

MICROBIOLOGIA Y GENETICA

123

PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE UNA AGARASA EXTRACELULAR DE *Pseudomonas* sp.B (Purification and partial characterization of an extracellular agarase from *Pseudomonas* sp.B). Sáez, D., Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia. (Patrocinio: O. León).

En nuestro laboratorio hemos aislado varias cepas de bacterias marinas con acción agarolítica. Una cepa aislada desde el gusano de mar (*Bankia* sp.), produce perforaciones en el agar, al ser sembrada en placas de cultivo, llegando a licuar completamente este polisacárido. En base a varios criterios esta bacteria ha sido clasificada en el género *Pseudomonas*.

En este trabajo, informamos la purificación y caracterización parcial de la enzima extracelular que lleva a cabo la degradación del agar.

Las bacterias fueron crecidas en medios de cultivo líquido, que contenían agar 0,2% para inducir la actividad agarolítica. La actividad hidrolizante de agar se midió por la aparición de azúcares, mediante la determinación de su poder reductor. La agarasa se precipitó desde los sobrenadantes libres de células, con sulfato de amonio (75% de saturación) y se purificó por cromatografías en DEAE-celulosa y en Sephadex G-75.

En electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, la fracción purificada muestra una banda principal de peso molecular aproximadamente 32.000 y varias bandas menores. La agarasa exhibe una actividad específica de 7,8 U/mg, es activa a temperaturas de hasta 40°C, posee un pH óptimo de 7,0 y requiere de ciertas sales para su actividad (NaCl, KCl, pero no Na₂SO₄ o (NH₄)₂SO₄). Esta última característica la distingue de otras enzimas agarolíticas descritas previamente.

(Financiado por los proyectos: DIC-UACH 3-90-02 y FONDECYT 99/0051).

125

ACTIVIDADES PERIPLASMICAS MONO Y DIFOSFOHIDROLASICAS DE *E. coli*. (Periplasmic mono diphosphohydrolase activities of *E. coli*). Tapia, V., Collados, L., Chavet, L., Chiong, M., Kettlun, A.M., Depto. Bioquímica y Biol. Molecular. Fac. Cs. Químicas y Farm. Univ. de Chile.

La síntesis de pared bacteriana involucra la participación de Dol-P como transportador de azúcares. Se piensa que la enzima apirasa lo generaría a partir de Dol-PP y además por su actividad pirofosfohidrolítica drenaría los nucleosidos difosfato productos de la síntesis de pared bacteriana.

Las bacterias intactas de *E. coli* a pH 7,5 y con Ca²⁺ hidrolizan 5'-AMP, 3'-AMP, 5'-CMP, ADP, ATP, G-6P, R-5P, PPI, pNO₂P, lo que presupone actividades periplásmicas. Se logró la asociación entre la 5'-nucleotidasa respecto a la ADPasa y ATPasa variando el catión activador y pH del medio de ensayo. El F⁻ sólo inhibió parcialmente la hidrólisis de G-6P.

Para demostrar que son enzimas periplásmicas, se hizo shock osmótico que libera sólo este tipo de enzimas. Se encontró mayor actividad sobre AMP que ADP y ATP. La bacitracina descrita como inhibidora de la hidrólisis de Dol-PP, se encontró que también fue inhibidor de la actividad ADPasa y ATPasa en mayor grado que sobre la 5'-AMPasa.

Se demostró que la actividad ADPásica medida es de tipo apirásica por la insensibilidad frente a Ap5A. Un electroenfoque de la fracción periplásmica mostró que sólo una banda de proteínas hidroliza los 3 sustratos, con un pI de 4,6, lo que sugiere que pudiera ser una enzima multifuncional con actividad fosfo monoesterásica y pirofosfohidrolásica.

Financiado por Proyecto FONDECYT 90-1006.

124

AVANCE EN EL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE LA β -LACTAMASA DE *Shigella flexneri* UCSF-129 (Structural studies of β -lactamase from *Shigella flexneri* UCSF-129). Campos, M., González, H. Mondaca, M.A., González, M., Sánchez, R., Cáceres, J., Vásquez, O. y Ananías, E. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Concepción.

β -lactamasas constituyen el principal mecanismo de resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos. A partir de una cepa enteropatógena de *Shigella flexneri* se obtuvieron transconjugantes en cepas de *E. coli* K-12, rectora del plásmido que codifica una β -lactamasa, la cual ha sido caracterizada por nuestro grupo de investigación. El objetivo es aumentar el rendimiento de la purificación de β -lactamasa de *Shigella flexneri* por una parte, y a futuro secuenciar su gen. Para ello, se empleó la técnica de conjugación en medio líquido, obteniéndose una frecuencia de transferencia de 10⁻⁷ y el tiempo de contacto entre ambas cepas fue de 60'. Las transconjugantes que adquirieron resistencia a la ampicilina y cloranfenicol se cultivaron en medios adecuados y se realizaron los antibiogramas. La extracción del plásmido incorporado a la *E. coli* K-12 se realizó siguiendo el método de Birnboim y Doly y se le determinó su peso molecular. Paralelamente, se estudió la relación antigénica entre la β -lactamasa de *Shigella flexneri* con 6 β -lactamasas de los grupos A,B, y C, para ello se empleó la técnica de Western-Blot y se detectó la reacción antígeno-anticuerpo mediante reactivos cromogénicos en papel de nitrocelulosa. Sólo con la β -lactamasa plasmidial de la clase A del tipo RTEM-2 de *E. coli* se encontró mayor analogía. Financiado por el Proyecto N°20.13.84 de la D.I. de la Universidad de Concepción.

