de rata Holtzman durante toda la gestación (21 días). Se usó microscopía óptica corriente y tinción Hematoxilina-Eosina (HE), además inmunocitoquímica utilizando como primer anticuerpo anti-fibra de Reissner, en el método de la peroxidasa anti-peroxidasa (Sternberger et al 1970).

Con HE el OSC se diferencia morfológicamente a los 13 días de gestación (G) como un epitelio endodermico pseudoestratificado engrosado por debajo de la comisura blanca posterior (CBP). Entre los días 14 y 15 de G el OSC se delimita anteriormente por el receso pineal y posteriormente por un pequeño surco. Entre los días 16 al 21 de G sigue el desarrollo de las células endodermicas, el hipendima experimenta escaso desarrollo y se visualizan vasos sanguíneos en el interior del OSC. La inmunoreactividad (IR) aparece en las células endodermicas alrededor del día 13 de G. Esta IR se ubica en el citoplasma perinuclear, en prolongaciones citoplasmáticas endodermicas dentro de la CBP y en gránulos apicales. La IR aumenta progresivamente hasta el momento del nacimiento.

La diferenciación morfológica del OSC con respecto a otras estructuras cerebrales es muy precoz y la aparición de la actividad secretoria coincide con esta diferenciación, en cambio la vascularización es más tardía.

Financiado por Proy. Dir. Inv. U.A.CH. S-89-01 y FONDECYT 0890-88.

48

TRANSPORTE INTRACELULAR DEL MATERIAL SECRETORIO DEL ORGANISMO SUBCOMISURAL (OSC) DE RATA. (Intracellular transport of the secretory material of rat subcommissural organ). Schoebitz, K. Instituto Histología y Patología, Facultad Medicina, Universidad Austral de Chile.

El OSC es un órgano circunventricular del cerebro que secreta varias glicoproteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR) donde primero se condensa sobre la superficie del OSC como una pre-fibra de Reissner, luego en fibra de Reissner (FR) que se extiende a lo largo del canal central de la médula espinal.

Un anticuerpo (Ac) contra las glicoproteínas de la FR llamado AFRU (antisuero fibra Reissner) se inyectó en el ventrículo lateral de rata con el fin de observar la ubicación del Ac primario y sus probables sitios de unión. 20 minutos postinyección el OSC fue procesado para inmunocitoquímica ultraestructural (ICU) haciendo la tinción a partir del 2do Ac (inmunotinción incompleta, ITI)-proteína A-oro. El OSC de ratas no tratadas fueron igualmente procesados y teñidos con el método de inmunotinción completa (ITC)-proteína A-oro para observar la ubicación del material secretorio inmunoreactivo del OSC.

Ratas tratadas mostraron el Ac inyectado in vivo localizado en el material secretorio como pre-fibra y FR. Gránulos secretorios apicales (GCA) y cavidades intracelulares en esta región, presentaron reacción negativa a la ITI, en cambio, en ratas no tratadas la ITC demostró la presencia de material inmunoreactivo en estas estructuras.

Por estudios anteriores se sabe que la síntesis, procesamiento y transporte al polo ventricular y la liberación ocurren para ciertas glicoproteínas en 1 hora y para otras en alrededor de 4 días. En este sentido resultados preliminares sugieren que parte del material secretorio sería almacenado en cavidades intracelulares y posteriormente secretado hacia la cavidad ventricular.

Financiado por Proy. S-89-01 Dir. Invest. U.A.Ch. y FONDECYT 0890-88.

50

CARACTERIZACION DEL SISTEMA NORADRENERGICO DEL LECHO DE LA ESTRIA TERMINAL DE CEREBRO DE RATA. (Characterization of the noradrenergic system of the rat brain bed nucleus of the stria terminalis). Gysling, K. Laboratorio de Farmacología-Bioquímica, Depto. Biología Celular y Molecular, P. Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: B. Ramirez).

El lecho de la estria terminal (LET) es uno de los núcleos subcorticales del sistema límbico. La aferencia principal de este núcleo corresponde a las fibras amígdalo fugales que llegan por la estria terminal. El LET, a su vez emite proyecciones hacia el hipotálamo, materia gris periacueductal y núcleo del tracto solitario estructuras relacionadas con funciones límbicas y autonómicas. Estudios electrofisiológicos y de comportamiento sugieren un rol integrador de esta estructura dentro de los circuitos límbicos. El propósito de este trabajo es obtener información acerca de la neuroquímica de este núcleo que permita interrelacionar las evidencias obtenidas por métodos electrofisiológicos o conductuales.

Dada su característica de presentar un alto contenido en aminas biogénicas resulta interesante en la etapa inicial evaluar el rol del sistema noradrenérgico. Para ello se han determinado los niveles de noradrenalina (NA) en las distintas zonas del LET así como la liberación de este neurotransmisor inducida por agentes despolarizantes. La NA se cuantificó por un sistema de HPLC acoplado a detección electroquímica.

La región ventral del LET presenta una concentración significativamente mayor de NA que su área dorsal. De hecho, estos niveles de NA en el LET ventral son los más altos encontrados en cerebro de rata. La NA es liberada *in vitro* frente a un estímulo despolarizante, desde minicortes de LET ventral. Esta liberación es dependiente de la presencia de calcio en el medio de superfusión. Finalmente, lesiones de las vías aferentes al LET modifican la liberación de NA.

En conclusión, el LET resulta ser un apropiado modelo neuroquímico para estudiar en minicortes cerebrales la liberación de NA endógena desde regiones límbicas del SNC.

(Financiado por proyecto Fondecyt 820/90).

49

REGULACION HORMONAL DE LA ACCION DEL NEUROPEPTIDO TIROSINA (NPY) SOBRE LA NEUROTRANSMISION DEL CONDUCTO DEFERENTE (CD) DE LA RATA. (Hormonal regulation of NPY action on the rat vas deferens neurotransmission). Bitrán, M. Unidad de Regulación Neurohumoral, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile (Patrocinio: J.P. Huidobro-Toro).