126

INHIBICION POR D-GLUCONO-1,5-LACTONA DE LA B-GLUCOSIDASA DE *CHRYSONILIA SITOPHILA*. (*C. sitophila* B-glucosidase inhibition by D-glucono-1,5-lactone). O'Reilly S., Curotto E. y Riveros M.C. Instituto de Química, Universidad Católica de Valparaíso. (Patrocinio: J. Reyes M.)

La inhibición de numerosas carbohidrolasas por D-glucono-1,5-lactona se debería a su conformación de "semisilla distorsionada" semejante al ión carbonio que sería un importante intermedio en la catálisis de estas enzimas.

En este trabajo se estudia el efecto de la D-glucono-1,5-lactona sobre la B-glucosidasa parcialmente purificada producida por el hongo *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441) utilizando como sustrato artificial p-nitrofenil-B-D-glucopiranosido a pH 5.0 y 40°C.

El análisis de los parámetros cinéticos Km ap. y Vmáx ap. en ausencia y en presencia de la D-glucono-1,5-lactona indica inhibición total del tipo competitiva. Mediante un programa para computador de ajuste por regresión no lineal a la hipérbola para un modelo de inhibición competitiva se obtiene Vmáx= 11,53 μ M/min, Km= 2,71 mM y Ki= 116 μ M.

La inhibición competitiva obtenida en esta reacción hidrolítica, en que el agua está en exceso, permite postular la unión de la D-glucono-1,5-lactona como análogo del estado de transición a la enzima libre y por lo tanto la formación de un ión carbono en el mecanismo de la reacción.

Financiado por D.G.I., U.C.V.

127

TRANSCONJUGANTES DE *Shigella flexneri* Y PRODUCCION DE β -LACTAMASA. (*Shigella flexneri* transconjugants and β -lactamase production). Barros, L., Cid, H., Bunster, M., Sepúlveda, G. y Montoya, R. Laboratorio de Biofísica Molecular y Genética, Depto. Biología Molecular, Fac. Ciencias Biológicas y Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

La producción de β -lactamasa en cepas de *Shigella flexneri*, bacteria Gram negativa patógena, ha sido asociada a la presencia de plasmidios.

La cepa de *Shigella flexneri* 129, aislada en el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción, posee 3 plasmidios. Los genes de resistencia a cloramfenicol y ampicilina están asociados al plasmidio de mayor peso molecular. A medida que la cepa es manipulada en el laboratorio, va disminuyendo su capacidad de producir β -lactamasa, dificultando la obtención de una cantidad adecuada de enzima para realizar estudios de cristalización y secuenciación de aminoácidos.

Con el objeto de trabajar con una cepa no patógena y de obtener un derivado estable productor de β -lactamasa, se conjugó *Sh. flexneri* 129 con *E. coli* K-12. Los transconjugantes obtenidos poseen 1, 2 ó 3 de los plasmidios de la cepa original; las características de las β -lactamasas producidas por los transconjugantes no varían (peso molecular, punto isoeléctrico y perfil de sustrato) y su rendimiento se mantiene.

El aislamiento de transconjugantes que incorporaron sólo el plasmidio codificador de resistencia, es el primer paso para la obtención de una cepa hiperproductora.

Proyecto DIU de C Nº 20.31.34
Convenio GTZ-DAAD-FONDECYT.

129

Th. ferrooxidans: RESPUESTA A CARENCIA DE NUTRIENTES. (Response of *Th. ferrooxidans* to nutrients - starved).

CAMPOS G. y VERA MARIA L. Departamento Biomédico, Universidad de Antofagasta. Unidad de Bioquímica.

Para estudiar la inducción y represión de sistemas enzimáticos específicos, los microorganismos se someten a stress ambiental de nutrientes básicos necesarios para su crecimiento y desarrollo. Las respuestas moleculares de los microorganismos se relacionan directamente con el metabolismo del compuesto en déficit.

Se estudió el efecto de dos nutrientes en cepas nativas de *Th. ferrooxidans* aisladas de minerales Chilenos de la zona norte, que han sido previamente caracterizados en nuestro laboratorio.

Las bacterias se crecieron en medio líquido 9K a pH = 1,55 en presencia y ausencia de fosfato de potasio y sulfato de amonio (0,22 y 0,75 mM respectivamente), en fase exponencial las células se colectan a 10.000 rpm y muestras entre 150 y 500 μ g de proteínas, se analizan en gels de poliacrilamida SDS-PAGE, en gradiente 7-15%.

La carencia de fosfato inorgánico, produce la inducción de proteínas de PM 24, 26, 70, 72 y 80 kD y la inhibición de proteínas de 10, 19 y 50 kD. El déficit de ión amonio, es muy parecido, pero se observan diferencias en las proteínas inducidas.

Actualmente se intenta averiguar, que tipo de proteínas son las que se inducen en ausencia de fosfato, ya que resultados similares se obtienen cuando las cepas se crecen en presencia de tóxicos inorgánicos como el arseniato de sodio.

Financiado por Proyecto DGIEXAT S03-89
UNIVERSIDAD DE ANTOFAGASTA.