Nos interesó estudiar si la acción inhibitoria del NPY sobre la neurotransmisión del CD es regulada por el estado endocrino del animal. Se utilizaron ratas normales de distintas edades post-natales, castradas y castradas tratadas con Testosterona (T, 0.5 mg/rata-día). El CD se seccionó en sus mitades epididimarias (E) y prostáticas (P), en las que se estudió: a) contracción muscular inducida por estímulo eléctrico (70 V, 1ms) en ausencia o presencia de NPY. b) contenido tisular de NPY. En todos los grupos experimentales se determinó el peso húmedo del CD y los niveles plasmáticos de T. En ratas sexualmente maduras NPY inhibe la contracción neurogénica en P (IC50 15 nM), en tanto que E es resistente a la acción de NPY. La castración reduce el contenido de NPY en E y P; no modifica la sensibilidad a NPY en P, aumentándola en E (IC50 38 nM). La IC50 en E de ratas de 26 y 37 días es 75 y 425 nM, respectivamente. La sensibilidad de P a NPY no cambia marcadamente con la edad. Los niveles circulantes de T en animales de 26 días son significativamente menores que los de animales adultos. La castración disminuye en un 95% los niveles circulantes de T (de 1,89 a 0,11 ng/ml). La administración de T revierte los cambios de sensibilidad a NPY producidos por la castración. En consecuencia, la acción de NPY sobre las neuronas simpáticas del CD es regulada por el estado hormonal, el que afecta diferencialmente los extremos E y P.

Proyecto FONDECYT 0767/90.

51

POSIBLE PARTICIPACION DEL CALCIO EN LA POTENCIACION DE LA RESPUESTA MOTORA DE ATP POR BRADICININA (BK). (Possible role of calcium in the potentiation of the motor activity of ATP by BK). Donoso, M.V. y Lewin, J. Unidad de Regulación Neurohumoral, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

BK potencia la respuesta motora de adenosina 5'trifosfato (ATP), en la vejiga de la rata. Este efecto es mediado por la activación de receptores específicos, B2 y P2X para BK y ATP respectivamente. Para esclarecer el mecanismo de la potenciación, se comparó la acción de BK con la del compuesto 202791 (+), un agonista del canal de calcio. También se estudió el efecto de antagonistas de calcio tipo L 202791 (-) y nifedipina (N). Se utilizaron vejigas de rata superfundidas con TYRODE en presencia de atropina y guanetidina. Se registró contracción muscular isométrica. BK potencia la contracción de ATP en forma concentración y tiempo dependiente. El óptimo de preincubación con BK es de 5 min. 3 nM BK no produce contracción muscular *per-se*, pero potencia la acción motora de ATP; concentraciones mayores de BK contraen el tejido. 0.1 uM N o 0.56 uM 202791 (-) desplazan significativamente la curva de BK, sin alterar la de ATP. N bloquea la potenciación de ATP.

El efecto de BK es específico para ATP, sin alterar la sensibilidad de acetilcolina (A) o serotonina (S). En cambio, 202791 (+) potencia las contracciones de ATP, BK, A y S. El mecanismo de la potenciación se ejerce posiblemente a través de un receptor BK-B2 que causa un flujo de calcio, que por sí sólo no es capaz de producir contracción muscular, pero es suficiente para potenciar la acción de ATP.

FONDECYT 0305-88, 0699-89 y 0767-90.

52

ESTANDARIZACION DE UN ELISA PARA LA CUANTIFICACION DEL MATERIAL SECRETORIO DEL ORGANISMO SUBCOMISURAL. (Standardization of an ELISA for the quantification of the subcommissural organ secretory material). Richter, H., Nualart, F., Peña, P. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile. (Patrocinio: S. Hein).

El órgano subcomisural (OSC), glándula cerebral altamente especializada, secreta una o más glicoproteínas al líquido cefalorraquídeo (LCR), las cuales se condensan para formar la fibra de Reissner (FR). El presente trabajo muestra la estandarización de un ELISA para la cuantificación de los productos secretorios del OSC.

Como antígeno para desarrollar la curva estándar se utilizó FR disuelta alternativamente en dos medios; i) Tris-HCl 0.1 M (pH 8.6), Urea 8 M, DTT 10 mM, EDTA 0.5 mM, (FR-U) y ii) tampón Bicarbonato de amonio 50 mM, PMSF 0.5 mM, (FR-bi). Los sueros anti-FR fueron producidos inmunizando conejos y ratas con un extracto de FR-U. El anticuerpo (1:1000) obtenido en rata fue unido a la matriz sólida, previamente activada con glutaraldehído 0.1%. Después de adsorber al antígeno (FR-U o FR-bi), el sistema matriz-anticuerpo-antígeno fue incubado con los anticuerpos anti-FR-U obtenido en conejo (1:500) y finalmente con anti-IgG de conejo marcada con fosfatasa alcalina (1:1000); la actividad enzimática fue revelada utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato.

Una sensibilidad mayor (5-80 ng de material FR-inmuno-reactivo) fue lograda utilizando FR-bi como antígeno para construir la curva estándar. La cuantificación de material FR-inmuno-reactivo dió por OSC de bovino y OSC de rata, 1,5 ug y 3 ng respectivamente. Este método nos permitirá determinar si existe material FR-inmuno-reactivo soluble en LCR de diferentes especies y cuantificar la actividad de biosíntesis del OSC bajo diferentes condiciones experimentales.

Financiado por Proy. S-89-01 Dir. Invest. U.A.Ch. y FONDECYT 0890-88.

54

INMUNOCITOQUIMICA DE SUSTANCIAS NEUROACTIVAS EN RECEPTORES VISCERALES: GLUTAMATO Y CGRP. (Immunocytochemistry of neuroactive substances in visceral receptors: glutamate and Substance P). Torrealba, F. Unidad de Regulación Neurohumoral, Fac. de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

Estudios farmacológicos recientes apoyan la hipótesis de que en ratas, tanto glutamato como el péptido CGRP juegan un papel de neurotransmisores o neuromoduladores tanto en aferencias primarias viscerales como en el principal núcleo sensorial visceral, el Núcleo del Tracto Solitario (NTS). Decidimos estudiar la localización fina de dichas sustancias en vías viscerales centrales y periféricas de gatos; en estos animales hay una gran riqueza de datos fisiológicos, y pocos datos neuroquímicos.

La inmunocitoquímica reveló una presencia significativa y difusa de glutamato en neuronas y neuropila del NTS, pero sólo una fracción muy menor de neuronas de los ganglios nodoso y petroso eran positivas. En cambio, las células glómicas principales del cuerpo carotídeo mostraban gran inmunoreactividad. Estos resultados no apoyan un papel de neurotransmisor en aferencias viscerales para el glutamato, y sugieren que los efectos de la aplicación de glutamato sobre neuronas del NTS podría imitar la acción sináptica de inputs centrales sobre el NTS.

En contraste, CGRP estaba localizado en una subpoblación de aferencias primarias, que por su distribución en el NTS y la estructura de las terminales periféricas corresponden a aferencias amielínicas. La remoción quirúrgica de los ganglios nodoso y petroso hizo desaparecer las fibras CGRP positivas tanto en el NTS como en los receptores carotídeos ipsilaterales.

Financiado por FONDECYT 317/88.

53

INVESTIGACION PRELIMINAR DE UNA PROBABLE SECRECIÓN ESPECIFICA DE LA PARS TUBERALIS (PT) DE LA HIPOFISIS. (Preliminary investigation of a secretory material likely to be specific of pituitary pars tuberalis) Morales, F., Peruzzo, B. y Rodríguez, E.M. Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Análisis histoquímicos y ultraestructurales utilizando lectinas mostraron que las células de la PT poseen afinidad por Con A, WGA pero no por LFA y que el material que une las lectinas está en gránulos secretorios; sugiriendo que PT secretaría una glicoproteína o glicopéptido que contiene manosa pero no ácido siálico. El objetivo del presente trabajo es la identificación y purificación parcial de tal secreción en extractos de PT de vaca.

Dos tipos de extractos proteicos y uno peptídico de PT fueron sometidos a electroforesis en geles de PAA-SDS, transferidos a nitrocelulosa y analizados para su afinidad por lectinas (WGA y Con A) e inmunoreactividad frente a sueros policlonales anti-PT, producidos en nuestro laboratorio inyectando ratas y conejos con un extracto acetónico de PT bovina disecada quirúrgicamente.

Dado que en PT existen células que secretan hormonas propias de pars distalis (PD), en este estudio preliminar se realizó siempre un análisis comparativo de los diferentes parámetros entre extractos de PT y extractos de PD.

El análisis del material transferido permitió identificar una banda Con A y WGA positiva, presente en extractos de PT y ausente en extractos de PD.

Financiado por proyectos S-89-01 Dir. Inv. U.A.Ch. y FONDECYT. 88-0890.

55

EFFECTO DE SOMATOMEDINA C (SmC/IGF-1) EN LA ESTEROIDOGENESIS LUTEA HUMANA IN VITRO.

(Effect of Somatomedin C/IGF-1 in the human luteal steroidogenesis in vitro).

Izquierdo, C.; Castro, O.; Vega, M.; y Devoto, L. Inst. Invest. Materno Infantil, Depto. Ob/Ginecol. Hosp. P. Jaraquemada, Facultad de Medicina, U. de Chile.

Estradiol (E2), Progesterona (P4), son los principales esteroides producidos por el cuerpo lúteo humano, en el cual LH/hCG parece ser el principal factor modulador de esta síntesis esteroidea. Además algunos factores de crecimiento han sido involucrados en el control de la esteroidogénesis ovárica como factores autocrinos. El objetivo de este trabajo es analizar en células lúteas in vitro el efecto de SmC/IGF-1 en su esteroidogénesis. En mujeres operadas por salpingoligadura se practicó lutectomía previo consentimiento informado. Las células lúteas se cultivaron en medio M-199/HEPES/BSA/Bicarbonato por 24 horas en incubadora a 37°C, con 5/95% de CO2/aire. Se incubó con los siguientes factores: hCG (10 UI/ml), IGF-1 (0,1 a 50 ng/ml), en el medio de cultivo se determinó por RIA: E2 y P4; los resultados se expresaron en pg(E2) o ng(P4)/10⁶ células/24h. En el CL intermedio la síntesis basal (24h) de P4 fue de 27,2 ± 4,11 ng, los incrementos con hCG y SmC/IGF-1 fueron de 2,2 y de 1,5 a 2 veces respectivamente.

La síntesis basal de E2 fue de 534,2 ± 64,20 pg y se incrementó 1,7 veces con hCG y de 1,3 a 1,9 veces con SmC/IGF-1.

Estos resultados confirman el efecto luteotrófico de LH y además sugieren un efecto luterotrófico positivo de SmC/IGF-1 en las células del CL intermedio humano.

Datos preliminares nos sugieren que el incremento de E2 por efecto de SmC/IGF-1 se debería principalmente a un aumento en la actividad aromática.

Financ. por Fund. Rockefeller GAPS 88077.

56

LEU-B, NUEVO PEPTIDO ACTIVO DE ORIGEN HEPATICO. (Leu-B, a novel bio - active hepatic peptide). Luis Constandil, Jaroslaw Szecowka, Sankar Mitra y Robert Carraway. Depto. de Fisiología, P. Univ. Católica de Chile, Santiago, y Dept. of Physiology, Univ. of Massachusetts, Worcester, MA, USA. (Patrocinio: Hector R. Croxatto).

El hígado produce proteínas que bajo acción de proteasas endógenas generan péptidos biológicamente activos (por ej. angiotensina y bradicinina). Simulando in vitro este proceso biológico, se sometió el hígado de rata a la extracción con HCl (0.1 N) y a la digestión con pepsina (0.5 mg/ml) y cromatografía en Sephadex G-15 y HPLC. Un nuevo péptido Leu-B (rendimiento: 0.7 µg/g) fue detectado gracias a su reactividad cruzada en el RIA de Leu-enkefalina (Leu-Enk). Sin embargo, su PM de ~1000 Da fue la primera indicación que Leu-B no es idéntico con la Leu-Enk (PM = 627 Da). La actividad contractil de Leu-B se estudió en la musculatura lisa del fundus gástrico y del íleon de rata; se compararon las actividades de Leu-Enk, Met-Enk y neurotensina, como agonistas de referencia. Leu-B produjo contracción del fundus y relajación del íleon; ambos efectos dosis-dependientes en rango 10 nM - 1 µM, con EC50 ~ 200 nM. En ambos tejidos Leu-B fue más potente que las enkefalinas (EC50 ~ 400 nM) y menos potente que neurotensina (EC50 ~ 1 nM). El antagonista opiáceo naloxona (1 µM) abolió las actividades de las enkefalinas pero no las de Leu-B y neurotensina. Se concluye que Leu-B es un nuevo péptido biológicamente activo, estructuralmente parecido a Leu-Enk pero que no actúa vía receptores opiáceos. Las determinaciones de la secuencia aminoácida y de la distribución anatómica están en progreso. Financiamiento: NIH-DK28565 y FONDECYT-0767/90.