128

CARACTERIZACION DE PEPTIDOS CARBOXILO TERMINAL DE TUBULINA EXPRESADA EN *E. COLI*. (Characterization of carboxy-terminal peptides of tubulin expressed in *E. coli*). González, C. y Lagos, R. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

La región carboxilo terminal de la tubulina está involucrada en la unión de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y algunos metales bivalentes que regulan la polimerización y despolimerización de la tubulina. Las estrategias utilizadas para estudiar el papel de esta región han sido la digestión parcial con subtilisina y el uso de péptidos sintéticos. La construcción de péptidos de fusión permite obtener péptidos carboxilo terminal de una subunidad perteneciente a una sola isoforma de tubulina y no está limitado en tamaño, como en el caso de los péptidos sintéticos. Con este propósito se construyeron péptidos híbridos que contienen 6 a 12 aminoácidos correspondientes a la región de poli-inserción del plasmidio-vector pT7-7 fusionados a la región carboxilo terminal de la tubulina (entre 52 y 387 aminoácidos). Se usó el sistema acoplado promotor/RNA polimerasa del fago T7 (PNAS 82: 1074-78, 1985), el cual permite la expresión de genes específicos. La inducción de la expresión de las proteínas clonadas en este sistema está controlada por la temperatura.

La estrategia utilizada permitió obtener 5 plasmidios quiméricos que codifican para péptidos de diferentes tamaños, que contiene la región carboxilo terminal de las subunidades alfa y beta de la tubulina.

Se identificó inmunológicamente la expresión de 2 péptidos correspondientes a 387 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la subunidad alfa y a 315 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la subunidad beta. Se están desarrollando métodos de purificación de ambos péptidos, para iniciar su posterior caracterización funcional.

Financiado por Proyecto FONDECYT 1133-89.

130

CANAL ANIONICO DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Thiobacillus ferrooxidans*. (Anionic channel from the *Thiobacillus ferrooxidans* outer membrane). Ferreira, A.C. y Silva, M.M. Unidad de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. (Patrocinio: Rodríguez, M.).

Se obtuvo una proteína de la membrana externa de *Thiobacillus ferrooxidans* cepa R2, que tiene la capacidad de formar canales selectivos para aniones.

La proteína obtenida por extracción con detergentes, digestión proteolítica parcial y filtración en gel, migra como una banda única de 90 kDa en gels de poliacrilamida-SDS. Si la muestra es calentada a 100°C por 5 minutos en presencia de SDS, la banda de 90 kDa es reemplazada por una banda, también única, de 40 kDa.

La forma oligomérica de 90 kDa es activa cuando es reconstituida en membranas lipídicas artificiales, formando canales que conducen preferentemente aniones. La conductancia promedio, para el registro de canales únicos, en una solución KCl 300 mM, fue estimada en 0.4 nS.

Numerosas características de esta proteína la hacen semejante a las porinas de otras bacterias Gram negativas, tales como ubicación en la membrana externa, estructura oligomérica, mayor abundancia relativa, peso molecular cercano a 40 kDa, resistencia a tratamientos con detergentes y proteasas y reactividad inmunológica cruzada. En cuanto a su estructura, la proteína descrita es similar a una porina, sin embargo, en el aspecto funcional esta proteína es claramente diferente, por cuanto no forma poros, sino canales selectivos a aniones de menor magnitud.

Financiado por PNUD CHI/88/003, Fondecyt 575/89 y Dirección de Postgrado Pontificia Universidad Católica de Chile.

131

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE rRNA DE *Thiobacillus ferrooxidans*. (Structure and function of rRNA gene promoters from *Thiobacillus ferrooxidans*). Vargas, D., Cádiz, R., Takamiya, M., Salazar, O. y Orellana, O. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

En trabajos previos se informó sobre la identificación y la determinación de la secuencia de la región del DNA que codifica el extremo 5' terminal del operón *rrnT2* de *T. ferrooxidans* (Salazar et al (1989) FEBS Letters 242, 439-443. Takamiya et al (1990) FEBS Letters, en prensa). En estos estudios se identificaron tres secuencias que presentaban las características de los promotores bacterianos. Una de ellas era similar a los promotores de genes de rRNA de *E. coli*.

Mediante un ensayo *in vivo* en *E. coli* se observó que los segmentos de DNA que contiene secuencias promotoras eran funcionales debido a que permitían la expresión de l gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) cuando eran clonados en vectores que tenían el gen CAT sin los promotores.

Se estudió la funcionalidad de los promotores de operón *rrnT2* *in vivo* en *T. ferrooxidans*. Se empleó el ensayo de protección a la digestión por la nucleasa S1 en la determinación del sitio de inicio de los RNA transcritos primarios. Los resultados sugirieron que uno de los promotores era activo cuando el *T. ferrooxidans* se cultivaba en Fe²⁺ en cambio, al cultivarlo en tiosulfato este promotor era inactivo.

Financiado por PNUD/UNIDO, FONDECYT, UNIVERSIDAD DE CHILE.

133

AISLAMIENTO DE MUTANTES DE *Thiobacillus ferrooxidans* (T.f.) QUE POSEEN ALTERADO EL MECANISMO DE OXIDACION DE ION FERROSO. (Isolation of T.f. mutants with modification in the Fe²⁺ oxidation mechanism). Delgado, M.A. y Rodríguez, M. Unidad de Microbiología, Depto. Biología Celular y Molecular, Facultad Ciencias Biológicas, P.Universidad Católica de Chile.