58

REGULACION "IN VIVO" DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA QUINASA C (PK-C) MAMARIA POR ESTROGENOS Y PROGESTERONA. (Protein kinase C activity regulation "in vivo" by estrogen and progesterone in rat mammary gland). Foncea, R., Lavandero, S., Sapag-Hagar, M. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. Cs. Qcas. y Farmacéuticas, UNIVERSIDAD DE CHILE.

Nuestro Laboratorio ha purificado y caracterizado la PK-C de glándula mamaria de rata y ha estudiado su actividad a lo largo del ciclo lactogénico, encontrándose un nivel máximo durante la mediana preñez y un mínimo en la lactancia. Considerando que el desarrollo del tejido mamario está controlado por factores de crecimiento y hormonas, entre las que destacan los estrógenos y la progesterona, se procedió a analizar "in vivo" la posible dependencia de la PK-C con respecto a estas hormonas.

Se utilizaron como modelo ratas ovariectomizadas las que recibieron, por vía s.c., estas hormonas en forma independiente o asociada (estradiol benzoato: 0 - 5 µg/rata/día; progesterona: 0 - 10 mg/rata/día). Los controles lo constituyeron ratas pseudo-operadas u ovariectomizadas.

La actividad de la PK-C se determinó en los extractos semipurificados de las fracciones solubles y particuladas de la glándula mamaria. En la soluble se obtuvo un aumento de un 64% en la actividad con la asociación hormonal, siendo máxima en el día 10. La administración de estradiol produjo un aumento de un 155% y la de progesterona una inhibición de un 66%. La PK-C unida a membranas no varió por acción de cada hormona, pero sí aumentó con su asociación.

Los resultados indican, claramente, que la actividad de la PK-C mamaria es dependiente de estrógenos y progesterona, lo que sugeriría su participación en los procesos de proliferación y diferenciación de la glándula mamaria controlados por estas hormonas.

S.L. es becado de Fundación Andes. Fondecyt 88-0872.

57

ANDROGENIZACION Y PERIODOS CRITICOS DE SENSIBILIDAD DE LA RESPUESTA UTERINA A LOS ESTROGENOS. (ANDROGENIZATION AND CRITICAL PERIODS OF SENSIBILITY OF UTERINE RESPONSE TO OESTROGENS).

Arriaza, C.A., Mena, M.A., Tchernitchin, A.N. Depto. Morfología Exp. Fac. Medicina. U. de Chile.

La exposición de animales o humanos a agentes hormonales durante el período perinatal, puede por imprinting, producir cambios permanentes en algunas características morfológicas, bioquímicas y/o funcionales de los órganos en diferenciación, cambios que se manifiestan en la pubertad o en la edad adulta. En este trabajo se estudia el efecto de la exposición a andrógenos, en el período postnatal temprano, sobre algunos parámetros de la respuesta uterina a los estrógenos.

Ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 1, 5 y 13 días de edad postnatal, fueron androgenizadas con inyección subcutánea única de propionato de testosterona (1mg/5g p.c.). Los animales controles fueron inyectados con aceite vegetal. A los 21 días de edad, se tomó muestras de útero de androgenizados y sus controles. Algunos animales fueron inyectados, i.v. con 17β estradiol (30 µg/100 g p.c.), dosis única, 6 ó 24 h antes de la obtención de la muestra. Se analizaron: (1) la altura del epitelio glandular y luminal uterinos, (2) la densidad celular en miometrio circular, (3) área de corte del miometrio circular.

Los resultados muestran que el efecto de la androgenización es diferente en los diversos días y en los diferentes tejidos estudiados, observándose respuestas precoces y potenciadas en epitelios y miometrio en ciertos días y en otros, respuestas bloqueadas o no modificadas. Se propone la existencia de períodos críticos temporalmente no coincidentes, para las diferentes poblaciones celulares uterinas, en los que parámetros de estimulación estrogénica son modificables.

Este trabajo fue financiado por Grant TWAS RG.BC 87-51.

59

EFFECTO DE DIFERENTES ACTIVADORES DE LA PROTEINA QUINASA C EN LA ESTEROIDOGENESIS Y EN LOS FLUJOS IONICOS (Effect of different protein kinase activators on steroidogenesis and ion permeability).

Lobo M.Y. Departamento de Fisiología Biotífica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Recientemente hemos determinado que el diacilglicerol sintético sn-1,2 dioctanil glicerol (DIOG) es capaz de estimular la esteroidogénesis en forma similar a Angiotensina II. Con el fin de determinar si el mecanismo de acción de este compuesto es a través de la proteína quinasa C (PKC), estudiamos el efecto en la esteroidogénesis de diferentes activadores de esta enzima: sn 1 oleil 2 acetil glicerol (OAG) tetra decanil forbol 13 acetato (TPA), 12 deoxiforbol 13 isobutirato (iso Bu), mezerolina y 1 mono oleil glicerol (MOG).

Los estudios se realizaron en células aisladas por dispersión con colégenasa de zona glomerulosa de glándula adrenal de bovino. Se midió la esteroidogénesis en un sistema dinámico, encontrándose que ninguno de los compuestos antes mencionados era capaz de activar la producción de aldosterona. Por otra parte, se estudió el efecto de estos compuestos en los flujos iónicos. Al realizar estudios de permeabilidad el potasio se encontró que tanto TPA como OAG producen un aumento transiente en la permeabilidad a este ión. Sin embargo, este efecto no fue seguido de una fase inhibitoria como ocurre con DIOG. Estos compuestos no fueron capaces de abolir el aumento en permeabilidad a potasio inducido por depolarización como ocurre en presencia de DIOG y Angiotensina II.

Otro hallazgo interesante fue el hecho que estaurosporina un conocido inhibidor de la PKC no inhibió el efecto de DIOG en la esteroidogénesis, sino que sorpresivamente este compuesto produjo una potenciación del efecto esteroidogénico lo cual también se observó en presencia de Angiotensina II.

Se concluye que el mecanismo de acción por el cual DIOG estimula la esteroidogénesis no sería a través de la PKC. Estos datos abren la posibilidad de alguna vía alternativa, independiente de PKC activada por DIOG y por AII.

(Proyectos FONDECYT Nº 53/88 y DTI B-2363-8935).

60

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR DE VASOPRESINA (AVP) EN CELULAS A-10 (Characterization of vasopressin receptor in A-10 cells). **Reyes, C. E., Caorsi, C.E., Estrada, E.F., Troncoso, S. González, C.B.** Instituto de Fisiología, Universidad Austral de Chile.

Con el propósito de estudiar el mecanismo de vasoconstricción mediado por AVP, se caracterizó la unión de esta hormona a una línea celular derivada de músculo liso de aorta de rata. Células A-10 fueron incubadas con 3 nM [3 H]AVP, lavadas y la radioactividad determinada. La unión no específica fue determinada por adición de un exceso de AVP. Se determinó la unión de vasopresina a distintos tiempos hasta los 60 min. La disociación se determinó por dilución y adición de un exceso de vasopresina después de que la reacción alcanzó el equilibrio. La unión de AVP y un antagonista (AV-AT) de receptores V_1 fue determinada en presencia de cantidades crecientes de magnesio. La unión de [3 H]AVP se incrementó rápidamente siendo máxima a los 10 min, luego decayó en alrededor de un 35% en 60 min. Esto probablemente debido a internalización de receptores. La reacción es reversible en un 90% dentro de 30 min por dilución y adición de vasopresina. De los experimentos de asociación y disociación se calculó una Kd de aproximadamente 1 nM. Magnesio incrementó la unión de AVP a células siendo máxima a 10 mM. En cambio, la unión de AV-AT disminuyó en presencia de concentraciones crecientes de Mg^{++} . Es probable que este efecto diferencial de Mg^{++} para el agonista y el antagonista sea mediado por asociación y disociación de proteína G al receptor.

Proyectos FONDECYT 89-206 y DIUACH S 90-18.

62

INFLUENCIA DE LA HIPERTROFIA CARDIACA EXPERIMENTAL SOBRE LOS NIVELES DE PGE2 Y AMPc EN PLASMA Y TEJIDO CARDIACO. (The influence of experimental cardiac hypertrophy on plasma and heart tissue PGE2 and cAMP levels). **Zamorano B. y Carmona M.T.** Depto. Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Aunque se ha demostrado que las prostaglandinas (PG), sintetizadas en el corazón participan en la regulación de la actividad cardíaca, se desconoce su mecanismo de acción molecular. En este trabajo se estudia la relación entre PGE2 y AMPc en un modelo de corazón sometido a sobrecarga crónica de presión (SCP).

La SCP se indujo en ratas Sprague Dawley adultas por constricción de aorta abdominal. A los 30 días después se midió la presión arterial (PA) por método directo, y los corazones una vez extraídos y pesados fueron disectados bajo lupa. Cada aurícula y ventrículo se guardó por separado a $-80^{\circ}C$ para su análisis posterior. La concentración de PGE2 se determinó en plasma arterial y en cada cámara cardíaca por radioinmunoanálisis previa extracción, y separación cromatográfica. El nivel de AMPc se midió, en las mismas muestras, por el bioensayo de Gilman.

Los resultados demuestran que en ratas sometidas a SCP: 1) aumenta la PA (41%) y el peso del corazón (26%). 2) el peso de aurícula y ventrículo del lado izquierdo aumentan 20% y 34%, respectivamente. 3) las concentraciones de PGE2 y AMPc aumentan significativamente en plasma arterial ($p < 0.001$). 4) en el tejido auricular y ventricular se observa una relación inversa de los niveles de PGE2 y AMPc.

Este estudio sugiere que el stress hemodinámico de la SCP determina cambios de la síntesis vascular y miocárdica de PGE2 y AMPc, posiblemente asociados a ajustes cardíacos compensatorios.

(Financiado por Proyecto D.I.B.U. B2008-8733)

61

ACCIÓN DE VASOPRESINA (VP) Y DE UN AGONISTA V_2 (dDAVP) EN EL CICLO DEL FOSFATIDILINOSITOL (PI) EN MEDULA RENAL DE RATA. (Effect of vasopressin (VP) and an V_2 agonist (dDAVP) on the Phosphatidylinositol cycle of the rat kidney medulla) **Cid, P., Thielemann, L., Rosemblut, G., y Oberhauer, E.** [Patrocinio I. Pepper].

Nuestro objetivo es evaluar la incorporación de ortofosfato ^{32}P en los fosfolípidos de membrana involucrados en el ciclo del PI estimulando con VP y dDAVP. Para ello se incubó en homogenados de médula renal el trazador junto al agonista midiendo las cpm incorporadas a PI-4,5-bisfosfato (PIP2), PI-4-monofosfato (PIP), PI y ácido fosfatídico (PA) a los 0.5, 1, 3, 10, 30, 60 y 120 minutos. En los controles la distribución porcentual de las marcas en los 4 fosfolípidos fue: PIP2:32,5, PIP:29,5, PI:1,8 y PA:36,1 a los 3 minutos, y de 20, 6,9, 29,3 y 43,8% a las 2 hrs. respectivamente.

% variación respecto a controles pareados

Tiempo (min)	1	3	10	30	120
VP: 1 μ M					
PIP+PIP2	5	15	21	19	31
PI	43	-2	4	42	33
PA	-18	21	15	16	28
dDAVP: 1 μ M					
PIP2+PIP	19	187	80	112	67
PI	-8	44	174	129	61
PA	28	163	101	164	66

Conclusión: Tanto AVP y dDAVP (1 μ M) aumentan la incorporación de ^{32}P a los fosfolípidos estudiados, lo que es compatible con una activación del ciclo. Sin embargo, el dDAVP (0.1 μ M) disminuye tal incorporación lo cual puede interpretarse como un bloqueo directo o indirecto del ciclo.

63

EFFECTOS COMPARATIVOS DE ENDOTELINA (E) Y NORADRENALINA (NA) SOBRE EL TONO Y FLUJO MICROVASCULAR. MODULACION POR OXIDO NITRICO (NO). Comparative effects of endothelin and noradrenalin on microvascular tone and flow. Modulation by nitric oxide. **Martínez, A., Avala, S. y Roríc, M.P.** Lab. de Microcirculación, U. Regulación Neurohumoral, FCCBB, P. Universidad Católica de Chile.

Los factores paracrinos producidos por el endotelio, son potencialmente importantes en la regulación del flujo sanguíneo y la resistencia vascular. Estos factores han sido caracterizado farmacológicamente en grandes vasos de conducción, pero sus efectos en la microcirculación han sido poco estudiados.