Thiobacillus ferrooxidans es el principal microorganismo involucrado en la solubilización de cobre de minerales sulfurados. Utiliza como única fuente de energía Fe²⁺ y compuestos de azufre reducido, generando SO₄Cu del cual se puede liberar el metal.

En el presente trabajo, se aislaron mutantes de *Thiobacillus ferrooxidans* incapaces de oxidar Fe²⁺ pero que aún pueden crecer utilizando tiosulfato. Algunas se produjeron espontáneamente y otras por inducción con Nitrosoguanidina. En ambos casos la frecuencia de aparición de mutantes fue alta, como asimismo resultó ser alta la frecuencia de reversión al fenotipo parental.

El objetivo de este estudio está orientado a obtener cepas cuyas alteraciones permitan identificar etapas involucradas en los mecanismos de oxidación y de adherencia al mineral.

La caracterización de las mutantes no resulta fácil, por el limitado número de fenotipos que se pueden estudiar. En nuestro caso incluyó: morfología de la colonia; Crecimiento en medio líquido con diferentes fuentes de energía; Análisis del LPS y Proteínas de la membrana externa. La incapacidad de oxidar Fe²⁺ de estas cepas, hizo necesario estudiar la Rusticiana.

Se presentan los resultados logrados en la obtención de mutantes, caracterización del fenotipo y su capacidad de oxidar Fe²⁺.

Financiado por Fondecyt 575/89.

132

BUGUEDA DE LOS GENES DE *Thiobacillus ferrooxidans* Y *Leptospirillum ferrooxidans* HOMOLOGOS AL GEN DEL RECEPTOR QUIMIOTACTICO tar DE *Escherichia coli*. (Search for the T. ferrooxidans and L. ferrooxidans genes homologous to the E. coli gene coding for the tar chemotactic receptor). Amaro, A.M., Rojas, J., Toledo, H. y Jerez, C.A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

T. ferrooxidans y *L. ferrooxidans* son bacterias móviles que participan en la bioextracción de metales. Hemos demostrado que ambos microorganismos presentan actividad quimiotáctica posiblemente mediada por receptores proteicos metilables como en *E. coli*. El receptor tar de *E. coli* media la respuesta frente a aspartato (atrayente) y a Ni²⁺ (repelente). De acuerdo al comportamiento de las bacterias hierro-oxidantes, su receptor debería reconocer a Ni²⁺ como atrayente y aspartato como repelente. Para estudiar este receptor empleamos el gen tar de *E. coli* contenido en el plasmidio pAK101. Se sintetizaron sondas con el gen tar completo (3.2 Kb) o con sus fragmentos conteniendo el dominio citoplasmático del receptor (1.2 Kb) o el dominio periplásmico (2.0 Kb) mediante un método no-radiactivo que emplea nucleótidos marcados con digoxigenina. Mediante la técnica de Southern seguido de hibridación, encontramos 1) homología entre el gen tar de *E. coli* y regiones del DNA de *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* y 2) que esta homología es detectable tanto con el dominio citoplasmático (altamente conservado en bacterias) como con el periplásmico (menos conservado). Finalmente, hemos obtenido fragmentos del DNA cromosomal de 6 Kb (*T. ferrooxidans*) y de 3.5 Kb a partir de los cuales se aislarán los respectivos genes homólogos al gen tar de *E. coli*.

Financiado por Proyectos FONDECYT 88-0074 y Universidad de Chile.

134

CLONAMIENTO DE GENOMAS MUTANTES ts EN REPLICACION DEL BACTERIOFAGO PM2. (Molecular cloning of ts mutants of bacteriophage PM2). Martínez, J., León, R. y Canelo, E. Departamento Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

El genoma del bacteriófago PM2 es una molécula de DNA circular, de doble hebra, sobre enrollada que constituye un buen sistema para estudiar replicación de DNA de doble hebra mediante el modelo de círculo rotatorio. Fagos con genoma de una hebra que replican según este modelo codifican una proteína que reconoce y corta el DNA viral en el origen de replicación o inmediatamente adyacente a él.

El sitio ori de PM2 se ha ubicado en el mapa físico. Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos identificado 2 mutantes termosensibles defectivos en replicación del DNA viral.

Nos interesa ubicar el gen de replicación con respecto al sitio ori para lo cual utilizaremos genomas virales híbridos entre segmentos wt y segmentos ts. Dichos segmentos, de 2.5 kb y 7.5 kb, resultan de digestión del DNA viral con PstI y AvaI.

Como primer paso hemos construido plásmidos híbridos que llevan clonado en el sitio PstI de pUC19 el genoma viral wt y el genoma de cada mutante ts. Además hemos subclonado por digestión con AvaI del plásmido híbrido wt, los dos segmentos de 2.5 k y 7.5 kb. Se están realizando los experimentos para subclonar dichos segmentos provenientes de genomas ts.

La disponibilidad de estos plásmidos heterólogos nos permitirá determinar la ubicación de las mutaciones ts en replicación mediante el análisis fenotípico de los fagos resultantes después de transfección de BAL31 con DNA viral recombinante construido con un segmento silvestre y un segmento mutante.