La mejilla de hamster fue superfundida y su red microvascular se observó con videomicroscopía intravital. El flujo sanguíneo se determinó por el clearance de ^{22}Na (C-Na) a través de la mejilla, y se midió simultáneamente el calibre de arteriolas y vénulas, antes durante y después de aplicar tópicamente los agentes vasoactivos.

NA (0.01-100 μ M) y E (0.01-10 nM) produjeron disminución dosis-dependiente en C-Na y diámetros vasculares, pero E fue mucho más potente que NA (EC_{50} 2 nM vs 200 nM). A dosis equipotentes, la reducción de flujo fue más lenta con E ($t_{1/2}$ 12 min, 1 nM) que con NA ($t_{1/2}$ 4 min, 100 nM) y lo mismo ocurrió con la recuperación del C-Na. Para ambas drogas, la constricción fue de mayor magnitud y menor duración en arteriolas terminales (5-15 μ m), en comparación con arteriolas más grandes (20-40 y 40-60 μ m) o vénulas musculares (20-80 μ m). Sin embargo, la velocidad de contracción y de relajación arteriolar fue mucho menor con E que con NA. La constricción venular fue importante en la respuesta isquémica a dosis bajas de E. Nifedipina (300 nM) antagonizó parcialmente los efectos de 1 nM E, aumentando $t_{1/2}$ a 20 min.

Finalmente, la inhibición de la producción endógena de NO con L-Nitro-arginina (10 μ M) redujo el flujo microvascular basal (-15%) y potenció las respuestas vasoconstrictoras (+50% para 100 nM NA), evidenciando la importancia del NO en el tono basal y en la recuperación post-isquemia. FONDECYT 767/90 y 642/89.

64

EFFECTO DEL CIGARRILLO EN EL FLUJO UMBILICAL EVALUADO POR VELOCIMETRIA DOPPLER. (Effect of smoke on the umbilical blood flow). Leible, S., Muñoz, H., Loureiro, O., Hasbun, J., González, M. y Arroyo, A. Dpto. de Ginecología y Obstetricia, Dpto. de Cardiología y Dpto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: M.V. Lago).

Es sabido que los hijos de madres fumadoras tienen un peso de nacimiento de aproximadamente 500 gr. menos que la población normal. El motivo de este trabajo es evaluar y cuantificar el efecto del cigarrillo sobre el flujo umbilical y resistencia placentaria medida por velocimetría doppler.

En ocho mujeres con embarazos entre 18 y 33 semanas de gestación se realizó velocimetría doppler con un aparato duplex aloka. Los vasos evaluados fueron arterias arcuadas y umbilicales, antes y veinte minutos después de fumar un cigarrillo. Los resultados se expresan como porcentaje de incremento de la resistencia placentaria pre y post cigarrillo evaluada por la relación sistole/diástole. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la relación sistole/diástole en arteria umbilical en todas las pacientes con un promedio de $\times 39.48\%$ (st. e. 11.91). La relación sistole/diástole en arterias arcuadas no mostró cambios significativos excepto en una paciente. El análisis de los resultados es compatible con un aumento de la resistencia del lecho vascular placentario y por tanto de una disminución del flujo utero-placentario por el cigarrillo, lo que explicaría en parte la disminución de peso de los hijos de madres fumadoras. La utilización de la técnica para cuantificar flujo en los vasos placentarios debe ser motivo de futuras investigaciones, al igual que el estudio del mecanismo de acción del cigarrillo en el flujo utero-placentario.

(Proyecto FONDECYT 53/88)

66

CAMBIO EN LA SENSIBILIDAD A QUABAINA EN MUSCULO ESQUELETICO BAJO DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES. (Quabain-sensitivity in skeletal muscle under different experimental conditions). Michea, J. y Alvo, M. Departamento Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. (Patrocinio: E. T. Marusic).

La sensibilidad a la ouabaina de la Na, K-ATPase es una característica que se presenta en forma diferencial en las dos isoformas ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) de esta enzima que están presente en el músculo esquelético. La $\alpha 1$ presenta una menor afinidad por el glicosido que la isoforma $\alpha 2$. En el presente trabajo se estudio la sensibilidad a la ouabaina en dos condiciones patológicas, hipertensión (HPT) e insuficiencia renal crónica (IRC). Para esto se usaron ratas Sprague Dawley a las cuales se les indujo HPT por pinzado de la arteria renal (modelo Goldblatt), y la IRC por nefrectomía 3/4. La sensibilidad a ouabaina se determino por la actividad remanente de la Na, K-ATPase del músculo esquelético a distintas concentraciones del glicosido. La actividad fue determinada por la captación de Rb^{86} , usado como análogo de K^+ . Los resultados demuestran que tanto en la HPT como en IRC, la Na, K-ATPase muscular presenta una mayor sensibilidad al glicosido. Es así como a la concentración de 10^{-7} M la actividad remanente de la bomba fue de 75,8% en la HPT y de 58% en la IRC mientras que en los tejidos normales la inhibición a esta concentración de ouabaina fue de 95%. La actividad total de la bomba de Na fue normal en los HPT y de un 50% en la IRC.

Estos resultados indican que la Na, K-ATPase del músculo esquelético de ratas HPT y con IRC presenta un aumento en la sensibilidad a la ouabaina, lo que podría relacionarse con una variación en la proporción de las isoformas de la Na, K-ATPase presentes en músculo ($\alpha 1$ y $\alpha 2$).

(Proyecto Fondecyt 154/88)

65

REGULACION HORMONAL DE LA EXPANSION DE VOLUMEN PLASMATICO EN LA MUJER EMBARAZADA. (Hormonal regulation of plasma volume expansion in pregnant women). Salas, SP, Espinoza, R*, Robert, JA*, Gutiérrez, BL y Rosso, P. Centro de Investigaciones Médicas y Deptos.* de Pediatría y Obstetricia y Ginecología, Fac. de Medicina, Universidad Católica. (Patrocinio: J.S. Roblero).

Durante el embarazo se produce un aumento del volumen plasmático (VP) materno de aproximadamente un 40%. Este cambio sería modulado por la acción combinada de estradiol (E2), progesterona (PG) y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). En mujeres que tienen fetos con retardo de crecimiento (RCF) hemos observado una expansión del VP significativamente disminuida en relación a mujeres portadoras de fetos con crecimiento normal. El objetivo de este trabajo fue explorar los mecanismos hormonales responsables de la menor expansión de VP asociada al RCF. Para este fin medimos los niveles plasmáticos de E2, PG, actividad de renina plasmática (PRA), aldosterona (A) y VP en 17 mujeres portadoras de fetos normales (C) y en 14 con RCF idiopático. El VP fue significativamente menor en grupo con RCF (C= 3833 ± 147 ; RCF= 2982 ± 133 ml; $p < 0.001$). El grupo con RCF presentó niveles disminuidos de E2 (C= 26 ± 1.8 ; RCF= 18 ± 1.9 ng/ml; $p < 0.01$); PG (C= 234 ± 24 ; RCF= 163 ± 18 ng/ml; $p < 0.01$) y A (C= 819 ± 83 ; RCF= 558 ± 80 pg/ml; $p < 0.01$). Sin embargo, la PRA fue similar en ambos grupos (C= 12.6 ± 1.3 ; RCF= 14.8 ± 2.5 ng/ml/hr). Estos resultados indican que en el RCF idiopático se produce una disociación PRA/A cuyas causas aún desconocemos. Los niveles disminuidos de E2 y PG podrían ser una causa asociada de menor expansión del VP, pero también es posible que sólo reflejen compromiso de la unidad feto-placentaria secundaria al proceso de RCF.

Parcialmente financiado por FONDECYT 89-0592.

67

MADURACION POSTNATAL DEL TUBULO CONECTOR EN RIÑON DE RATA (Postnatal maturation of the rat renal connecting tubule) Humphreys, J. Velarde, V. Laboratorio de Fisiología y Patología Celular, Unidad de Regulación Neurohumoral, Depto. de Ciencias Fisiológicas, P.Universidad Católica de Chile, Santiago. (Patrocinio: H. Croxatto)

La rata presenta una nefrogénesis incompleta al nacer, lo cual la convierte en un modelo útil para estudiar el desarrollo renal postnatal. Así, en el túbulo proximal se distinguen 3 períodos: riñón temprano (2-6 días), intermedio (10-15 días) y maduro (30-38 días).

A pesar que diversos segmentos del nefrón han sido altamente estudiados, no se tiene información del túbulo conector. El propósito de este trabajo fue el estudio del túbulo conector usando caliceína (Cal) como marcador morfológico (esta enzima se sintetiza exclusivamente en las células conectoras). Se usaron riñones de ratas Sprague Dawley de 5, 15 y 30 días de edad (n=15 cada grupo) para el estudio morfológico y bioquímico. Se tiñeron cortes de 5 um de grosor, con tinciones convencionales e inmunocitoquímica, usando un anticuerpo específico anti-Cal renal (1:5.000) y la Cal total se cuantificó en homogenizados de riñón, usando un RIA directo (1:1.000.000).

El análisis morfológico mostró un patrón de maduración centrífuga. A los 5 días los túbulos conectores eran escasos, aparecían dilatados y de menor longitud; las pocas células se tiñeron con menor intensidad que a los 30 días; además se observó mitosis. El tamaño celular aumentó de 74.9 ± 0.9 um (n = 334) a los 5 días hasta 115.3 ± 1.7 um (n = 327) a los 30 días ($p < 0.05$). El número de células teñidas para Cal aumentó de $102 \pm 15/\text{mm}^2$ a los 5 días a $583 \pm 90/\text{mm}^2$ a los 30 días. La cantidad de Cal total fue de 4.61 ng/mg prot, 15.05 ng/mg prot y 32.77 ng/mg prot a los 5, 15 y 30 días respectivamente.

De acuerdo a nuestros resultados la maduración postnatal del túbulo conector consiste en una proliferación de sus células, una migración de las células productoras de Cal desde la médula a la corteza renal y un aumento en tamaño y contenido de Cal.

Financiado con FONDECYT 2047/87 y 346/89

68

MANEJO RENAL DE POTASIO EN LA INSUFICIENCIA RENAL CRONICA. POSIBLE PARTICIPACION DEL TUBULO CONECTOR (Renal handling of potassium in chronic renal failure. Possible contribution of the Connecting tubule) Loyola MS, Vio CP. Laboratorio de Fisiología y Patología Celular. Unidad de Regulación Neurohumoral, Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile.

La mantención de la homeostasis del potasio es una función de vital importancia durante la evolución de la insuficiencia renal crónica. Existen evidencias que indican que la célula conectora (TCNc) participa de manera importante en la secreción de potasio por el nefron distal. Como la calcirelina renal se sintetiza exclusivamente en esta célula, la usamos como marcador morfológico para estudiar el comportamiento de la TCNc frente a una reducción del número de nefrones.

A 12 ratas sometidas a nefrectomía parcial 5/6 (IRC) se les evaluó filtración glomerular (TFG), presión arterial, proteinuria, excreción urinaria de sodio y potasio (NaU y KU) y su excreción fraccional (EF Na y EF K) a las 4, 8 y 12 semanas. A las 12 semanas se realizó estudio morfológico (microscopía convencional e ICQ para calcirelina). Un grupo control (C) de 7 ratas fue sometido a laparotomía y evaluado de igual forma. Las ratas IRC desarrollaron hipertensión (166±6 vs. 130±5,6 mm Hg, p<0,001); proteinuria (25,8±8,5 vs. 6,3±1,7 mg/15 h, p<0,05), disminución de la TFG (0,908±0,045 vs. 2,094±0,33 ml/min, p<0,001) y aumento de la FF K (25,5±2,4 vs. 15,4±2,8% p<0,05) con electrolitos plasmáticos normales.

El estudio morfológico muestra las alteraciones propias de la IRC (esclerosis focal segmentaria glomerular, material proteico intratubular, fibrosis intersticial, dilatación tubular etc.) y un aumento del tamaño de la TCNc (área de sección transversal de 166,6±6 vs. 113,9±5 μm, p<0,05), lo que se correlaciona con la EF K (r = 0,766, p<0,001).

Estos resultados permiten plantear que la hipertrofia de las TCNc es responsable al menos en parte del mecanismo adaptativo por el cual los nefrones remanentes mantienen la kalemia dentro de rangos normales en la IRC experimental.

Financiado por FONDECYT 2047/87 y 346/89.