135

INHIBIDORES DEL METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS Y DEL GLUTATION EN *T. cruzi*. EFECTO DE NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL. (Inhibition of polyamines and glutathione metabolism in *T. cruzi*. Effects of Nifurtimox and Benznidazole). Lemus, S., Repetto, Y., Licchena, I., Kiwi, I., Letelier, M. E. y Morello, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. Las drogas de uso actual Nifurtimox y Benznidazol actúan generando radicales libres. Este protozoo presenta diferencias importantes con el huésped en relación a los sistemas que neutralizan los radicales libres. El *T. cruzi* presenta un cofactor el tripanotión [N1,N8-bis (glutathionil) espermidina] el cual es necesario para la reducción del glutatión oxidado. El glutatión reducido (GSH) y el tripanotión juegan un rol importante en la protección del *T. cruzi* al daño oxidativo producido por las drogas antichagásicas. El objetivo de este estudio es evaluar los efectos producidos por la Ciclohexilamina (inhibidor de la síntesis de espermidina), por el Nifurtimox y por el Benznidazol sobre: Crecimiento de los parásitos en cultivo, Niveles de glutatión y de grupos tioles no unidos a proteínas (GSH, tripanotión, cisteína, metionina). Para el presente trabajo se utilizaron formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. El GSH se determinó por método enzimático y los grupos tioles por el método de Ellman. Los resultados obtenidos muestran una inhibición del 50% del crecimiento de los parásitos al adicionarle a los medios de cultivo ciclohexilamina 1mM. Resultados similares se producen con Nifurtimox y Benznidazol a concentraciones de 5 y 10 μ M. Tanto Nifurtimox como Benznidazol producen una disminución del 30% del GSH y de un 50% de los grupos tioles. Los resultados obtenidos muestran que las drogas antichagásicas alteran el metabolismo del GSH y de otras moléculas con grupos tioles. Financiado por: FONDECYT y DTI Universidad de Chile.

137

ACTIVIDAD DNA POLIMERASA EN LA FORMA NO PROLIFERATIVA TRYPOMASTIGOTE DE TRYPANOSOMA CRUZI. (DNA polymerase activity on trypomastigote the non proliferative form of *T. cruzi*). Fernandez, R., Venegas, J. y Solari, A. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Casilla 70086, Stgo.7

Trypanosoma cruzi (agente causal de la enfermedad de Chagas) posee un ciclo vital complejo. En este ciclo, el parásito sufre sucesivas diferenciaciones pasando de estados proliferativos a no proliferativos de especial interés, lo cual constituye la forma infectiva trypomastigote. Información previa proveniente de experimentos realizados "in vivo" indican que en estas formas no proliferativas no existe síntesis de DNA. Sin embargo, estudios realizados en extractos totales han permitido detectar un importante nivel de actividad DNA polimerasa en estas mismas formas de parásito. Como una primera aproximación experimental para conocer la identidad y el rol fisiológico de esta actividad enzimática, se procedió a fraccionar con técnicas cromatográficas convencionales extractos de trypomastigotes obtenidos por diferenciación "in vitro". Usando columnas de fosfocelulosa eluidas con gradientes de KCl, hemos podido recuperar una actividad DNA polimerasa mayoritaria que eluye a alta fuerza iónica. Análisis preliminares de los perfiles de elución obtenidos de estas columnas, sugieren la existencia de más de una especie con actividad DNA polimerasa. Se informa sobre las características bioquímicas de la actividad mayoritaria y su relación con las DNA polimerasas de la forma proliferativa epimastigote descritas anteriormente.

Financiado por UNDP/World Bank/WHO TDR y DTI Universidad de Chile.

136

FOSFORILACION Y ACETILACION DE HISTONAS EN TRYPANOSOMA CRUZI (Histone phosphorylation and acetylation in *Trypanosoma cruzi*). Iorio, G.C.; Galindo, M. y Galanti, N. Unidad de Biología Celular y Molecular, Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La fosforilación y la acetilación de histonas se han relacionado frecuentemente con modificaciones en la estructura y función de la cromatina en eucariontes superiores.

Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de 5 días (>70% de células en activa proliferación) y de 14 días (<<20% de células en proliferación) se trataron por 33 horas con $^{32}P_4H_2$ (58 uCi/ml). De manera similar, otros cultivos en alta (5 días) y baja (14 días) actividad proliferativa se trataron con acetato- ^{14}C por 4 horas, en ausencia y presencia de cicloheximida. En ambos casos la cromatina se obtuvo y las histonas se extrajeron con H_2SO_4 0.4 N, por técnicas convencionales.

El análisis autoradiográfico de las histonas marcadas con ^{32}P y separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-tritón-urea-ácido mostró la presencia de 3 histonas fosforiladas en *T. cruzi*, una de las cuales es parcialmente desfosforilada con fosfatasa alcalina. Por otra parte, se encontró mayor acetilación de histonas totales en cromatina obtenida de cultivo de 5 días. Sin embargo, la acetilación postraduccion de histonas fue mayor en cromatina obtenida de cultivos estacionarios (14 días).

Se concluye que las histonas de *T. cruzi* pueden modificarse por fosforilación y acetilación. Los resultados sugieren que estas modificaciones químicas de las histonas se correlacionan con cambios en la actividad proliferativa de este protozoo parásito. (Financiado por OMS, FONDECYT, TMAS, OEA, DTI-Universidad de Chile).

138.

ESTUDIO DE LA RESPIRACION CELULAR DE EPIMASTIGOTOS INTACTOS Y DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA DE MITOCONDRIAS *in situ* DE TRYPANOSOMA CRUZI. (Study of cellular respiration of intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and oxidative phosphorylation by mitochondria *in situ*) Traipe, L., Colona-Torres, L. (*), Spencer, P. y Aldunate, J. (*). Departamento de Biología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Utilizando la técnica de permeabilizar la membrana plasmática de *T. cruzi* y así poder estudiar la fosforilación oxidativa en mitocondrias *in situ*, hemos realizado un estudio comparativo respecto del efecto de la Hidroquinona (HQ) y sus derivados *terbutil-HQ* y *di-terbutil-HQ* sobre la respiración celular de formas epimastigotas intactas del parásito.

En esta serie de compuestos, se pudo establecer que su acción antiparasitaria está en relación con el grado de hidrofobicidad de los sustituyentes del anillo básico. La hidroquinona no inhibe la respiración de los epimastigotes intactos, en cambio sus derivados, la *terbutil-hidroquinona* y en mayor grado, la *di-terbutil-hidroquinona*, inhiben en forma significativa la respiración de los parásitos. Similar relación se obtiene al estudiar la acción de estos derivados sobre el crecimiento de cultivos de *T. cruzi*.

Los estudios en mitocondrias *in situ* han permitido precisar que la acción de los derivados fenólicos se debe a que bloquean el segmento Ubiquinona-citocromo b de la cadena respiratoria mitocondrial. Tal acción se debería a su analogía estructural con la Ubiquinona y competirían con ella en el transporte de electrones hacia el citocromo b, tanto si provienen de la oxidación de NADH como si provienen de FADH.

Financiado por: FONDECYT, OEA, DTI U. de Chile.

139

RELACION ENTRE PROLIFERACION CELULAR Y ADP-RIBOSILACION DE VARIANTES CS EN LOS PRIMEROS CICLOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Tetrapygus niger*. (Relationships between ADP-ribosylation of CS variants and cell proliferation in early embryos of *Tetrapygus niger*). Montecino, M., Puchi, M., Inostroza, D., Gamboa, S. Depto. Biología Molecular, Fac. Ciencias Biológicas y Recursos Naturales Universidad de Concepción.

La regulación de la estructura de la cromatina representa un aspecto fundamental para la realización de eventos tan complejos como la proliferación y diferenciación celular. En el último tiempo se han venido presentando evidencias sobre el rol de las modificaciones post traduccionales de proteínas cromosomales en dicha regulación, siendo la poli ADP-ribosilación una de las más investigadas.

En el presente trabajo, se analizó la poli ADP-ribosilación de proteínas histónicas tipo CS, mediante la incubación de cigotos de *Tetrapygus niger* con ³H adenosina y la posterior detección de la modificación en estas proteínas por fluorografía.

Con el objeto de verificar el posible rol de la poli ADP-ribosilación sobre la proliferación se estudió el efecto del inhibidor de la enzima poli ADP-ribosa sintetasa (E.C. . . .30), 3-aminobenzamida, sobre la replicación, medida por la incorporación de ³H timidina al genoma de estos cigotos.

Los resultados obtenidos muestran importantes niveles de poli ADP-ribosilación de histonas CS al inicio de fase S, determinándose además que esta modificación es indispensable para la replicación y segmentación de estos embriones.

Financiado por Proyectos FONDECYT 0789/88, Universidad de Concepción 20.31.17 y 20.31.35.

141

EXPRESION DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE TRUCHA (tGHII) EN LEVADURA. (Expression of trout GHII in yeast). Ocaranza, M.P., Müller, I., Hevia, E., Valenzuela, P. y Venegas, A. Lab. Biol. Molec. Bios-Chile I.G.S.A. Santiago, Chile.

La hormona de crecimiento es un polipéptido secretado por la pituitaria. En peces, se ha observado que la administración de la hormona en forma endógena o exógena acelera el crecimiento, mejora la utilización del alimento y aumenta la resistencia a cambios en el medio ambiente y a enfermedades. Estas propiedades crean grandes expectativas en el uso de la hormona para acortar el ciclo de producción y la sobrevida de peces en cultivo.

En este trabajo se presentan resultados que indican la factibilidad de expresar la hormona en levaduras, para producirla en grandes cantidades y a precios razonables para el mercado nacional.

Previamente hemos clonado el cDNA de tGHII en pUC-18, cuya región codogénica completa se amplificó por PCR y se clonó en el vector pBio100. Este vector contiene el promotor y terminador de la gliceraldehído 3P deshidrogenasa de levadura. La cassette de expresión fue subclonada en el vector para levadura pBio110 y usado para transformar diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Los transformantes fueron seleccionados en medio Ura- y la expresión de la hormona se siguió por geles de SDS-PAGE y por Western-blot.

Los resultados muestran la aparición de una banda de masa molecular de aproximadamente 23.000, que reacciona con un suero de conejo anti-tGHII y cuya migración coincide con la hormona de crecimiento de trucha.

Estos resultados son la primera comunicación de la expresión de una hormona de crecimiento en levaduras.

Financiado por proyecto CORFO 12012 y FONDECYT 619/1990.