69

CAMBIOS MORFOFUNCIONALES EN EL RINON DE RATAS CON HIPERTENSION RENOVASCULAR: EFECTO DEL ENALAPRIL. (Morphofunctional changes in kidneys of renovascular hypertensive rats: Effect of Enalapril). Luenjo E., Albertini R., Croxatto H.R. Unidad de Regulación Neurohumoral, Depto. de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Existen datos muy incompletos acerca de las modificaciones morfofuncionales que se registran durante la evolución de la hipertensión nefrogénica, particularmente con el tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora. Nos interesa investigar el efecto del Enalapril (E), (Lab. Sava) en ratas hipertensas (Modelo Goldblatt 2 rinones, una pinza). El estudio se realizó en 3 grupos de ratas machos de peso inicial de 100-120 g. A la 4a semana las ratas hipertensas se distribuyeron en dos grupos homogéneos de acuerdo a la presión arterial. Un grupo no recibió tratamiento (H, n=9) y el otro (H+E, n=13) recibió E, 2mg/Kg/día por 8 semanas. Como control se usaron ratas con operación ficticia (C, n=11). Semanalmente se midió la presión arterial, peso corporal y diuresis. A las 12 semanas, se determinó la excreción de calcirelina, proteinuria, creatinina, el peso de ambos rinones y en cortes de estos se hizo el estudio morfológico.

Los resultados muestran que el E normaliza: la presión arterial (114±4, 185±7, 96±4 mmHg, p<0,01), la Calcirelina urinaria (4554±530, 2528±601, 4598±604 mU/día, p<0,05), la proteinuria (11,8±2, 54,4±11, 14,3±2 mg/día, p<0,001); los resultados corresponden a ratas C, H y H+E respectivamente. El peso del riñón pinzado (aparentemente no filtrante) disminuyó significativamente en H+E (p<0,05). Las lesiones histológicas del riñón contralateral, secundarias a la hipertensión se revertieron parcialmente con E.

La normalización de la calcirelina urinaria por el E, se podría explicar por una acción activadora sobre el sistema calcirelina - cinina renal que contribuiría a normalizar la presión arterial, mecanismo que se sumaría a la inhibición de la producción de angiotensina II y a la menor destrucción de bradicinina.

Financiado por Fondecyt 346/89.

70

PEPSANURINA, UN INHIBIDOR NATURAL DE ATRIOPEPTINA A NIVEL RENAL. Pepsanurina, a natural inhibitor of atriopeptin on the kidney. Roblero J. y Figueroa D.H. Unidad de Regulación Neurohumoral, Dpto. Cs. Fisiológicas. P. Universidad Católica de Chile.

La pepsanurina (PU) es un factor de naturaleza peptídica liberada de globulinas plasmáticas por acción de pepsina. Su estructura química aun no ha sido determinada. La propiedad biológica más relevante de PU es su capacidad de inhibir los efectos natriurético y diurético de atriopeptina (ANP), cuando se inyecta ip en la rata anestesiada.

Para investigar si este efecto ocurre directamente a nivel renal se estudió PU en el riñón de rata aislado y perfundido en un sistema de circuito cerrado. El tiempo de perfusión se dividió en tres periodos consecutivos de 30 min: a) basal, b) bajo la acción de ANP, 10 ng/ml, y c) luego de adicionar PU, 10 ul/ml. En cada periodo se determinó, volumen (UV), sodio (UNA) y potasio (UK) urinarios. En una serie experimental control se agregó al medio de perfusión albúmina bovina hidrolizada (BSA) en lugar de PU.

Los resultados se muestran en las tablas:

TABLA - 1

	BASAL	ANP	ANP + PU
UV (ml)	1.24 ± 0.55	4.65 ± 0.43**	1.95 ± .63**
UNA (ueq)	43 ± 11	368 ± 137*	72 ± 33*
UK (ueq)	18.6 ± 4.6	40.5 ± 9.3*	9.8 ± 5.3*

TABLA - 2

	BASAL	ANP	ANP + BSA
UV (ml)	1.99 ± 0.64	4.06 ± 1.21**	3.70 ± 1.18
UNA (ueq)	186 ± 59	431 ± 188 *	386 ± 127
UK (ueq)	51.7 ± 21.9	37.1 ± 11.4	21.2 ± 5.5

*p<0.05, **p<0.001 vs Basal; #p<0.05, ##p<0.001 vs ANP

Estos resultados apoyan la idea que PU es capaz de actuar directamente a nivel renal.

Financiado por proyecto FONDECYT 642/89.

71

DISTRIBUCION INTRARENAL DE APROTININA. (Localization of Aprotinin in the kidney). Oestreicher E. Laboratorio de Fisiología y Patología Celular. Unidad de Regulación Neurohumoral, Departamento de Ciencias Fisiológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago. (Patrocinio: CP Vio).

Aprotinina (Trasyol, Bayer) (Tras), es un potente inhibidor de calcirelina (Cal) in vivo e in vitro, que ha sido usado clínicamente y experimentalmente para conocer la contribución de Cal a la función renal. Estudios farmacocinéticos demuestran acumulación renal; pero se desconoce su localización intrarrenal. Siendo el riñón un órgano celularmente heterogéneo, el objetivo de este trabajo fue estudiar su distribución celular con el fin de conocer su posible mecanismo de acción. Para esto, ratas adultas (n=20) recibieron Tras (50.000 U, ip), procesándose sus tejidos para el estudio morfológico 30 min, 1, 2, 4, 8 y 24h después. Tras se localizó usando inmunocitoquímica con un anticuerpo específico.

La acumulación intrarrenal de Tras se observa en forma progresiva después de 1h, primero en gotas de reabsorción en el túbulo proximal, persistiendo hasta una hora más tarde; luego la tinción es difusa en el citoplasma celular, destacando la membrana basal. En túbulos distales y colectores se observa primero localizada en las membranas lumbales, agregándose la membrana basal de los túbulos distales a las 4h, y la de los colectores a las 8h., persistiendo hasta las 24h. La presencia de Tras, en membranas lumbales y basales sugeriría que el Tras, además de filtrarse a nivel glomerular se secretaría en túbulos distales.

A partir de 1h., existe unión de Tras a las células conectoras (productoras de Cal), lo que permitiría explicar su efecto sobre la función renal. No se observó tinción en glomerulos, vasos sanguíneos ni en algunos segmentos proximales.

Los resultados muestran que Tras, se une a las células conectoras y además al túbulo proximal, colector y otros segmentos del nefron distal. Esta unión no selectiva de Trasyol a segmentos que no contienen Cal podría explicarse por la naturaleza aniónica de este inhibidor (pi=10).

Financiado con FONDECYT 2047/87 y 346/89