140

REMODELACION DE CROMATINA DURANTE LA FORMACION DEL PRONUCLEO MASCULINO EN ERIZO DE MAR *Tetrapygus niger*. (Chromatin remodeling during male pronuclei formation in sea urchin *Tetrapygus niger*). Oliver, M.I., Gutiérrez, S., Garrido, C., Imschenetzky, M. Departamento de Biología Molecular, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, CHILE.

Post-fecundación, la cromatina espermática se descondensa transformándose en pronúcleo masculino. Esta descondensación resulta de la pérdida de histonas (SpH) y no histonas específicas del espermatozoide (SpNHCP). Se postula que las SpH son reemplazadas por variantes CS provenientes de un pool preexistente en ovocitos, sin embargo, no existen evidencias formales al respecto.

Con el objeto de aportar información a este problema se investigaron las partículas supranucleosomales derivadas de la digestión con nucleasa endógena y micrococcal de pronúcleos obtenidos de cigotos recolectados entre la fecundación y la amfimizis. Se analizó el ADN contenido en estas partículas por geles de agarosa y las proteínas por PAGE-SDS 18% detectándose las SpH y las variantes CS por Western Blot con anticuerpos anti SpH y anti CS, respectivamente.

Los resultados obtenidos indican que el núcleo femenino posee nucleasas endógenas asociadas a cromatina, en cambio el pronúcleo masculino no las posee. Se presentan evidencias experimentales sobre los fragmentos de ADN y las proteínas presentes en nucleopartículas.

Proyecto FONDECYT 0789/88, Universidad de Concepción 20.31.17 y 20.31.35.

142

SIMILITUD AMINOACIDICA EN LA EVOLUCION DE CITOCROMOS C Y B. (Chemical similitude in the evolution of cytochromes c and b). M. Pieber. Departamento Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En un trabajo anterior nuestro, se estableció que la mayor similitud química de los 20 aminoácidos se podía describir por la secuencia del siguiente anillo:

Cys-Arg-His-Lys-Gln-Asp-Glu-Asn-gly-Ser-Ala-Thr-Pro-Val-Ile-Leu-Met-Phen-Tyr-Trp. Dicha ordenación correspondió también a los cambios aminoacídicos más frecuentemente observados en un conjunto de familias de proteínas.

En este trabajo se compararon las secuencias lineales de 138 citocromos c y b con respecto al anillo aminoacídico de similitud química. Al evaluar las distancias totales y promedios de cada residuo con respecto al que le sigue en cada citocromo en el anillo, se pudo establecer una ordenación de los citocromos de acuerdo a su similitud química. De esta ordenación se ve claramente que las estructuras de citocromos de bacterias han variado notablemente más que los citocromos c del resto de las especies. Esta ordenación permite, además, sugerir cuáles son las estructuras tridimensionales más parecidas entre sí.

Se estableció también el anillo de sustitución de codones más probable basado en la hipótesis que las transiciones son 10 veces más probables que las transversiones. La secuencia del anillo de codones resulta, sin embargo, diferente a la secuencia del anillo aminoacídico. Dado que la matriz de sustitución de codones presenta una razón o ideal/real mayor a la razón del anillo de sustitución aminoacídica, se plantea la posibilidad de mutaciones "intermedias" sin proyección para explicar los cambios aminoacídicos a nivel de las proteínas. A partir del anillo de codones, se podrían evaluar eventualmente, el número de mutaciones que pueden ocurrir, para entender así las sustituciones aminoacídicas más frecuentes.

143

DESCRIPCION CARIOTIPICA DE LA OSTRA CHILENA *Tiostrea chilensis*. (Karyotypic description of the Chilean Oyster *Tiostrea chilensis*). Ladrón de Guevara, B., Winkler, F. Depto. Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte. Casilla 117. Coquimbo. (Patrocinio : G. Martínez).

Ostrea chilensis, único representante de la familia Ostreidae en Chile, y *O. lutaria*, Neozelandesa, han sido separadas recientemente del género *Ostrea* e incluidas ambas en el género *Tiostrea* como una sola especie, *T. chilensis*.

Con el objeto de aportar antecedentes citogenéticos que permitan validar este cambio, se describe el cariotipo de *T. chilensis* y se lo compara con otras especies de la familia Ostreidae.

Se prepararon placas metafásicas a partir de tejido branquial de juveniles de *T. chilensis*. Este se trató con Colchicina (0.05%, 16 hors.), se sometió a hipotonía (Agua de mar 25%), se fijó en Carnoy, se aplastó y tiñó con Giemsa al 4% por 25'. Se determinó el número cromosómico y, para el análisis morfológico, se usaron los criterios propuestos por Spotorno (1985).

T. chilensis presenta 20 cromosomas (2N= 20, NF= 40), donde los pares 1,2,3,5,6,8,10 son metacéntricos (m) y los pares 4,7,9 submetacéntricos (sm). Los tamaños porcentuales fluctúan entre 6.8% del complemento diploide para el mayor, y 3.2% para el menor.

Las características cariotípicas encontradas para esta especie concuerdan en el 2N y NF con los informados para otras Ostras. Se observan diferencias, sin embargo, en el número y tamaño de los cromosomas sm. La morfología cromosómica de *T. chilensis* y *O. edulis*, única *Ostrea* suficientemente estudiada, difiere claramente en 3 de los 10 pares cromosómicos. Sobre estos antecedentes se discute la validez de la inclusión de *T. chilensis* en este género, y su separación del género *Ostrea*.

Financiado parcialmente por Proyecto 021 D.G.I. U.C.N.

145

ATAVISMOS EXPERIMENTALES Y RESTRICCIÓN PROGRESIVA DEL DESARROLLO EN FENOCOPIAS FILETICAS DE ROEDORES. (Experimental atavisms and developmental restriction in phyletic phenocopies of rodents). Spotorno, A. Depto. de Biología Celular y Genética, F. de Medicina, U. de Chile.

La sucesión de fenotipos reales y potenciales inscritos en el programa genético de una especie podría ser evocada por perturbación heterocronica experimental de señales claves; deberían obtenerse así variantes atávicas o progresivas (fenocopias filéticas) o nuevas. Alternativamente, la ley de Dollo establecería la irreversibilidad de las transformaciones morfológicas. Para verificar estos postulados en la evolución de tres líneas filéticas de roedores, un mínimo de tres series de camadas fueron inyectadas perinatalmente con dosis fisiológicas de testosterona (T), o anti-T (AT) en distintos tiempos de la ontogenia.

Abrothrix T (3 a 8 días) presentaron vesiculares, cráneos (longitud rostral), cuerpos y riñón menores que los hermanos controles (caracteres atávicos), aunque no desarrollaron el báculo distal ancestral (irreversibilidad). En *Octodon T* no hubo diferencias significativas (irreversibilidad, excepto regresión de vesiculares), pero los machos T-18 días (pero no los de 6 y 30) presentaron espículas penianas nuevas; su posición, forma e histología son similares a las de otros géneros (carácter progresivo).

La obtención de caracteres atávicos y progresivos (fenocopias filéticas) demuestran la potencialidad parcial del programa genético, indican los mecanismos hormonales de variación y explican la evolución por heterocronia. Los caracteres refractarios podrían ser grupos celulares pre-diferenciados compartamentalizados, o genéticamente canalizados.- DTI 2689/8933, U. DE CHILE y FONDECYT 88-1013.

144

MICROEVOLUCION EN LAS POBLACIONES CHILENAS DE *DROSOPHILA IMMIGRANS*. (Microevolution in the Chilean populations of *Drosophila immigrans*).

Brncic, D. Depto. Biol. Cel. y Genética, Facultad de Medicina Universidad de Chile.

D. immigrans es una especie cosmopolita que en Chile se distribuye desde Arica hasta Punta Arenas. Estudios publicados por el Autor en 1955 (J. Hered. 46: 59-83) demostraron que las poblaciones de esta especie son polimórficas para reordenamientos cromosómicos debido a 3 inversiones designadas A, B y C.

Un análisis citogenético reciente reveló que en los últimos 35 años, han ocurrido cambios substanciales tanto en la distribución como en la frecuencia de las inversiones. La inversión A se concentra sólo en las regiones Central y Sur del país. La inversión B se distribuye ahora en todo el territorio incluyendo Magallanes, donde coexiste con A. Además, la frecuencia de la inversión B experimenta fluctuaciones estacionales significativas. El cambio más espectacular lo ha experimentado la inversión C, que en la década del 50 estaba restringida a la zona de Valdivia y, en la actualidad ha extendido su rango de distribución a toda la región comprendida entre Copiapó y Puerto Montt.

Los estudios realizados indican que los cambios microevolutivos en *D. immigrans* y propablemente en otras especies del género, son muchísimo más rápidos que lo postulado clásicamente.

Financiado por Proyecto Fondecyt 90-0987 y Universidad de Chile, D.T.I. B 2308-89-45).

146

EFFECTO GENOTOXICO Y TERATOGENICO INDUCIDOS POR EL PENTACLOROFENOL. (Genotoxic and Teratogenic effect induced by Pentachlorophenol). Venegas, W., Hermosilla, I., Venegas, P.*. Laboratorio de Genética Toxicológica, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales, Universidad de Concepción.

En la región forestal del sur de Chile, el pentaclorofenol (PCP), es ampliamente utilizado como pesticida para impregnar maderas de exportación, por lo que ha sido detectado en los cuerpos de aguas de ríos y lagunas de esta región. Siendo el PCP refractario a la degradación, constituye un contaminante ambiental de un peligro potencial de insospechadas consecuencias futuras, tanto para el hombre como para la flora y fauna en su contacto.

Por el impacto que el PCP tiene sobre el medio ambiente y el hombre, nos pareció de interés estudiar los efectos genotóxicos y teratogénicos, utilizando como modelos embriones y larvas del anfibio *Caudiverbera caudiverbera* y meristemas apicales del vegetal *Allium cepa*. Los test de micronúcleos y aberraciones cromosómicas fueron utilizados para estudiar el efecto genotóxico de este agente químico, el cual no demostró efectos mutagénicos claros en los modelos ensayados. Sin embargo, la alta incidencia de alteraciones del desarrollo embrionario y larvario inducido en *C. caudiverbera*, nos revela su alto potencial teratogénico.

Proyecto D.I. 20.31.21, Universidad de Concepción. Proyecto FONDECYT 69-0625

* Alumno de la Facultad de Ciencias Agrarias, Forestales y Veterinarias, Sede Chillán, Univ. de Concepción.